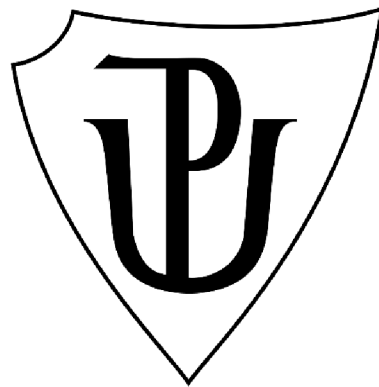


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



## **Molekulárne klonovanie konštruktú pre expresiu GFP-fúzneho proteínu ROP8 a stabilná transformácia lucerny siatej**

### **BAKALÁRSKÁ PRÁCA**

Autor:	<b>Dominika Gabrišová</b>
Študijný program:	B0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství
Špecializácia:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	<b>Mgr. Miroslava Medelská, Ph.D.</b>
Rok:	2024

## Prehlásenie

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

V Olomouci dňa .....

.....

Podpis študenta

## Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Dominika Gabrišová
Názov práce	Molekulárne klonovanie konštruktú pre expresiu GFP fúzneho proteínu ROP8 a stabilná transformácia lucerny siatej
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Katedra biotechnológií
Vedúci práce	Mgr. Miroslava Medelská, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024

### Abstrakt

Lucerna siata (*Medicago sativa* L.) je jednou z najdôležitejších viacročných plodín. Radí sa k najrozšírenejším kŕmnym strukovinám, pretože má vysokú nutričnú hodnotu a produkuje veľké množstvo biomasy pre hospodárske zvieratá. V posledných rokoch sa výskum zameraný na túto rastlinu dostáva na popredné miesta. Tento jav je spôsobený schopnosťou lucerny zlepšovať úrodnosť pôdy podzemným prenosom dusíka a zabraňovaním strate vody, fosforu a dusíka z pôdy. Hlavným cieľom tejto bakalárskej práce bolo navrhnuť a pripraviť konštrukt s GFP-fúznym proteínom ROP8 pre funkčnú expresiu v tejto rastline. Táto skupina proteínov je na molekulárnej úrovni pre rastlinu významná, pretože sa podieľa na riadení organizácie a dynamiky cytoskeletu, endocytózy a exocytózy, aktivácii NADPH oxidázy a intracelulárnych kinázových kaskád, signalizácii a transporte ABA, auxínu a regulácii transkripcie mRNA a translácie proteínov. Prácou je možné prispieť k anotácii tohto proteínu a rozšíreniu poznatkov o genóme lucerny, čo má význam pre rýchlú manipuláciu prostredníctvom genetickej transformácie. Pre skúmanie exprese génu priamo v tejto rastline, bola použitá metóda stabilnej transformácie, ktorej predchádzala tranzientná transformácia rastliny *N. benthamiana*. Stabilná transformácia je nevyhnutnou metódou pre produkciu transgénnych rastlín s dedičnými vlastnosťami, ktoré nás zaujímajú. Schopnosť jednoduchšej genetickej transformácie a regenerácie prostredníctvom pletivových kultúr umožňuje použitie vo veľkovejrobe transgénnych produktov a najnovších metódach genetického inžinierstva spojenými so zvýšením poľnohospodárskej produkcie (zlepšenie nutričnej hodnoty, výnosu krmiva, schopnosti odolávať abiotickému stresu, škodcom a herbicídum, ochoreniam).

Kľúčové slová	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Medicago sativa</i> , ROPGTPázy, stabilná transformácia, tranzientná transformácia
Počet strán	82
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Dominika Gabrišová
Title	Molecular cloning of vector for GFP-fused protein ROP8 and stable transformation of alfalfa
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biotechnology
Supervisor	Mgr. Miroslava Medelská, Ph.D.
The year of presentation	2024

### Abstract

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) is one of the most important perennial crops. It is one of the most widespread fodder legumes because of high nutritional value and it produces a large amount of biomass for livestock. In recent years, research focused on this plant has been getting prominence. This phenomenon is due to alfalfa's ability to improve soil fertility by underground nitrogen transfer and preventing the loss of water, phosphorus and nitrogen from the soil. The main goal of this bachelor thesis was to design and prepare a construct with GFP-fusion protein ROP8 for functional expression in this plant. This group of proteins is significant at the molecular level for the plant, as it is involved in the controlling of organization and dynamics of the cytoskeleton, endocytosis and exocytosis, activation of NADPH oxidase and intracellular kinase cascades, signaling and transport of ABA, auxin, and regulation of mRNA transcription and protein translation. The work can contribute to the annotation of this protein and the expansion of knowledge about the genome of alfalfa, which is important for rapid manipulation through genetic transformation. To observe gene expression directly in this plant, a stable transformation method was used, preceded by a transient transformation of *the N. benthamiana* plant. Stable transformation is a necessary method for the production of transgenic plants with hereditary characteristics of interest to us. The ability to simple genetic transformation and regeneration through plant tissue cultures allows usage in large-scale production of transgenic products and the latest genetic engineering methods associated with an increase in agricultural production (improvement of nutritional value, feed yield, ability to resist abiotic stress, pests and herbicides, diseases).

Keywords	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> , <i>Medicago sativa</i> , ROPGTPases, stable transformation, transient transformation
Number of pages	82
Number of appendices	0
Language	Slovak

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>2</b>
2.1	Medicago sativa .....	2
2.1.1	Význam <i>M. sativa</i> pre vlastnosti pôdy.....	3
2.1.2	<i>M. sativa</i> ako kultúrna rastlina (krmovina) .....	3
2.1.3	Genetické a biotechnologické prístupy modifikácie <i>M. sativa</i> .....	5
2.2	Metódy stabilnej transformácie <i>M. sativa</i> .....	6
2.2.1	Transformácia rastlín sprostredkovaná <i>A. tumefaciens</i> .....	6
2.2.2	Transformácia metódou elektroporácie .....	12
2.2.3	Transformácia metódou bombardovania časticami .....	13
2.3	ROP GTPázy .....	14
2.3.1	Zaradenie .....	14
2.3.2	ROP štruktúra a charakteristika .....	15
2.3.3	Cyklus.....	17
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....</b>	<b>19</b>
3.1	Materiál .....	19
3.1.1	Bakteriálny materiál.....	19
3.1.2	Rastlinný materiál .....	19
3.1.3	Použitie plazmidy pre Multisite Gateway® klonovací systém .....	19
3.1.4	Chemikálie.....	19
3.1.5	Kultivačné média.....	20
3.1.6	Roztoky a pufry.....	24
3.1.7	Prístrojové vybavenie a komerčné kity.....	26
3.1.8	Software.....	26
3.2	Metodický postup pri príprave vektorov pre klonovanie fúzneho proteínu....	27
3.2.1	PCR reakcia s attB primermi .....	27
3.2.2	DNA agarózová elektroforéza .....	28
3.2.3	Vyrezanie PCR produktu z agarózového gélu a purifikácia DNA.....	29
3.2.4	BP rekombinačná reakcia .....	30
3.2.5	Transformácia do TOP10 chemokompetentných buniek.....	30
3.2.6	Metóda Colony PCR .....	31

3.2.7	<i>Kultivácia pozitívnych kolónii Escherichia coli so vstupným vektorom</i> .....	32
3.2.8	<i>Izolácia plazmidovej DNA pomocou QIAprep® Spin Miniprep Kitu</i> .....	32
3.2.9	<i>Príprava glycerolových bakteriálnych zásobných kultúr</i> .....	33
3.2.10	<i>Restrikčné štiepenie</i> .....	33
3.2.11	<i>Sekvenovanie</i> .....	35
3.2.12	<i>LR rekombinačná reakcia</i> .....	35
3.2.13	<i>Transformácia Escherichia coli destinačným vektorom s inzertom</i> .....	36
3.2.14	<i>Overenie destinačného vektoru restrikčným štiepením</i> .....	36
3.2.15	<i>Sekvenovanie destinačného vektoru</i> .....	37
3.2.16	<i>Transformácia do Agrobacterium tumefaciens a príprava nočnej kultúry</i> ..	37
3.2.17	<i>Selekcia kolónii na základe colony PCR s M13 primermi</i> .....	37
3.3	<i>Tranzientná transformácia listov Nicotiana benthamiana</i> .....	39
3.4	<i>Stabilná transformácia lucerny sietej s využitím somatickej embryogenézy</i> ..	40
3.4.1	<i>Sterilizácia rastlinného materiálu</i> .....	40
3.4.2	<i>Kultivácia A. tumefaciens na LB médiu</i> .....	40
3.4.3	<i>Prenos listových explantátov M. sativa na SH médium s A. tumefaciens</i> ..	41
3.4.4	<i>Kultivácia lucerny sietej na B5H médiu</i> .....	41
3.4.5	<i>Kultivácia lucerny sietej na B5H médiu s prídavkom antibiotík</i> .....	41
3.4.6	<i>Kultivácia lucerny sietej na B50 médiu</i> .....	41
3.4.7	<i>Kultivácia lucerny sietej na MMS médiu</i> .....	42
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>42</b>
4.1	<i>Príprava klonovacích vektorov</i> .....	42
4.1.1	<i>PCR reakcia s attB primermi</i> .....	43
4.1.2	<i>Príprava a overenie vstupného vektora pomocou restrikčného štiepenia</i> ..	43
4.1.3	<i>Overenie vstupného vektora pomocou colony PCR</i> .....	46
4.1.4	<i>Sekvenovanie</i> .....	46
4.1.5	<i>Overenie destinačného vektora pomocou Colony PCR</i> .....	47
4.1.6	<i>Overenie destinačného vektora pomocou restrikčného štiepenia</i> .....	50
4.1.7	<i>Sekvenovanie</i> .....	50
4.2	<i>Tranzientná transformácia Nicotiana benthamiana</i> .....	51
4.3	<i>Stabilná transformácia lucerny sietej</i> .....	53
<b>5</b>	<b>DISKUSIA</b> .....	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVER</b> .....	<b>57</b>



<b>7</b>	<b>LITERATÚRA .....</b>	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>ZOZNAM SKRATIEK.....</b>	<b>82</b>
<b>9</b>	<b>DISKUSIA .....</b>	Chyba! Záložka není definována.
<b>10</b>	<b>ZÁVER.....</b>	Chyba! Záložka není definována.

## CIELE PRÁCE

Teoretická časť:

1. Spracovanie literárnej rešerše na tému *Medicago sativa* a ROP GTPázy; Metódy stabilnej transformácie lucerny siatej

Praktická časť:

1. Molekulárne klonovanie pomocou Multisite Gateway Cloning kitu (vyhľadávanie sekvencie v databáze, návrh primerov, PCR reakcia, agarózová elektroforéza, BP a LR rekombinácia).
2. Tranzientná transformácia *Nicotiana benthamiana*.
3. Stabilná transformácia lucerny siatej
4. Vyhodnotenie získaných výsledkov a spísanie experimentálnej časti bakalárskej práce.

# 1 ÚVOD

V tejto práci boli využívané rôzne metódy génového inžinierstva pre štúdium lucerny siatej (*Medicago sativa* L.). Táto rastlina je považovaná za vysoko kvalitnú krmovinu široko pestovanú po celom svete (Fu et al., 2015). V ekológii alebo pri pestovaní má význam, pretože zlepšuje vlastnosti pôdy (Zemenchik et al., 1996, 2002). V posledných rokoch lucerna nie je iba významným zdrojom živín pre hospodárske zvieratá, ale aj cenným objektom výskumu pre pochopenie molekulárnych mechanizmov, ktoré regulujú jej rast a produktivitu.

Jedným takýmto mechanizmom sú ROP GTPázy. ROP majú významú úlohu najmä pre reguláciu polárneho rastu na rastúcich špičkách a pre ďalšie vývojové procesy (Feiguelman et al., 2018). Klaster aktívnej GTPázy určuje oblasť rastúcej špičky (Jacobs et al., 2019) koreňových vláskov (Mendrinna & Persson, 2015) alebo peľového vrecúška, ktoré majú jeden rastúci vrchol (Fu, 2015). Efektory ROP sa taktiež podieľajú na regulácii cytoskeletu a vápnikového gradientu, takže druhotne prispievajú k exocytóze alebo remodelácii bunkovej steny a bunkovému rastu (Feiguelman et al., 2018). Prostredníctvom regulácie cytoskeletu je možné zvýšiť toleranciu rastlín k abiotickému stresu, napríklad voči stresu z vysokej miery zasolenia je potrebná rýchla dvojfázová reorganizácia mikrotubulov (Li et al., 2017). Takýmto spôsobom je napríklad možné zlepšovať vlastnosti poľnohospodárskych plodín.

ROP GTPázy je možné skúmať aj priamo v rastlinách lucerny rôznymi transformačnými metódami, ktoré vykazujú stále vyššiu úspešnosť. Príkladom je transformácia časticovým bombardovaním (Pereira & Erickson, 1995), elektroporáciou (Quecini, 1999) alebo transformácia sprostredkovaná *Agrobacterium tumefaciens* (Kumar et al., 2018; Samac & Austin-Phillips, 2006).

Cieľom bakalárskej práce bolo pripraviť konštrukt GFP- fúzneho proteínu ROP8 a následne vnieť metódou stabilnej transformácie do lucerny siatej. Tento proteín má význam študovať, pretože je napríklad súčasťou signálnych dráh, ktoré podporujú autofágiu alebo je spájaný s organizáciou F-aktínových vlákien (Kawashima et al., 2014; Lin et al., 2021).

## 2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

### 2.1 *Medicago sativa*

Lucerna siata (*Medicago sativa* L.), je jednou z najdôležitejších viacročných strukovínových plodín. Schopnosť vytvárať nové púčiky pri opätovnom raste listov umožňuje jej zber niekoľkokrát ročne viacero rokov (D'Aoust, 2004; Min, 2016). Taxonomicky je zaradená pod čeľaď bôbovité (Fabaceae). Hoci je lucerna bežne kategorizovaná ako cudzoopel'ovač (alogamia), niektoré druhy sú schopné si zrelé semená vyrábať aj samooplodnením. Miera samoopelenia v prirodzenom prostredí je od 9 do 47% (Riday et al., 2015; Viands et al., 2015).

Genóm má veľkosť 800–1000 Mbp (Blondon et al., 1994). Počtu chromozómov zodpovedá základné chromozómové číslo  $x = 8$ . Lucerna je geneticky klasifikovaná ako autotetraploid, ale existuje v dvoch úrovniach ploidie (diploid,  $2n = 2x = 16$  a ako dominujúci kultivar autotetraploid,  $2n = 4x = 32$ , ktorý má 4 alely génu) (Li & Brummer, 2012; Quiros & Bauchan, 2015). U diploidov samoopelenie znižuje heterozygotnosť každú generáciu o polovicu. Pokles je pomalší u zvyšujúcej sa ploidie vďaka multialelickým lokusom (Bartlett & Haldane, 1934; Busbice, 1969; Dewey, 1966). Autotetraploidné druhy majú trvalú alogamiu. Nie sú po samoopelení schopné produkovať zygoty, nedochádza k samooplodneniu. Vďaka silnej inbrednej depresii sa znižuje miera príbuzenského kríženia (Blondon et al., 1994; X. Li & Brummer, 2009; Rumbaugh et al., 2015)

Strukovina pochádza pravdepodobne z okolia polostrova Malá Ázia (Turecko), zakaukazských štátov (Irán) a zo strednej Ázie (Turkménsko). Dnes sa pestuje po celom svete ako krmovina (Bolton et al., 2015; S. Kumar, 2011; Russelle, 2001; Small, 2011). Lucerna je štvrtou najrozšírenejšou plodinou z hľadiska produkcie a úrodnej plochy, ktorú zaberá a tret'ou najrozšírenejšou plodinou po ekonomickej stránke v Spojených štátoch. V rámci celého sveta sa komerčne pestuje približne na 30 miliónoch ha pôdy (Acharya et al., 2020; Diatta et al., 2021; Long-Xi Y & Chittaranjan K, 2021). Jej trhová hodnota je viac ako 9 miliárd amerických dolárov ročne (Baral et al., 2022; USDA-NASS, 2022). Dopyt po lucerne stúpa s rastúcou svetovou populáciou a vyšším dopytom po hovädzom mäse (Dieterich et al., 2021; Singer et al., 2017). Počas obdobia

rokov 2018 – 2023 bola odhadovaná ročná miera nárastu vo výške 7,3 % (Research and Markets, 2020).

### **2.1.1 Význam *M. sativa* pre vlastnosti pôdy**

Viacročné krmne strukoviny vo všeobecnosti zabraňujú stratám vody, dusíka a fosforu z pôdy krajiny (Zemenchik et al., 1996, 2002). Lucerna má teda hlavne význam pre celkovú stabilitu ekosystému (Angers, 1992; Perfect et al., 1990). Jej hlboký rozsiahly koreňový systém drží pôdne častice pohromade, čím zlepšuje sklon pôdy a znižuje eróziu až o 98% (Gyeryeong & Lee, 2021; Karlen et al., 1990; Q. Li et al., 2017). Erózia zvyšuje riziko odtoku životne dôležitých živín, znižuje sa kvalita vody a poľnohospodárska produktivita (Zhang et al., 2016). Zvýšenie úrodnosti pôdy pestovaním lucerny a iných viacročných krmovín sa prejavuje typicky zvýšenou pórovitosťou (Angers et al., 1987), priepustnosťou vzduchu (Jarrett & Hoover, 1985) a stimuláciou tvorby organickej hmoty zvýšením populácie pôdnych mikroorganizmov (Gopinath et al., 2008; Gyeryeong & Lee, 2021). Trváce strukoviny nie sú tak prispôsobivé a majú tendenciu byť citlivejšie na hmyzích škodcov, patogény, nadmernú vlhkosť pôdy a na kyslosť pôdy ako trávy (Marten, 2015).

Keďže je lucerna strukovina, ako hostiteľská rastlina vytvára symbiotický vzťah s gramnegatívnou pôdnou baktériou *Sinorhizobium meliloti*. Baktéria fixuje atmosférický dusík, poskytuje ho rastline a zvyšuje úrodnosť pôdy pre sprievodné alebo následne pestované plodiny prostredníctvom podzemného prenosu dusíka (Collins et al., 1986; Gurich & González, 2009; X. Li & Brummer, 2012; Walley et al., 1996). Koreňové exsudáty vytvárajú bohatú rhizosféru a priaznivo drobnú pôdnu štruktúru (Summers & Putnam, 2008).

### **2.1.2 *M. sativa* ako kultúrna rastlina (krmovina)**

Ako krmovina s vysokou produkciou biomasy, má lucerna pre hospodárske zvieratá vysokú nutričnú hodnotu, preto sa vyznačuje titulom "kráľovná krmovín". Je súčasťou potravy dojníc a hovädzieho dobytku vo forme sena, siláže alebo je priamo spásaná na pastvinách. Čerstvú vo forme klíčkov, vysušenú na múčku alebo ako súčasť bežných jedlách ju môžu konzumovať aj ľudia (Firdaous et al., 2010; Long-Xi Y & Chittaranjan K, 2021; Michalczyk et al., 2019; Schasteen, 2024). Ďalej má význam pre jej dlhodobú udržateľnosť, širokú adaptáciu na rôzne prostredia a schopnosť viazať dusík. Splňa

vhodný pomer vysokého obsahu bielkovín (15,2%) ku obsahu fermentovateľných sacharidov (Lei et al., 2017). Vysokú výživovú hodnotu krmiva určuje ďalej vláknina, farbivo karotén, vitamíny (A, B, C, D, E a K) (Bora & Sharma, 2011; Kumar et al., 2018). Vyvážený obsah esenciálnych aminokyselín a oneskorená postupná degradácia proteínov v bachore domácich hospodárskych zvierat zodpovedajú vylepšenej plodine lucerny (Barry & McNabb, 1999; Gawel et al., 2017; M. Kumar et al., 2022; Kumar et al., 2018). Minerály ako vápnik (1,5%), fosfor, meď a draslík v mliekarenskom priemysle napomáhajú premene krmiva v telách dojníc a iného dobytku na poľnohospodárske produkty živočíšneho pôvodu, typickým príkladom je mlieko (Long-Xi Y & Chittaranjan K, 2021; Sangra et al., 2019; Summers & Putnam, 2008).

Ako rastlina dozrieva, zvyšuje sa podiel menej kvalitného materiálu a klesá výživová hodnota strukovín. Spôsobuje to lignifikácia, menšie množstvo celulózy v bunkových stenách stonky a pokles celkového pomeru listov ku stonkám. Listy strukovín majú takmer vždy vyššiu kvalitu krmiva ako stonky. Z tohto dôvodu sa pre zisk vysoko kvalitného sena lucerna kosí ideálne v skorom štádiu kvitnutia (Albrecht & Beauchemin, 2015; Marten et al., 2015). Na zber lucerny má vplyv aj pôdna vlhkosť a s tým spojená prítomnosť *Clostridia* spp., ktorá spôsobuje nižší podiel listov ku stonkám (Albrecht & Beauchemin, 2015; P. W. Brown & Tanner, 1983).

V porovnaní so senom sa siláže vyznačujú menším obsahom sušiny (DM), vyšším podielom rozpustných dusíkatých látok, ich efektívnejšiu odbúrateľnosť v bachore, zvýšený obsah kyseliny octovej, mliečnej, menej vo vode rozpustných sacharidov a nižšie pH. Napriek nižšej kvalite proteínov, má siláž lucerny zvyčajne podobnú alebo lepšiu úroveň produkcie mlieka ako seno lucerny vďaka rýchlej a úplnej fermentácii (Broderick, 1985; Nelson & Satter, 1990, 1992; Wallentine, 1993).

Na výrobu siláže krmivo vädne na poli, aby sa získala vlhkosť 500 až 700 g DM .kg<sup>-1</sup> a rýchlo sa vylúčil kyslík na minimalizáciu aeróbného dýchania, aby došlo k fermentácii (Rooke & Hatfield, 2015). Pred silážovaním musí byť zvädnutá na 300 až 500 g DM .kg<sup>-1</sup>. Nadmerne vlhké krmivo podporuje rast a aktivitu *Clostridia* spp., ktoré fermentuje kyselinu mliečnu a sacharidy na kyselinu maslovú, čo vedie k strate energie, bielkovín a vyššiemu pH siláže (Albrecht & Beauchemin, 2015); (Pitt, 1990).

Evapotranspirácia a WUE koreluje s výnosom krmiva lucerny (Y. Li & Su, 2017; Lindenmayer et al., 2011). Potreba vody u lucerny je relatívne vysoká, pretože má dlhé vegetačné obdobie a hlboký koreňový systém, aby dosiahol podzemnú vodu a prijal živiny. Ukladá si ním sacharidy ako energetickú rezervu pre zvýšenie výnosov a odolnosti (Burezq, 2022; Suttie, 2008). Riadiace postupy a šľachtiteľské úsilie zlepšili výnosy lucerny zvýšením transpirácie (Johnson & Tieszen, 1994).

Niekoľko štúdií uvádza, že so zvyšujúcim sa intervalom kosenia medzi zbermi sa výnos sušiny lucerny vo všeobecnosti zvýšil, zatiaľ čo kvalita krmoviny sa znížila (G. Brink et al., 2010; G. E. Brink & Marten, 1989; Sheaffer & Marten, 1990); tento stav môže byť výhodný v podmienkach silného sucha (Brummer & Bouton, 1991, 1992). Efektívnemu využitiu lucerny bráni zlé využitie bielkovín a relatívne vysoký obsah lignínu. Vysoká rýchla degradácia bielkovín predstavuje riziko nadúvania bachora u prežúvavcov a vysoký obsah lignínu bráni degradácii sacharidov v bachore (F. Chen & Dixon, 2007; Lei et al., 2017; X. Li et al., 2008; Singer et al., 2017).

### **2.1.3 Genetické a biotechnologické prístupy modifikácie *M. sativa***

Prístupy génového inžinierstva a biotechnologické metódy boli použité na prenos génov a manipuláciu expresie génov zapojených do dôležitých metabolických dráh. Účelom týchto metód je zlepšenie nutričnej hodnoty, výnosu krmiva, schopnosti odolávať abiotickému stresu (chlad, osmotický stres, sucho), posilnenie rezistencie voči škodcom a herbicídum, ochoreniam a lepšej efektívnosti využívania vody (WUE).

Lucerna má význam v genetickom inžinierstve, pretože ide o alogamného tetraploida, ktorý je vysoko citlivý na inbrednú depresiú, neschopný prežiť a zachovať si svoj genetický materiál (Armstrong, 1954; D'Halluin et al., 1990). Vďaka nenáročnej genetickej transformácii a regenerácii pletivovými kultúre je považovaná za ideálnu rastlinu vo veľkovýrobe komerčných transgénnych produktov. Peľ môže fungovať ako nosič na šírenie zavedených geneticky modifikovaných génov do celej rastlinnej populácie alebo príbuzného druhu burín (Schasteen, 2024). Najnovší vývoj genetického inžinierstva sa uplatňuje hlavne pri produkcii nových zlúčenín, priemyselných, farmaceutických bielkovín a obnoviteľných zdrojov energie. Technológia klastrovaných pravidelne rozmiestnených krátkych palindromických opakovaní (CRISPR) sa stáva významným meničom lucerny (Kumar et al., 2018).

Jedným z hlavných environmentálnych faktorov, ktoré obmedzujú rast a produktivitu lucerny je stres zo sucha. Transgénne prístupy vedú k vytvoreniu línií s vyššou mierou prežitia, výnosom biomasy, kvalitou krmiva, ku zvýšeniu rýchlosti fotosyntézy, absorpcii vody a rozpustených živín (Diatta et al., 2021).

Z ekologického hľadiska má potenciál pre bioremediáciu, ochranu pôdy, na výrobu biopalív alebo nových farmaceutických zlúčenín a priemyselných enzýmov (celulózy) (T. Kumar et al., 2018; L. Li & Yuan, 2013; Small, 2011; Tesfaye et al., 2005, 2006).

## **2.2 Metódy stabilnej transformácie *M. sativa***

Stabilná transformácia predstavuje pomerne časovo náročný proces, ktorý väčšinou vyžaduje znalosti zavedených techník pletivových kultúr. Dochádza pri nej k indukcii a podpore rastu celej dospeléj rastliny z transformovaných buniek alebo pletív, ktoré musia mať schopnosť sa *in vitro* regenerovať. Transferová DNA (T-DNA) sa musí stabilne integrovať do genómu hostiteľskej bunky, aby bola cudzia genetická informácia v tejto podobe následne odovzdaná ďalšej generácii (Bent, 2006; Gelvin, 2006; H. D. Jones & Sparks, 2009; Rivero et al., 2014; Tague & Mantis, 2006). Tri základné fázy transformácie sú: (1) výber a príprava explantačného tkaniva, (2) dodanie DNA, (3) indukcia/ regenerácia kalusu a selekcia (H. D. Jones & Sparks, 2009).

Prvá genetická transformácia lucerny satej bola hlásená v polovici 80-tych rokov (Shahin et al., 1986). Za posledných dvadsať rokov došlo k výrazným zmenám v metodológii a k porozumeniu techniky samotnej. Najnovšie protokoly, ktoré opisujú prenos génov sprostredkovaný *Agrobacterium tumefaciens* a inými metódami, vykazujú stále vyššiu úspešnosť transformačných techník lucerny (Kumar et al., 2018; Samac & Austin-Phillips, 2006).

### **2.2.1 Transformácia rastlín sprostredkovaná *A. tumefaciens***

Na transformáciu lucerny pomocou kokultivácie explantátov embryogénnych pletív s *A. tumefaciens* boli vyvinuté relatívne rýchle a účinné metódy (Somers et al., 2003).

K procesu stabilnej transformácie dochádza, keď kmene *Agrobacterium* prenášajú jednovláknovú formu T-DNA (T-vlákná) a efektorové proteíny virulencie (Vir) do rastlinných buniek. Pravdepodobne sa tvoria komplexy T-vláknien s Vir a rastlinnými



proteínmi, ktoré vstupujú do jadra rastliny. T-vlákná sa môžu ďalej náhodne integrovať do rastlinných chromozómov a exprimovať transgény (Gelvin, 2017).

Selekčný markerový gén nesený spoločne konštruktom s génom záujmu medzi T-DNA hranicami, slúži na obnovenie transformovaných buniek a regeneráciu transgénnej rastliny (D'Halluin et al., 1990). Typické selekčné gény, ktoré spôsobujú rezistenciu voči antibiotikám kanamycínu, hygromycínu a herbicídu fosfotricínu (PPT) (glufosinát amónny), sú *nptII*, *hpt* a *bar* (H. D. Jones & Sparks, 2009). Limitujúcim faktorom použitia najbežnejšieho antibiotika kanamycínu môže byť jeho vlastnosť pri vyšších koncentráciách inhibovať produkciu embryí (Desgagnés et al., 1995) a tvorbu koreňov (Austin et al., 1995). PPT v médiu znižuje počet únikov netransformantov (D'Halluin et al., 1990).

Mariotti et al. (1984) upozornil na špecificitu bakteriálneho kmeňa *Agrobacterium* vzhľadom na rôzny genotyp hostiteľského kultivaru lucerny. Táto skutočnosť komplikuje schopnosť tvorby nádora a samotný priebeh transformácie (Desgagnés et al., 1995; Du et al., 1994; Mariotti D et al., 1984).

LBA 4404 je kmeň *Agrobacterium* poskytujúci najlepšie výsledky s vysoko regenerovateľným genotypom kultivaru Regen SY, preto sa používa pri väčšine transformácií lucerny. Navyac je zbavený divokého typu T-DNA z Ti plazmidu, ktorá spôsobuje nádory a inhibuje regeneráciu rastliny (Hoekema et al., 1983; Samac & Austin-Phillips, 2006). Niekoľko ďalších kmeňov bolo testovaných a ukázalo sa, že sú neúčinné alebo majú nižšiu celkovú účinnosť transformácie (Samac, 1995). Ako príklad kokultivácie lucerny s *Agrobacterium* uvádzam metódu transformácie listového disku, ktorú prvý zrealizoval Austin et al. (1995). Okraje sterilizovaných listov boli po narezaní umiestnené do kvapalného média B5h obsahujúce *A. tumefaciens* s hustotou buniek upravenou na 0.6–0.8 pri OD600. Po 30 minútach inokulácie boli explantáty uložené na B5H médiu na 3 dni.

Zakladanie nových kultúr komplikuje vysoká kontaminácia spôsobená prítomnosťou endogénnych mikroorganizmov v explantátoch lucerny *ex vitro* (Pereira & Erickson, 1995; Tian et al., 2002). Avšak bunky kalusu lucerny strácajú schopnosť vytvárať embryá po dvoch až troch subkultiváciách, čo geneticky determinujú dominantné alely dvoch génov (Crea et al., 1995; Hernández-Fernández & Christie, 1989; Kielly &

Bowley, 1992; Lai & McKersie, 1994; Wan et al., 1988). Na dlhodobú udržateľnosť kontinuálnej kultivácie embryogénnej kultúry lucerny siatej, Sangra et al. (2019) vyvinuli systém somatickej embryogenézy za použitia SH4K média. Kalus indukovaný na takomto médiu vytváral somatické embryá po každom pasážovaní bez významnej straty embryogénneho potenciálu. U lucerny sa taktiež používa sekundárna somatická embryogenéza (Lai & McKersie, 1994; Ninković et al., 1995).

### **2.2.1.1 Príprava rastlín na stabilnú transformáciu procesom somatickej embryogenézy prostredníctvom *A. tumefaciens***

Zdrojové rastliny pochádzajú často z *in vitro* klonálneho rozmnožovania odrezkami výhonkov (Samac & Austin-Phillips, 2006) alebo semien, ktoré boli po povrchovej sterilizácii ďalej uložené na klíčenie na MS0 médiu a inkubované vo fytotrone (Sangra et al., 2019). Pre založenie kontinuálnej somatickej embryogenézy Sangra et al. (2019) použil genotyp *M. sativa* Regen-SY (RSY1) zárodočná plazma (PI 537440) (Samac & Lamb, 2000) vo forme semien. Je to hybrid prvej generácie potomkov samooplodnenia, z ktorých jeden pochádza z kultivaru Regen-S (*M. sativa*) a druhý z kultivaru Regen-Y (*Medicago falcata*). Je zodpovedný za zlepšenú regeneráciu a potenciál somatickej embryogenézy, optimalizuje izoláciu protoplastov a je vyselektovaný na vysokú odpoveď a zvýšenie počtu transgénov s frekvenciou 80–100% (Sangra et al., 2019; Seiler, 1991; Tichá et al., 2020).

Tretí až šiesty plne rozvinutý tmavozelený trojpočetný list z troj- až štvortýždňových rastlín je po povrchovej sterilizácii najvhodnejším rastlinným materiálom pre transformáciu. Kvitnúce rastliny lucerny už ako vstupný materiál nie sú vhodné. Ako explantát pre regeneráciu lucerny môžu byť použité klíčne listy, klíčnolistové uzliny, nezrelé prašníky, vajcová bunka, vyizolovaný protoplast listu alebo hypokotyly semenáča (Bingham et al., 2015; Gao et al., 2024; Saunders & Bingham, 1972; H. Zhang et al., 2010).

### **2.2.1.2 Indukcia embryogénneho kalusu**

Embryogénny systém pozostáva z troch médií: indukčného média pre tvorbu kalusu, média na vývoj a dozrievanie embryí (EDM) a média na klíčenie embryí (Sangra et al., 2019). Zloženie a hladiny hormónov indukčného média sú podobne dôležitými parametrami ako genotyp donorovej rastliny, pretože od nich závisí schopnosť kalusu

vznikať a diferencovať sa na semenáč (Atanassov & Brown, 1984; Bingham et al., 1975; Saunders & Bingham, 1972). Presné zloženia médií na indukciu kalusu a regeneráciu orgánov sa líšia. Obe sú však vysoko závislé od explantátu a musia byť optimalizované pre presný typ rastliny (Jones & Sparks, 2009).

Médiá na indukciu kalusu a regeneráciu majú tri hlavné zložky: zmes solí a vitamínov, cukry (sacharóza, maltóza) a regulátory rastu rastlín - špecifické hormóny a selekčné činidlá, ktoré podporujú proliferáciu transformovaných buniek, produkciu somatických embryí a regeneráciu na celé rastliny (Samac & Austin-Phillips, 2006; Weeks et al., 2008).

Auxín (kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová, 2,4-D) v kombinácii s cytokininom (kinetínom) boli použité na indukciu tvorby embryogénneho kalusu v systéme nepriamej somatickej embryogenézy. Vo vyšších koncentráciách môže spôsobiť 2,4-D genetické a epigenetické zmeny v bunkách, ako sú mutácie a metylácia DNA a môžu sa tvoriť abnormálne embryá (Fehér, 2015; Fraga et al., 2012).

Explantáty sa prenesú do selektívneho média obsahujúceho selektívne činidlo (napr. kanamycín), kde sa tvoria kalusy počas 2 až 3 týždňov. Antibiotikum ticarcilín (Tic<sup>R</sup>) sa môže použiť na zabránenie opätovného rastu *A. tumefaciens* (Samac & Austin-Phillips, 2006).

V článku Sangra et al. (2019) boli použité B5H, MS2D a SH4K média pre indukciu embryogénneho kalusu. Do troch dní sa od okraju explantátu prejavila zvlnením tvorba kalusu. Vznikol kalus rôznych tvarov. Kalus lucerny indukovaný na médiách MS2D a B5H [(Gamborg et al., 1968) s prídavkom Gamborg vitamínov, aminokyselín s auxínom a cytokinínom] bol zelenkastej alebo žltkastej farby, zatiaľ čo kalus na SH4K médiu bol žltkastej alebo bielej farby a jemnejšej štruktúry. Čas potrebný na úplné vytvorenie kalusu sa tiež líšil na každom indukčnom médiu kalusu (Sangra et al., 2019). Somatická embryogenéza bola indukovaná na médiu B5H a SH4K (Schenk & Hildebrandt, 1972; Shetty & McKersie, 1993).

### **2.2.1.3 Embryogenéza a maturácia (dozrievanie)**

Kalus, ktorý sa vytvoril v priebehu 3 týždňov, bol prenesený na EDM médium (Sangra et al., 2019). Predošlá podobná štúdia (Desgagnés et al., 1995) udáva prenos kalusov na

EDM médium po 28 dňoch. EDM médium je určené na stimuláciu tvorby embryí s rovnakým zložením ako predchádzajúce indukčné médium, ale bez hormónov (B5, MS a BOi2Y). Indukcia somatických embryí sa začala do troch až štyroch dní od transferu u všetkých systémov. Samotná tvorba somatických embryí nastala po 10-tich až 20-tich dňoch vo všetkých systémoch okrem SH4K-MS. Po indukcii embryá zomreli (Sangra et al., 2019).

V rámci procesu embryogenézy, somatické embryá ďalšie tri týždne dozrievali a prešli si všetkými štádiami charakteristickými pre zygotické embryá. Väčšina embryogénnych kultúr začala ako asynchrónna kultúra, ale dosiahli synchronizáciu, keď dovŕšili štádium dozrievania (Sangra et al., 2019). Systém B5H-B5 má najvyšší výťažok embryí a môže tvoriť základ pre sekundárnu somatickú embryogenézu po dozrievaní primárnych somatických embryí na ich povrchu. Má význam pre predĺženie embryogenézy z kalusu explantátu (Sangra et al., 2019).

#### **2.2.1.4 Klíčenie embryí**

Po 3-4 týždňoch, keď došlo k vzniku embryí, boli prenesené na regeneráciu do MMS média [Murashige & Skoog soli (Murashige & Skoog, 1962) s prídavkom Nitsch & Nitsch vitamínov (Nitsch & Nitsch, 1969), sacharózy a myoinozitolu obsahujúce antibiotiká (Perhald et al., 2006)]. Médium spôsobuje klíčenie, pričom v jednej Petriho miske bolo vyklíčených približne 15 somatických embryí (Sangra et al., 2019).

Akonáhle embryá dosiahli štádium klíčnych listov a vznikol koreň a výhonky (3-5 cm) na MMS médiu, klíčence boli ihneď prenesené do kultivačnej nádoby obsahujúcej MS0 médium [(Murashige & Skoog, 1962) bez kanamycínu a regulátorov rastu]. Vitamíny a aminokyseliny v médiu slúžia na údržbu *in vitro* regenerovaných rastlín. MS0 médium zodpovedá za klíčenie a vývoj regenerovanej novej rastliny plne schopnej sa rozmnožovať v pôde. Stimuluje sa tu rast koreňov, poprípade sa rastliny presadia do pôdy, kde sa korene vytvoria. Pre lepšiu rast koreňa a stonky môže byť do média pridaná kyselina gibberelová. V tejto fáze sa porovnávala miera klíčenia medzi maturačnými médiami (Mohammadi-Nasab et al., 2011; Sangra et al., 2019).

#### **2.2.1.5 Overenie účinnosti transformácie**

Pre potvrdenie transformácie na molekulárnej úrovni sa využíva opätovná tvorba kalusu (sekundárna embryogenéza) na selekčnom agente (kanamycín), Southern-blot

hybridizácia (použitím génovej próby markeru) alebo analýza polymerázovou reťazovou reakciou (PCR). PCR je uskutočnená pomocou špecifických primerov pre transgén alebo amplifikáciou selekčného markera viazaného na antibiotiká (*nptII*) (Liu et al., 2013; Saruul et al., 2002; Shao et al., 2000). Alternatívne môžu byť selekčné markery viazané na enzýmy (Gough et al., 2001). Transformované rastliny ďalej podstúpili skrining cielenej mutagenézy s použitím napríklad PacBio amplikonového sekvenačného testu na mutácie (Curtin et al., 2018, 2021).

V priemere zo 60 až 80 % naočkovaných explantátov vznikajú somatické embryá podstupujúce selekciu. Zvyčajne 80 až 100 % rastlín, ktoré sa z týchto embryí vyvinú, obsahujú T-DNA (Shao et al., 2000).

#### **2.2.1.6 Hodnotenie udržateľnosti somatickej embryogenézy**

Systém dlhodobej kontinuálnej somatickej embryogenézy bol identifikovaný na základe dĺžky zachovania embryogénneho potenciálu prostredníctvom subkultivačných cyklov. Po indukcii embryogénneho kalusu bol kalus subkultivovaný každých 18 dní na čerstvých B5H, MS a SH4K médiách. V rámci subkultivácie bolo 500 mg embryogénneho kalusu prenesené na B5, MS alebo BOi2Y médium. Vytvorené zrelé embryá na EDM médiách po 21 dňoch si udržali embryogénnosť. U kalusu B5H a MS2D bola tvorba embryí najvyššia po prvej subkultivácii. Kalus postupne strácal s každou subkultúrou embryogénny potenciál, hnedol a tvrdol a po štvrtej stratil úplne embryogénny potenciál a vznikla neembryogénna hmota kalusu (Sangra et al., 2019).

Konštantná embryogenéza udržateľného SH4K kalusu bola stanovená indukciou kalusu na SH4K médiu. Žiadne embryá sa nevytvorili, pokiaľ bol kalus udržiavaný na médiu SH4K, až po prenesení do BOi2Y média sa začali vyvíjať. Je to regeneračné médium na tvorbu a ďalší vývoj embryí, ktoré pozostáva z modifikovaných Blaydesových (Bingham et al., 1975) anorganických a organických zložiek, mezo-inozitolu a extraktu z kvasníc agaru Bacto. Počas subkultivačných cyklov (aj po štyroch následných) si zachoval svoj embryogénny potenciál bez významnej straty vo výťažku. SH4K kalus vykazoval minimálne hnednutie v subkultúrach a zachoval si svoju farbu a mäkkosť (Sangra et al., 2019).

Genetická transformácia lucerny môže byť inhibovaná zlou regeneráciou z pletivových kultúr a samotnou metódou transformácie. Potreba transformácie druhov,

ktoré nie sú citlivé na *Agrobacterium* a zbavenia sa závislosti na genotype, viedla k metódám priameho prenosu DNA na transfekciu lucerny bez zapojenia pletivových kultúr (Potrykus, 1991). Patrí sem napríklad časticové bombardovania kalusu (Pereira & Erickson, 1995) alebo elektroporácia (Kuchuk et al., 1990). Najnovšími *in planta* metódami stabilnej transformácie rastlín sú napríklad manipulácia s morfogénnymi génmi, transformácia pomocou semenáča, „floral dip“ (Kausch et al., 2019) alebo „cut dip budding“ (Cao et al., 2023).

### 2.2.2 Transformácia metódou elektroporácie

Elektroporácia umožňuje zavedenie cudzích molekúl DNA do veľkého množstva buniek, ak je DNA v priamom kontakte s membránou. Pre transformáciu rastlinných buniek týmto spôsobom je potrebné odstrániť bunkovú stenu, ktorá predstavuje bariéru pre difúziu makromolekúl (reportérových farbív, enzýmových substrátov, nukleových kyselín, protilátok alebo vírusov). v rastlinách sa elektroporácia používa predovšetkým pre stabilnú a prechodnú genetickú transformáciu (Bates, 1995). Použitie protoplastov sa ukázalo ako rýchla, jednoduchá a účinná metóda na expresiu špecifického cieľového génu bez použitia celej rastliny (Yoo et al., 2007).

Čerstvo izolované protoplasty (klíčne listy zo 7-8 -denných sadeníc) boli suspendované v elektroporačnom pufri -elektrolyte, obsahujúcom plazmidovú DNA. Zmes sa preniesla do elektroporačných kyviet s medzerou medzi elektródami (Quecini, 1999). Táto metóda priameho prenosu DNA závisí od typu použitého elektrického impulzu (Ozyigit, 2020). Výboj kondenzátora naprieč populáciami buniek vedie k prechodným otvorom v plazmaléme, ak je DNA v priamom kontakte s membránou (M. Fromm et al., 1987; M. E. Fromm et al., 1986; M. Fromm & Walbot, 1987; Shillito et al., 1985). Transformované bunky sa môžu regenerovať na transformované rastliny v závislosti od účinnosti regenerácie výhonkov (Quecini, 1999).

Protokol podľa Quecini et al. (2002) vykonaný na tropickej krmnej strukovine *Stylosanthes guianensis* je možné aplikovať aj na experimenty somatickej hybridizácie druhov *Medicago*, pričom sa uvádza dosiahnutie ešte vyššej účinnosti transformácie ako vysokoúčinným biolistickým prístupom (Quecini, 1999; Quecini et al., 2002). Získavame niekoľko chimérických jedincov z niekoľkých desiatok elektroporovaných rastlín, ktoré nám umožňujú identifikovať transgénných jedincov molekulárnou analýzou

bez potreby selekcie (Chowrira et al., 1995). Jednotlivé výhonky boli histochemicky testované (Jefferson et al., 1987) na expresiu  $\beta$ -glukuronidázy (GUS). Použila sa aj špecifická metóda polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) s amplifikáciou transgénov (Quecini, 1999). Quecini et al. 2002 testovali *in vivo* tranzientnú expresiu reportérového génu s použitím génu kódujúceho GFP *mgfp5* poháňaného konštitutívnym promótorom *CAMV35S*.

### 2.2.3 Transformácia metódou bombardovania časticami

Metóda bombardovania časticami, nazývaná aj biolistická metóda, opisuje prenos génov zrýchlenými mikročasticami (zvyčajne zlata alebo volfrámu) obalenými DNA. DNA sa integruje do každého typu buniek a tkanív stabilnou transformáciou viacnásobným zásahom na takmer ľubovoľnej požadovanej pozícii v rastline (Klein et al., 1988; Sanford, 1990). Účinnosť transformácie touto metódou sa môže medzi genotypmi rastlín značne líšiť (Du et al., 1994). Keďže prenos génov sa považuje za menej závislý od genotypu, mohlo by sa jednať o alternatívu pre rekalcitrantné genotypy (Christou, 1992). Kroky stabilnej transformácie prostredníctvom bombardovania časticami sú konštrukcia DNA, cieľového tkaniva, systému pletivových kultúr a selekčnej metódy (Birch & Franks, 1991; Christou, 1992).

Systém bombardovania má množstvo výhod z hľadiska uplatniteľnosti, pretože nevyžaduje výraznejšie manuálne úsilie, prenos génov sa môže uskutočniť naraz do mnohých buniek, dokonca aj v hlbších menej dostupných vrstvách orgánov, metóda je závislá iba od fyzikálnych parametrov, atď. Väčšina organizovaných tkanív môže byť bombardovaná, aj keď majú bunky tvrdú bunkovú stenu. Kapacita väčšiny tkanív lucerny na regeneráciu rastlín je však obmedzená a je potrebné zabezpečiť, aby tkanivo, ktoré sa má bombardovať, bolo vhodné pre embryogenézu *in vitro* (Potrykus, 1991). Technika bola dlhú dobu od zavedenia neefektívna pri poskytovaní stabilnej transformácie spojenej s integráciou do genómu, najmä v rutinne používaných transformačných systémov, napr. u embryogénnej suspenzie (D. E. Brown & Bingham, 1994; Goff et al., 1990).

Pereira & Erickson, (1995) v článku popisujú protokol pre stabilnú transformáciu kalusov odvodených z rezov stopky a stonky lucerny pomocou selekčného markera *nptII*. Všetky kontrolné a bombardované tkanivá podstúpili somatickú embryogenézu.

Kultivácia prebehla počas troch týždňov na SH médiu (Schenk & Hildebrandt, 1972), pre tvorbu suspenzie v kvapalnom médiu B5G (D. C. W. Brown & Atanassov, 1985) ďalších sedem dní a následnou selekciou s 50 mg/l kanamycínu na médiu BOi2Y (Bingham et al., 1975) pre vývoj embryí. Asi polovica embryí bola regenerovaná na potvrdené transgénne rastliny (Kikkert et al., 2005; Pereira & Erickson, 1995).

Biolistická metóda sa použila na produkciu transgénnych rastlín lucerny z transformovaných peľových zŕn prirodzeným procesom rozmnožovania rastlín. Metóda bola opísaná ako vysoko účinná, ale produkovala rastliny, ktoré nakoniec stratili svoj transgénny znak. Cudzí DNA sa postupne stratila opakovaným delením buniek a sexuálnym krížením. Začlenenie génu *GUS* do peľových zŕn bolo potvrdené analýzou PCR a Southern blotom (Ramaiah a Skinner, 1997).

Bombardovanie bolo vykonané aj na nezrelých embryách, čo v správnom médiu viedlo k polyembryogenéze (Buising a Tomes, 1995) alebo v chloroplastoch transformáciou s GFP (Wei et al., 2011). Dokázalo sa, že transgénne rastliny možno získať z väčšiny komerčných odrôd v uspokojivých množstvách.

## **2.3 ROP GTPázy**

### **2.3.1 Zaradenie**

Všetky malé proteíny viažuce guanínový nukleotid, teda malé monoméne GTPázy s molekulovou hmotnosťou v rozmedzí od 20 do 30 kDa, patria do nadrodiny Ras. Pomenovanie je odvodené od jej prvých členov kódovaných ľudskými Ras génmi pôvodne objavenými ako bunkové homológy vírusového *ras* onkogénu (Parada et al., 1982; Reiner, 2018; Wennerberg et al., 2005). V ich sekvencii musia byť prítomné motívy charakteristické pre jednotlivé rodiny a konzervované motívy (G box), ktoré spolu tvoria ~20 kDa G doménu, kde sa špecificky viažu a hydrolyzujú GTP. Dochádza tu k interakciám s efektorovými proteínmi a hypervariabilnými doménami, ktoré determinujú subcelulárne zacielenie (Bourne et al., 1991; Kahn et al., 1992; Vetter & Wittinghofer, 2001; Vigil et al., 2010). Biochemickou vlastnosťou nadrodiny Ras proteínov je ukončenie výlučne C-terminálnou tetrapeptidovou sekvenciou CAAX (C=Cys, A=alifatické, X = akákoľvek aminokyselina) (Cox & Der, 2002).



Nadrodina Ras sa skladá z piatich rodín: gén potkanieho sarkómu (Ras), Ras súvisiace s mozgom (Rab), ADP-ribosylačný faktor (Arf/Sar), Ras súvisiace s jadrom (Ran) a Ras homológy (Rho), ktoré sú rozšírené o mitochondriálne proteíny. Rab a Arf/Sar rodina GTPáz má funkciu v intracelulárnom vezikulárnom transporte. Ran sa podieľa na jadrovom transporte, zatiaľ čo GTPázy rodiny Ras a Rho regulujú prenos signálu z plazmatickej membrány. V zelených rastlinách (*Viridiplantae*) pravé Ras GTPázy neboli pozorované, i keď je po nich táto nadrodina pomenovaná (Toma-Fukai & Shimizu, 2019; Vernoud et al., 2003). Funkcie Ras GTPáz regulovaných G proteínom a spojených s vedúcou reguláciou prenosu signálu prebrala v rastlinách rodina Rho proteínov (Berken, 2006; Vernoud et al., 2003; Z. Yang, 2002).

Rodinu Rho možno ďalej organizovať do samostatných tried podľa špecifických signalizačných funkcií (Jaffe & Hall, 2005; Kjøller & Hall, 1999; Wherlock & Mellor, 2002). U eukaryotov výskum Rho GTPáz venuje najväčšiu pozornosť funkčnému popisu tried Rho, Rac a Cdc42 (Jaffe & Hall, 2005). Členovia týchto tried regulujú reorganizáciu a tvorbu vlákien cytoskeletu, lamelipódií alebo filopódií. Z procesov v bunke sa podieľajú na bunkovom cykle, morfogénéze spojenej s bunkovou polaritou, interakciami bunka-bunka a bunka-matrica, endo- a exocytózu a génovú expresiu. Vyskytujú sa u zvierat a húb, avšak nie sú prítomné v rastlinách (Boureaux et al., 2007; Ridley, 2001; Vernoud et al., 2003; Winge et al., 1997, 2000),

### **2.3.2 ROP štruktúra a charakteristika**

Rastliny majú jedinečnú triedu GTPáz typu Rho, ktorá sa podľa dnešnej prevládajúcej nomenklatúry označuje ako „Rho rastlín“ (Rho-príbuzná GTPáza rastlín alebo skratkou ROP). Jej členovia sa štruktúrne odlišujú od proteínov Rho iných eukaryotov a neboli pozorované žiadne jasné homológy ku nim (Toma-Fukai & Shimizu, 2019; Vernoud et al., 2003; Yang et al., 2002; Zheng & Yang, 2000) Fylogenetické analýzy ukázali, že ROP sa objavili evolučne pred diverzifikáciou podrodín RAC a Cdc42, preto kombinujú ich funkcie s funkciami iných Rho proteínov (Berken et al., 2005; Berken & Wittinghofer, 2008).

ROP/RAC GTPázy majú molekulovú hmotnosť v rozmedzí od 21 do 24 kD a sú zložené z približne 200 aminokyselín. Ich jadro tvorí šesť  $\beta$ -listov spojených piatimi slučkami so štyrmi  $\alpha$ -helixmi. Slučky obsahujú päť vysokokonzervovaných motívov G-boxu (G1–

G5) a rovnako ako GTP-viažuci motív nesú aminokyselinové substitúcie zodpovedné za väzbu s GTP/Mg<sup>2+</sup> a hydrolyzu GTP (Berken & Wittinghofer, 2008; Bourne et al., 1991; Sørmo et al., 2006; Thomas et al., 2007; Vetter & Wittinghofer, 2001)

Rozdiel napríklad s ľudským Rac1 génom okrem týchto substitúcií je v tzv. „oblasti inzertu“ exponovanej slučky zodpovedajúcej rezíduám 124-135. V tomto mieste majú ROP deléciu dvoch až štyroch aminokyselín v porovnaní so zvieracími Rho GTPázami (Brembu et al., 2006; Winge et al., 1997)

Postranslačné modifikácie (PTM) v sekvenciách týchto proteínov, konkrétne proteínové lipidácie, regulujú funkcie cielených proteínov pri signalizácii v reakcii na vonkajšie a vnútorné podnety. PTM sú uskutočnené zvýšením väzbovej afinity proteínov k biologickým membránam, zmenou ich subcelulárnych lokalizácií, schopnosti skladať sa, stability a asociácie s inými proteínmi (B. Chen et al., 2018).

Na základe rôznych aminokyselinových sekvencií na polybazickej hypervariabilnej doméne, ktorá sa u všetkých členov ROP/RAC GTPáz nachádza na C-terminálnom konci, boli RAC/ROP rozdelené do dvoch podskupín označených ako typ I a typ II (Bourne et al., 1991; Schiene et al., 2000; Winge et al., 2000).

ROP typu I majú hypervariabilnú doménu tvorenú z konzervovaného geranylgeranylovaného motívu CaaL boxu. Pripojenie k membráne je zabezpečené prenyláciou CaaL geranylgeranyltransferázou-I a polybazickými doménami (Sorek et al., 2007, 2011). Prenylované cysteíny sú súčasťou konzervovaného motívu C-terminálnej sekvencie označeného ako CAAX box. Dochádza tu k jeho proteolýze a metylácii v endoplazmatickom retikule (ER) (Bracha-Drori et al., 2008; B. K. Nelson et al., 2007; Schmidt et al., 1998).

ROP typu II končia motívom GC-CG boxu, preto na hypervariabilnej doméne neobsahujú konzervovaný geranylgeranylovaný CaaL motív. Usmernenie pripojenia membrány je zabezpečené S-acyláciou na dvoch alebo troch C-koncových cysteínoch. Keďže C-konce sú palmitoylované nie prenylované, je pravdepodobné, že ROP typu II nie sú regulované RhoGDI, keďže maskujú modifikáciu prenylu a podporujú cytosolovú sekvestráciu týchto GTPáz (M. C. Seabra & Wasmeier, 2004). (Ivanchenko et al., 2000; Lavy et al., 2002; Lavy & Yalovsky, 2006). V dôsledku toho by ROP typu II mohli mať

extrémnejšie rozdiely v chemických vlastnostiach aktívnych a neaktívnych GTPáz domén (Deinum & Jacobs, 2024).

ROP typu I majú živočíšne a hubové ortology, zatiaľ čo ROP typu II sú špecifické pre rastliny. Rodina ROP v modelovej rastline *Arabidopsis* pozostáva z 11 členov (Winge et al., 2000). Modelová rastlina *A. thaliana* má osem ROP typu I (AtROP1–AtROP8) a tri typu II (AtROP9, 10, a 11) (Fowler, 2010). *Medicago truncatula* má síce takmer identické zaradenie homológov, ale počty ROP a pomer medzi typom I a II sa v rámci rastlinnej ríše podstatne líšia (Liu et al., 2010).

### 2.3.3 Cyklus

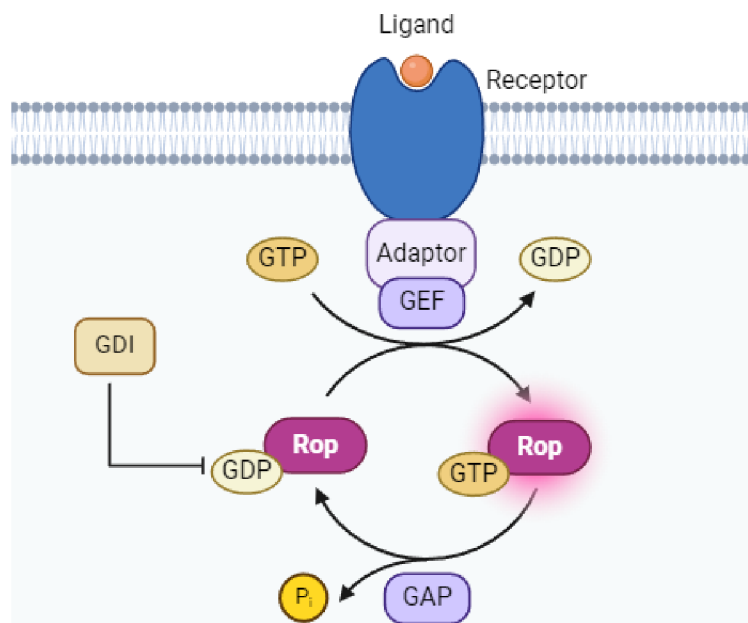
Malý monométny cyklus GTPázy nastáva v bunke medzi neaktívnymi stavmi viazanými na GDP a aktívnymi stavmi viazanými na GTP (Obr. 1) (Bourne et al., 1991; Vetter & Wittinghofer, 2001). V aktívnom stave sa proteín GTPázy môže viazať na efektorové proteíny a regulovať tak rôzne bunkové procesy (Aslani borj et al., 2022). Táto interakcia môže rôznymi spôsobmi regulovať aktivitu komponentov signálnych dráh, ako je zmena ich konformácie, aby sa umožnila väzba substrátov, uvoľňovanie alebo indukcia autoinhibičných stavov alebo nábor týchto proteínov na špecifické subcelulárne miesto, cieľové viacnásobné efekторы. ovplyvňujúce rôzne systémy odozvy v cytoplazme, vrátane  $\text{Ca}^{2+}$ , ROS, aktínu, mikrotubulov a dynamiky vezikulárneho transportu, čo sú základné zložky bunkových aktivít (Berken, 2006; Y. Fu et al., 2005; Gu et al., 2005).

Tento cyklus GTPázy je prísne regulovaný tromi typmi regulátorov. ROP guanínové nukleotidové výmenné faktory (RopGEF) po naviazaní katalyzujú výmenu GDP za GTP a aktivujú proteín, ktorý vyvoláva downstream signalizácie (Gu et al., 2005).

Druhá skupina regulačných proteínov sú ROP disociačné inhibítory guanínových nukleotidov (RopGDI), ktoré inhibujú výmenu GDP/GTP a uľahčujú cyklovanie Rho GTPáz na membránach a mimo nich (Borg et al., 1999; DerMardirossian & Bokoch, 2005; H. Li et al., 1998). GDI odstraňuje ROP viazané na neaktívne GDP z membrány a stabilizuje ich v cytoplazme až do ich reaktívácie GEF (Boulter & Garcia-Mata, 2010). V cytosole maskujú ich lipidové PTM, aby neboli aktivované (Zheng & Yang, 2000). Predpokladá sa, že recyklácia vyvolaná RhoGDI udržiava Rho proteíny v odlišných

doménach plazmatickej membrány a hrá zásadnú úlohu pri vytváraní a udržiavaní polarity buniek.

GTPázu aktivujúce proteíny (GAP) vypínajú proteín poskytnutím esenciálnych aminokyselín do domény s naviazaným GTP, ktorý sa vďaka nim dramaticky rýchlejšie hydrolyzuje na GDP + Pi. Všetky doteraz identifikované RopGAP majú jedinečnú N-terminálnu Cdc42/Rac-interagujúcu väzobnú (CRIB) doménu, ktorá reguluje ich aktivitu (Borg et al., 1999; H. Li et al., 1998; Zheng & Yang, 2000). Mutácie vo vysoko konzervovaných GTPase doménach vedú k proteínom, ktoré sú konštitutívne aktívne (CA), konštitutívne neaktívne alebo dominantne negatívne (DN) (D. Lin et al., 2012; Zheng & Yang, 2000).



Obrázok 1: Cyklus ROP GTPáz. Upravené podľa Purves et al. (2018) Neuroscience. 6th Ed. Oxford University Press pomocou softvéru BioRender

Signálne siete ROP pôsobia v širokej škále signálov proti prúdu a vyvolávajú následné signalizačné kaskády na moduláciu vývojových procesov, ako je rast peľových trubíc (Qin & Yang, 2011), vývoj koreňových vláskov (RH) (Jones et al., 2002; Molendijk, 2001), stanovenie bunkovej polarity (D. Lin et al., 2012), morfogéza buniek (Y. Fu et al., 2005), dynamiku cytoskeletu (Y. Fu et al., 2009; Kawashima et al., 2014b) receptor-podobné kinázy (Duan et al., 2010), obrana pred patogénmi (Poraty-Gavra et al., 2013), hormonálna signalizácia (auxín kyselina abscisová) (X. Li et al., 2017; Z. Li et al., 2012;

Schepetilnikov et al., 2017; Xu et al., 2014), prenos transportných vezikul (X. Chen et al., 2012).

### 3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

#### 3.1 Materiál

##### 3.1.1 Bakteriálny materiál

- *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90 chemicky kompetentné bunky
- *Escherichia coli* One Shot™ TOP10 chemicky kompetentné bunky

##### 3.1.2 Rastlinný materiál

- *Nicotiana benthamiana* L.
- Lucerna siata (*M. sativa* L.) kultivar (cv.) Regen-SY (RSY)

Rastlinný materiál bol kultivovaný v kultivačnej miestnosti s konštantnými nastaveniami teploty 21 °C, 71 % vlhkosti, intenzity osvetlenia  $80 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , svetelným cyklom 16 hodín svetlo/ 8 hodín tma. Rastliny v podmienkach *in vitro* boli kultivované na živných médiách v Petriho miskách. Rastliny v podmienkach *ex vitro* boli pestované v kvetináčoch s pôdnym substrátom s perlitom.

##### 3.1.3 Použité plazmidy pre Multisite Gateway® klonovací systém

Pre prípravu fúzneho konštruktu trojkomponentovým Multisite Gateway® vektorovým konštrukčným kitom ako zvoleným klonovacím systémom boli použité donorové plazmidy: ako destinačný vektor bol použitý pB7m34GW,0 so spektinomycínovou (Spe<sup>R</sup>) rezistenciou pre baktérie a fosfotricínovou (Ppt<sup>R</sup>) rezistenciou pre selekciu v rastlinách kódujúci konštrukt *35S::GFP:ROP8*. Vstupné vektory, ktoré boli súčasťou rekombinačných reakcií pre jeho skonštruovanie navrhnuté podľa (Karimi et al., 2007): pEN-L4-2R1™ plazmid nesúci *p35S* sekvenciu, pEN-L1-F-L2™ nesúci *eGFP* sekvenciu and pDONR™P2R-P3 kódujúci *ROP8* cDNA sekvenciu (<https://www.thermofisher.com>).

##### 3.1.4 Chemikálie

**Alfa Aesar/ Thermo Fisher Scientific:** Gellan Gum

**Bio-Rad Laboratories:** iProof™ High-Fidelity DNA polymeráza

**Duchefa Biochemie:** 1000x Gamborg vitamíny, 1000x Nitsch & Nitsch vitamíny, ampicilín, fosfinitricín, Gamborg B5 základná zmes solí, kinetín, kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová (2,4-D), Murashige & Skoog základná zmes solí, myoinozitol, rifampicín, spektinomycín, tikarcilín

**Thermo Fisher Scientific:** 6x DNA Loading Dye, 10X FastDigest™ BufferdNTP Mix 2 mmol·l<sup>-1</sup>, *ApaI* (restrikčná endonukleáza), Gateway® BP Clonase II Enzyme mix, Gateway® LR Clonase II Enzyme mix, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Phire Hot Start II DNA Polymeráza, Proteínkináza K, *PstI* (restrikčná endonukleáza)

**Nippon Genetics:** Midori Green Advance

**Sigma Aldrich:** 2(*N*-morfolino)etánsulfónová kyselina (MES), 1000X Schenk & Hildebrant vitamíny, adenín, agaróza, dodecylsulfát sodný, dusičnan draselný (KNO<sub>3</sub>), etanol, etylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA), glukóza, glutamín, glycerol, heptahydrát síranu horečnatého (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), hovädzi sérový albumín (BSA), hydroxid sodný (NaOH), hypochlorid sodný (NaClO), chlorid draselný (KCl), chlorid horečnatý (MgCl<sub>2</sub>), chlorid sodný (NaCl), chlorid vápenatý (CaCl<sub>2</sub>) kvasničný extrakt, kyselina octová, L-glutatión, Luria Bertani (LB) Broth (Miller), LB Broth s agarom (Miller), metanol, Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O, octan draselný, prolín, sacharóza, Schenk & Hildebrant základná zmes solí, serín, trypton, Tris(hydroxymetyl)amino-metán, Tris-hydrochlorid, Tween-20

### 3.1.5 Kultivačné média

#### Kokultivačné médium

10 mmol·l <sup>-1</sup>	MgCl <sub>2</sub> (pH 5,6)
10 mmol·l <sup>-1</sup>	MES
0,15 mmol·l <sup>-1</sup>	acetosyryngón

#### Luria Bertani (LB) pevné médium

40 g·l <sup>-1</sup>	LB médium s agarom
	milliQ H <sub>2</sub> O
	sterilizácia autoklávovaním

### **Luria Bertani (LB) tekuté médium**

25 g·l <sup>-1</sup>	LB Broth
	milliQ H <sub>2</sub> O
	pH 7,2, sterilizované autoklávaním

### **B5H médium**

3,1 g·l <sup>-1</sup>	Gamborg B5 základná zmes solí
0,5 g·l <sup>-1</sup>	KNO <sub>3</sub>
0,25 g·l <sup>-1</sup>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
0,5 g·l <sup>-1</sup>	prolín
30 g·l <sup>-1</sup>	sacharóza
4,5 g·l <sup>-1</sup>	Gellan Gum
1 ml·l <sup>-1</sup>	1000x Gamborg vitamíny (pridáva sa po autoklávaní)
30 ml·l <sup>-1</sup>	roztok aminokyselín (pridáva sa po autoklávaní)
1 mg·l <sup>-1</sup>	2,4-D (pridáva sa po autoklávaní)
0,1 mg·l <sup>-1</sup>	kinetín (pridáva sa po autoklávaní)
	milliQ H <sub>2</sub> O
	pH 5,7; sterilizované autoklávaním

### **B5H médium + antibiotiká**

3,1 g·l <sup>-1</sup>	Gamborg B5 základná zmes solí
0,5 g·l <sup>-1</sup>	KNO <sub>3</sub>
0,25 g·l <sup>-1</sup>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
0,5 g·l <sup>-1</sup>	prolín
30 g·l <sup>-1</sup>	sacharóza
4,5 g·l <sup>-1</sup>	Gellan Gum
1 ml·l <sup>-1</sup>	1000x Gamborg vitamíny (pridáva sa po autoklávaní)
30 ml·l <sup>-1</sup>	roztok aminokyselín (pridáva sa po autoklávaní)
1 mg·l <sup>-1</sup>	2,4-D (pridáva sa po autoklávaní)

0,1 mg·l <sup>-1</sup>	kinetín (pridáva sa po autoklávovaní)
15 mg·l <sup>-1</sup>	Fosfínotricín (pridáva sa po autoklávovaní)
500 mg·l <sup>-1</sup>	tikarcilín
	milliQ H <sub>2</sub> O
	pH 5,7; sterilizované autoklávovaním

### **B50 médium**

3,1 g·l <sup>-1</sup>	Gamborg B5 základná zmes solí
0,5 g·l <sup>-1</sup>	KNO <sub>3</sub>
0,25 g·l <sup>-1</sup>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
0,5 g·l <sup>-1</sup>	prolín
30 g·l <sup>-1</sup>	sacharóza
4,5 g·l <sup>-1</sup>	Gellan Gum
1 ml·l <sup>-1</sup>	1000x Gamborg vitamíny (pridáva sa po autoklávovaní)
30 ml·l <sup>-1</sup>	roztok aminokyselín (pridáva sa po autoklávovaní)
	milliQ H <sub>2</sub> O
	pH 5,7; sterilizované autoklávovaním

### **B50 médium + antibiotiká**

3,1 g·l <sup>-1</sup>	Gamborg B5 základná zmes solí
0,5 g·l <sup>-1</sup>	KNO <sub>3</sub>
0,25 g·l <sup>-1</sup>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
0,5 g·l <sup>-1</sup>	prolín
30 g·l <sup>-1</sup>	sacharóza
4,5 g·l <sup>-1</sup>	Gellan Gum
1 ml·l <sup>-1</sup>	1000x Gamborg vitamíny (pridáva sa po autoklávovaní)
30 ml·l <sup>-1</sup>	roztok aminokyselín (pridáva sa po autoklávovaní)
15 mg·l <sup>-1</sup>	fosfínotricín (pridáva sa po autoklávovaní)
500 mg·l <sup>-1</sup>	tikarcilín (pridáva sa po autoklávovaní)



milliQ H<sub>2</sub>O

pH 5,7; sterilizované autoklávaním

#### **MMS médium + antibiotiká**

4,3 g·l <sup>-1</sup>	Murashige & Skoog základná zmes solí
30 g·l <sup>-1</sup>	sacharóza
0,1 g·l <sup>-1</sup>	myoinozitol
4,5 g·l <sup>-1</sup>	Gellan Gum
1 ml·l <sup>-1</sup>	1000x Nitsch & Nitsch vitamíny (pridáva sa po autoklávaní)
15 mg·l <sup>-1</sup>	fosfinitricín (pridáva sa po autoklávaní)
500 mg·l <sup>-1</sup>	tikarcilín (pridáva sa po autoklávaní)
	milliQ H <sub>2</sub> O
	pH 5,7; sterilizované autoklávaním

#### **SH médium**

3,2 g·l <sup>-1</sup>	Schenk & Hildebrant základná zmes solí
1 ml·l <sup>-1</sup>	1000X Schenk & Hildebrant vitamíny (pridáva sa po autoklávaní)
30 g·l <sup>-1</sup>	sacharóza
0,5 g·l <sup>-1</sup>	2( <i>N</i> -morfolino)etánsulfónová kyselina (MES)
	milliQ voda
	pH 5,7; sterilizované autoklávaním

#### **SOC médium**

5 g·l <sup>-1</sup>	kvasničný extrakt
20 g·l <sup>-1</sup>	trypton
0,584 g·l <sup>-1</sup>	NaCl
0,186 g·l <sup>-1</sup>	KCl
3,6 g·l <sup>-1</sup>	glukóza
0,952 g·l <sup>-1</sup>	MgCl <sub>2</sub>

milliQ H<sub>2</sub>O  
pH 7,5; sterilizované autoklávovaním

### 3.1.6 Roztoky a pufry

#### TE pufoer

10 mmol·l <sup>-1</sup>	Tris-HCl pH 8,0
0,1 mmol·l <sup>-1</sup>	EDTA

milliQ voda; sterilizované autoklávovaním

#### Roztok spektinomycínu

0,5 g µl	spektinomycín
5 ml	milliQ H <sub>2</sub> O

sterilizácia cez bakteriologický filter

#### Roztok rifampicínu

0,25 g	rifampicín
5 ml	metanol

sterilizácia cez bakteriologický filter

#### Roztok fosfinotricínu

0,25 g	fosfinotricín
5 ml	milliQ voda

sterilizácia cez bakteriologický filter

#### Roztok kinetínu

1 mg	kinetín
20 µl	1 mol·l <sup>-1</sup> NaOH
10 ml	milliQ voda

sterilizácia cez bakteriologický filter

#### Roztok aminokyselín

6,65 g	glutamín
0,004 g	adenín
0,83 g	serín

0,083 g	L-glutatión
250 ml	milliQ voda
	sterilizácia cez bakteriologický filter

**2,4-D roztok**

10 mg	2,4-D
150 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH
50 $\mu\text{l}$	etanol
10 ml	milliQ voda
	sterilizácia cez bakteriologický filter

**EDTA (0,5  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  zásobný roztok)**

18,61 g	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
80 ml	milliQ voda
	pH 8,0

**50x koncentrovaný TAE (Tris-Acetát EDTA) pufor**

121 g	Tris
28,55 ml	kyselina octová
50 ml	0,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA
421,45 ml	milliQ voda
	pH 8,0

**1x koncentrovaný TAE pufor**

20 ml	50x TAE pufor
980 ml	ddH <sub>2</sub> O

**1 % agarózový gél**

1 g	agaróza
100 ml	1x TAE pufor

### 3.1.7 Prístrojové vybavenie a komerčné kity

Analytické váhy XA110/2X (RADWAG Váhy s.r.o.; Česko), autokláv STERIVAP® HP IL (MMM Group; Nemecko), automatické pipety (Eppendorf; Nemecko), centrifúga Allegra 64 R (Beckman Coulter; USA), centrifúga ROTANTA 460R (Scholler Instruments; Česko), centrifúga Scan Speed 1730 MR (Scala Scientific; Holandsko), elektroforetická vaňa so zdrojom (Bio-Rad; USA), elektromagnetická miešačka MSH-420 (Boeco; Nemecko), GeneJET Gel Extraction Kit™ (Thermo Fisher Scientific; USA), inkubátor s nastaviteľnou teplotou (Verkon; Česko), Inkubátor IN55 (Mettler; Nemecko), konfokálny laserový skenovací mikroskop LSM880 vybavený Airyskenom (Carl Zeiss; Nemecko), kultivačná komora (Weiss Gallenkamp; Nemecko), laboratórne predvážky S1502 (BEL-Engineering; Taliansko), laminárny box Biohazard M 1200 (Merci; Česko), Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up (Thermo Fisher Scientific; USA), mikrocentrifúga MyFuge™ (Benchmark Scientific; USA), NanoDrop (Thermo Fisher Scientific; USA), orbitálna inkubovaná trepačka ES-20 (Biosan; Lotyšsko), PCR termocyklér MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad; USA), PCR termocyklér T100 Thermal Cycler (Bio-Rad; USA), pH meter stolný PC 2700 (Eurotech Instruments; Singapur), prístroj na deionizovanú vodu Simplicity Water Purification System (Merck Milipore; USA), QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN; Nemecko), spektrofotometer SmartSpec™ plus (Bio-Rad; USA), teplotný sterilizátor Solaris (Schuett-biotec; Nemecko), termoblok ThermoStat™ C (Eppendorf; Nemecko), trepačka Mr-12 Rocker-Shaker (Biosan; Lotyšsko), UV transiluminátor (Bio-Rad; USA), UV vizualizátor Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad; USA), vortex Micro-Spin FV2400 (Labnet; USA).

### 3.1.8 Software

ApE - A plasmid Editor, Image Lab™ (Bio-Rad; USA), Microsoft 365, SnapGene (Insightful Science; USA), SnapGene Viewer (Insightful Science; USA); Zeiss Zen 3.5 (blue edition, Nemecko)

## 3.2 Metodický postup pri príprave vektorov pre klonovanie fúzneho proteínu

### 3.2.1 PCR reakcia s *attB* primermi

Metóda PCR bola použitá pri amplifikácii úseku cDNA génu *Rop8* a iných PCR produktov v priebehu klonovania. Pomocou návodu pre MultiSite Gateway<sup>®</sup> trojfragmentový vektorový konštrukčný kit boli navrhnuté špecifické *att* primery na základe získanej cDNA *ROP8* z referenčnej databázy lucerny siatej, kultivaru XinJianDaYe (MS.gene055764.t1; Chen et al., 2020). Na 5' konci začínali štyrmi guanínovými rezíduami, ďalej ich tvorila ich 22 alebo 25 párov báz (bp) dlhá sekvencia *attB* špecifických miest a nasledovala 18-25 bp dlhá sekvencia templátovej cDNA. Pri rekombinačnej reakcii sú pre vznik PCR produktu nevyhnutné ohraničenia týmito *att* rekombinačnými miestami. Pre zachovanie správneho čítacieho rámca bol použitý primer so STOP kodónom. Sekvencie priameho a spätného primeru sú zobrazené v (Tab. 1). Teplota topenia primerov ( $T_m$ ) rovnako ako celá reakcia bola overená programom SnapGene. Zloženie reakčnej zmesi je podrobne rozpísané nižšie (Tab. 2). Pre túto reakciu bol zvolený program na termocykléri pre jednotlivé fázy PCR reakcie (Tab. 3) s iProof<sup>™</sup> High-Fidelity DNA polymerázou (Cat#1725301; Bio-Rad). Bol pripravený master mix, ktorého objem zodpovedal pre jednotlivé zložky ich objemom vynásobeným ich počtom + 1. Ako negatívna kontrola bola použitá PCR H<sub>2</sub>O.

Tab. 1: primery použité v PCR reakcii

Názov primeru	Sekvencia primerov 5' - 3'
ROP8 for (priamy) primer	5'-GGGG ACA GCT TTC TTG TAC AAA GTG GTA CAGCAAGATTCATCAA
ROP8 rev (spätný) primer	5'-GGGG AC AAC TTT GTA TAA TAA AGT TGA TCATTAAAGGAAAATACATGA

Tab. 2: PCR reakčná zmes pre amplifikáciu génu

Použité chemikálie	Množstvo
PCR voda	32,5 µl
5x iProof™ HF Buffer (pufor)	10 µl
2 mmol·l <sup>-1</sup> dNTP Mix	1 µl
10 µl/10 mmol·l <sup>-1</sup> priamy (For) primer	2,5 µl
10 µl/ 10 mmol·l <sup>-1</sup> spätný (Rev) primer	2,5 µl
iProof™ High-Fidelity DNA polymeráza	0,5 µl
DNA templát	1 µl
<b>Celkové množstvo reakcie</b>	<b>50 µl</b>

Tab. 3: Nastavenie programu PCR reakcie pre iProof™ High-Fidelity DNA polymerázu

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklov
Vstupná denaturácia	98 °C	30	1
Denaturácia	98 °C	10 s	
Nasadenie primerov	57 °C	30 s	28
Elongácia	72 °C	30 s.	
Finálna elongácia	72 °C	10 min.	1
Schladenie	4 °C	∞	-

### 3.2.2 DNA agarózová elektroforéza

PCR reakciou amplifikovaná sekvencia génu so STOP kodónom (*Rop8\_Sk*) bola overená pomocou DNA agarózovej elektroforézy. Metóda agarózovej elektroforézy slúžila pre rôzne analýzy, ale v jednoduchosti bola využívaná na kontrolu PCR produktov. V závislosti od potrieb experimentu bola rôzne prispôbená iba doba priebehu a veľkosť napätia u konkrétne vykonávanej metódy.

Pre prípravu agarózového gélu bol do 250 ml Erlemayerovej banky pridaný navážený 1 g agarózy spolu s 100 ml 1x TAE pufru. Roztok bol zahriaty približne 2,5 min. do úplnej homogenizácie rozpustením agarózy v mikrovlnnej rúre a schladený v nádobe s vodou. Pre vizualizáciu DNA v géli bol pridaný 1 µl fluorescenčného farbiva Midori Green Advance DNA Stain a mierne vychladnutý tekutý gél bol naliaty do elektroforetickej vaničky. Pred stuhnutím bol do gélu založený hrebeň pre vytvorenie jamiek na nanášanie vzorky. Po približne 20 min. bol gél stuhnutý a prenesený do elektroforetickej vaničky naplnenej 1x TAE pufrom. Ku každej vzorke bolo pridaných

10  $\mu$ l 6x Loading Dye (nanášací pufor) a po odstránení hrebeňa boli vzorky nanesené do jamiek gélu. Ako marker molekulovej hmotnosti slúžili 2  $\mu$ l GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder. Vaňa bola uzatvorená od vonkajšieho okolia a pripojená ku zdroju. Bolo nastavené konštantné napätie 80 V, prípadne elektrický prúd 400 mA po dobu 40 min alebo odlišná doba v závislosti od nastavenia potrieb experimentu. Po rozdelení vzoriek bol gél vyvolaný v prístroji Gel Doc™ EZ Imager, a následne prebehlo vyhodnotenie v programe ImageLab.

### **3.2.3 Vyrezanie PCR produktu z agarózového gélu a purifikácia DNA**

DNA extrakcia z agarózového gélu bola prevedená pomocou komerčného kitu GeneJET Gel Extraction Kit™. Za použitia transiluminátoru bol skalpelom vyrezaný pás gélu o určitej požadovanej veľkosti. Výrez bol prenesený do predom odváženej 2 ml plastovej skúmavky Eppendorf a následne bola zvážená jej hmotnosť aj s obsahom. Objem väzobného „Binding“ pufu z kitu bol odvodený z pomeru 1:1 k naváženej hmotnosti gélu. V tomto prípade bol vypočítaný objem 200  $\mu$ l pufu ku 200 mg gélu. Prebehla inkubácia pri 50 °C v termobloku, pokiaľ nebol agarózový gél úplne rozpustený. Prevrátením dna naopak a krátkym miešaním na vortexe došlo k rýchlejšiemu rozpusteniu obsahu skúmavky. 800  $\mu$ l roztoku gélu bolo nanesených na GeneJET purifikačnú kolónu s membránou oxidu kremičitého navrhnutou pre záchyt DNA. Obsah kolónky bol následne scentrifugovaný pri 11 000 g, 1 min. pri izbovej teplote. Supernatant bol odstránený a kolónka vrátená späť do zbernej skúmavky. Tento krok bol zopakovaný ešte dvakrát. Na purifikačnú kolónku bolo napipetovaných 700  $\mu$ l premývacieho „Wash“ pufu NT3 a prebehla následná centrifugácia pri 11 000 g po dobu 1 min. pri izbovej teplote. Podobne ako pri predchádzajúcej centrifugácii, bola odstránená nenaviazaná tekutá zložka a kolónka bola umiestnená späť do zbernej skúmavky. Po premytí pre úplné odstránenie zostatkového premývacieho pufu bola kolónka vysušená 3 min. centrifugáciou pri izbovej teplote a 11 000 g. GeneJET kolónka bola premiestnená do 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky. Na stred kolónky bolo nanesených 20  $\mu$ l milliQ vody a prebehla opakovaná rýchla 1 min. centrifugácia s odstránením supernatantu. Obsah skúmavky po druhom premytí nebol odstránený,

pretože obsahoval purifikovanú dvojlákovú DNA (PCR produkt), s ktorou po nameraní vhodnej koncentrácie na NanoDrope bolo možné pracovať.

### 3.2.4 BP rekombinačná reakcia

BP rekombinačná reakcia prebehla medzi fragmentom DNA ohraničenom *attB* miestami a príslušným donorovým vektorom obsahujúcim *attP* miesta na vytvorenie vstupného klonu.

Do 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky boli pri izbovej teplote pridané komponenty reakčnej zmesi (Tab. 4). K vyššie uvedeným komponentom v reakčnej zmesi boli pridané 2  $\mu$ l rozmrazenej BP Clonase<sup>®</sup> II a bolo nutné precízne premiešanie na vortexe. Reakcia bola inkubovaná pri teplote 25 °C počas noci. Následne bol pridaný 1  $\mu$ l roztoku proteínázy K, ktorý bol ponechaný na inkubáciu pri teplote 37 °C 10 minút.

Tab. 4: Komponenty BP rekombinačnej reakcie

Použité chemikálie	Množstvo
<i>attB</i> PCR produkt (50 fmólov)	5,2 $\mu$ l
BP Clonase <sup>®</sup> II	2 $\mu$ l
pDONR <sup>™</sup> vektor (150 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
TE pufor, pH 8.0	1,8 $\mu$ l
<b>Celkové množstvo reakcie</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>

### 3.2.5 Transformácia do TOP10 chemokompetentných buniek

K 50  $\mu$ l chemokompetentných buniek *E. coli* kmeňa TOP10 bolo pridaných 5  $\mu$ l produktu BP reakcie. Pre narušenie bunkových stien baktérií prebehla inkubácia 50  $\mu$ l baktérií v skúmavke na ľade po dobu 30 minút a následne boli vystavené 50 sekúnd teplote 42 °C. V následnosti na to boli ihneď prenesené na ľad. Do skúmavky bolo pridaných 250  $\mu$ l SOC média. V ďalšom kroku sa uzavreté skúmavky nechali inkubovať 1,5 hodiny pri teplote 37 °C vo vodorovnej polohe na inkubovanej trepačke za stáleho miešania pri 200 RPM. Na dve Petriho misky so stuhnutými 20 ml LB média, do ktorých bolo pridaných 20  $\mu$ l selekčného antibiotika kanamycínu (Kan<sup>R</sup>), bolo nanosených 150



μl bakteriálnej kultúry, ktorá bola rozotretá pomocou sterilných plastových hokejok. Takto naočkované LB média boli inkubované cez noc pri 37 °C.

### 3.2.6 Metóda Colony PCR

Metóda colony PCR slúžila na overenie účinnosti transformácie do chemokompetentných buniek baktérií *E. coli*. Na získanie templátovej DNA pre overenie vstupného vektoru *Rop8\_P2R-P3* v tejto reakcii boli využité narastené kolónie na pevnom selekčnom LB médiu.

V laminárnom boxe bola rozliata sterilná voda po 10 μl do 6 mikroskúmaviek určených pre PCR reakciu. Do každej zvlášť bola vložená sterilná špička pipety. V laminárnom boxe boli špičkami sterom z povrchu média prenesené vzorky každej zo 6tich vybraných kolónií priamo do PCR vody a spoločne premiešané. Každá bakteriálna kolónia z LB média predstavovala templátovú DNA pre PCR reakciu.

Pre samotnú PCR bol pripravený do spoločnej skúmavky tzv. master mix. V následnosti bol do každej mikroskúmavky napipetovaný 1 μl pDNA z kolónií a 9 μl z pripraveného PCR mixu doplnením do výsledného objemu 10 μl (Tab. 5). Pre amplifikáciu úseku s inzertom bol využitý M13 priamy a spätný primer (M13\_Fw – GTAAAACGACGGCCAG; M13\_Rev – CAGGAAACAGCTATGAC) a nastavený program (Tab. 6) s DNA polymerázou (Cat#01-02-00500; Solis BioDyne OÜ). Obidva primery nasadajú na konkrétnu sekvenciu vo vstupnom vektore, vďaka čomu je možné porovnať molekulovú veľkosť PCR produktu s teoretickou hodnotou v *in silico* vektore. PCR produkt bol následne overený pomocou 1 % DNA agarózovej elektroforézy.

Tab. 5: Zloženie PCR reakčnej zmesi

Použité chemikálie	Množstvo
PCR voda	4,6 $\mu\text{l}$
5xBuffer (pufor)	2 $\mu\text{l}$
2 mmol $\cdot\text{l}^{-1}$ dNTP Mix	0,2 $\mu\text{l}$
10 mmol $\cdot\text{l}^{-1}$ M13 priamy primer	1 $\mu\text{l}$
10 mmol $\cdot\text{l}^{-1}$ M13 spätný primer	1 $\mu\text{l}$
HOT FIREPol <sup>®</sup> DNA polymeráza	0,2 $\mu\text{l}$
Templátová DNA	1 $\mu\text{l}$
<b>Celkové množstvo reakcie</b>	<b>10 <math>\mu\text{l}</math></b>

Tab. 6: Nastavenie programu PCR reakcie pre HOT FIREPol<sup>®</sup> DNA polymerázu

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklov
Vstupná denaturácia	95 °C	12-15 min.	1
Denaturácia	95 °C	30-60 s	
Nasadenie primerov	50-68 °C	30-60 s	26-35
Elongácia	72 °C	1-4 min.	
Finálna elongácia	72 °C	5-10 minút	1
Schladienie	4 °C	$\infty$	-

### 3.2.7 Kultivácia pozitívnych kolónií *Escherichia coli* so vstupným vektorom

Po skončení PCR reakcie boli PCR produkty overené pomocou DNA agarózovej elektroforézy. U pozitívnych kolónií transformovaných buniek *E. coli* s inzertom nastal prenos do 4 ml tekutého LB média so selekčným antibiotikom (Kan<sup>R</sup>) pomocou steru so sterilným páratkom. Tekuté LB médium s bakteriálnymi kultúrami bolo kultivované na trepačke v 15 ml kyvetách cez noc pri teplote 37 °C za stáleho trepania nastavenom na 200 RPM.

### 3.2.8 Izolácia plazmidovej DNA pomocou QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kitu

Pre izoláciu pDNA bola použitá bakteriálna suspenzná kultúra, ktorej nárast cez noc sa prejavil zakalením. Do 2 ml plastovej skúmavky boli preliate 2 ml bakteriálnej suspenzie, ktorá bola stočená v centrifúge pri izbovej teplote 3 min. a 8000 RPM. Po odliatí supernatantu bolo k sedimentu pridaných 250  $\mu\text{l}$  vychladeného P1 roztoku. Následne bolo pridaných 250  $\mu\text{l}$  roztoku P2 a 350  $\mu\text{l}$  N3 pufru. Po pridaní P2 bol ihneď roztok opakovane ručne premiešaný prevrátením dna, rovnako ako po pridaní N3 ešte

pred centrifugáciou. Vzniknutý obsah bol 15 minút centrifugovaný pri 13000 RPM bez chladenia pri izbovej teplote. Po stočení zmesi bolo 800 µl supernatantu prenesených do QIAprep 2.0 spin kolonky a zmes bola stočená v centrifúge 1,5 min. pri 10000 RPM. Zostávajúci roztok, ktorý sa nezachytil na kolónke bol odstránený. Tento krok bol opakovaný so 750 µl PE pufru. Prázdne kolonky umiestnené v zbernej skúmavke boli nakoniec stočené 3 min. pri rovnakým postupom, aby sa odstránil zostatkový premývací pufo. Na kolonky preložené v 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavke bolo nanesených 20 µl miliQ vody a boli poslednýkrát stočené pri izbovej teplote 1 min. pri 10000 RPM. Toto stočenie bolo opakované za rovnakých podmienok s objemom 15 µl. U vyextrahovanej pDNA z kolonky bola zameraná koncentrácia na NanoDrope. Izolovaná plazmidová DNA bola uchovávaná pri -20 °C. Overenie pDNA sa uskutočnilo sekvenovaním.

### **3.2.9 Príprava glycerolových bakteriálnych zásobných kultúr**

Z vyizolovanej pDNA pozitívnych bakteriálnych kolónií boli pripravené glycerolové zásobné bakteriálne kultúry. Základom prípravy tzv. bakteriálnych konzerv boli narastené bakteriálne nočné kultúry a ich aseptický prenos. Ku 600 µl prenesenej kultúry do sterilnej 2ml plastovej skúmavky bolo pridaných 600 µl 50 % glycerolu. Zložky vzoriek boli následne precízne premiešané, zmrazené v tekutom dusíku a uložené do mrazničky na -80 °C.

### **3.2.10 Restričné štiepenie**

Restričné štiepenie slúžilo na otestovanie správnosti vytvoreného vstupného alebo destinačného vektora nesúceho konštrukt v podobe vyizolovanej plazmidovej DNA (pDNA) z chemokompetentných buniek *E. coli*. Kontrolu väčšinou predstavoval rovnaký plazmid ale bez vneseného inzertu s génom záujmu. Ku restričnému štiepeniu preto v prázdnom vektore dochádzalo na rozdielnych miestach a v odlišnom počte. Vzniknuté fragmenty bolo možné separovať agarózovou elektroforézou, pričom ich dĺžka zodpovedala počtu párov nukleotidových báz (bp). *In silico* návrh pre overenie výsledku štiepenia bol zhotovený v programe ApE verzia 2.0.70.0 podľa nukleotidovej

sekvencie konkrétneho plazmidu. V programe SnapGene bola odvodená restričná mapa pre zvolený enzým.

Pre priebeh reakcie restričného štiepenia boli jednotlivé zložky reakčnej zmesi (Tab. 7) s výnimkou vzorky DNA spoločne zmiešané. Objem zmesi (40  $\mu\text{l}$ ) bol rozdelený do piatich PCR skúmavkových stripov po 8  $\mu\text{l}$ , pričom do každého boli pridané 2  $\mu\text{l}$  DNA vstupného vektora s inzertom. Samotné restričné štiepenie prebiehalo 2 hodiny pri 37 °C. Bol použitý enzým PstI, ktorý vytváral kohézne (lepivé) konce na DNA pri štiepení, čo umožňuje spárovanie s inými komplementárnymi DNA sekvenciami. Správna veľkosť rozštiepených fragmentov vstupného vektora bola overená gélovou elektroforézou na 1% agarózovom géli s farbivom Midori Green pre zviditeľnenie DNA podľa postupu opísaného v časti 3.2.2. Do jednotlivých jamiek na géli boli napipetované vzorky (10  $\mu\text{l}$ ) so 6x DNA nanášacím farbivom (2  $\mu\text{l}$ ).

Tab. 7: Komponenty restričného štiepenia vstupného klonu restričným enzýmom *PstI*

<b>Použité chemikálie</b>	<b>Množstvo</b>
pDNA	2 $\mu\text{l}$
10X FastDigest Buffer	1 $\mu\text{l}$
Restričná endonukleáza <i>PstI</i>	0,2 $\mu\text{l}$
PCR voda	6,8 $\mu\text{l}$
<b>Celkové množstvo reakcie</b>	<b>10 <math>\mu\text{l}</math></b>

### 3.2.11 Sekvenovanie

Sekvenovanie slúžilo na testovanie pozitívnych kolónií baktérií po vyizolovaní pDNA QIAprep® Spin Miniprep Kitom v podkapitole 3.2.8. Vzorky pDNA s pozitívnymi kolóniami boli sekvenované firmou SEQme. Výsledky sekvenovania mali potvrdiť, či sa vo vstupnom vektore P2R-P3 nachádza inzert so správne zaklonovanou sekvenciou. Výstup bol porovnávaný so sekvenciou v programe SnapGene.

### 3.2.12 LR rekombinačná reakcia

Enzým Gateway® LR Clonase® II mal v LR reakcii význam pre zabezpečenie rekombinácie *attL* miest patriacich sekvencii génu *ROP8* na vstupnom vektore s *attR* miestami destinačného vektora pB7m34GW,0 (Karimi et al., 2005). Táto reakcia podnecuje vznik expresného klonu s konštruktom *35S::GFP:ROP8* nahradením *ccdB* génu za vstupný klon.

Do 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky boli pri izbovej teplote pridané komponenty reakčnej zmesi (Tab. 8). K uvedeným komponentom boli pridané 2 µl rozmrazenej LR Clonase® II Plus a bolo nutné precízne premiešanie na vortexe. Reakcia bola inkubovaná pri teplote 25 °C počas noci. Následne bol pridaný 1 µl roztoku proteinkinázy K, ktorý bol ponechaný na inkubáciu pri teplote 37 °C 10 minút.

Tab. 8: Komponenty pre LR reakčnú zmes

Použité chemikálie	Množstvo
pEN-L4-2R1 <sup>TM</sup> plazmid nesúci <i>p35S</i> sekvenciu	1 µl
pEN-L1-F-L2 <sup>TM</sup> nesúci <i>eGFP</i> sekvenciu	1 µl
pDONR <sup>TM</sup> P2R-P3 kódujúci <i>ROP8</i> cDNA sekvenciu	1 µl
pDEST <sup>TM</sup> vektor pB7m34GW,0	1 µl
LR Clonase® II Plus	2 µl
TE pufor, pH 8.0	4 µl
<b>Celkové množstvo reakcie</b>	<b>10 µl</b>

### 3.2.13 Transformácia *Escherichia coli* destinačným vektorom s inzertom

K 50  $\mu$ l chemokompetentných buniek *E. coli* kmeňa TOP10 bolo pridaných 5  $\mu$ l produktu LR reakcie. Pre narušenie bunkových stien baktérií prebehla inkubácia 50  $\mu$ l baktérií v skúmavke na ľade po dobu 30 minút a ihneď boli vystavené 50 sekúnd teplote 42°C. V následnosti na to boli prenesené na ľad. Do skúmavky bolo pridaných 250  $\mu$ l SOC média. V ďalšom kroku sa uzavreté skúmavky nechali inkubovať 1,5 hodiny pri teplote 37°C vo vodorovnej polohe na inkubovanej trepačke s nastavenými 200 RPM. Destinačný vektor nesie rezistenciu na spektinomycín (Spe<sup>R</sup>). Na dve Petriho misky so stuhnutými 20 ml LB média, do ktorých bolo pridaných 20  $\mu$ l selekčných antibiotík spektinomycínu (Spe<sup>R</sup>) a rifampícnu (Rif<sup>R</sup>), bolo nanesených 150  $\mu$ l bakteriálnej kultúry, ktorá bola rozotretá pomocou sterilných plastových hokejok. Takto naočkované LB média boli inkubované cez noc pri 37 °C.

### 3.2.14 Overenie destinačného vektoru restriktčným štiepením

Vyselektované kolónie boli testované na prítomnosť požadovaného konštruktú 35S::*GFP:ROP8* štiepením s restriktčným enzýmom ApaL1 a ďalšími zložkami reakčnej zmesi (Tab. 9). Restriktčné štiepenie prebiehalo 20 minút v termocykléri pri nastavenej teplote 37 °C. Po skončení restriktčného štiepenia destinačného vektoru boli k naštiepeným produktom pridané 2  $\mu$ l 6x Loading Dye. V takejto podobe bola plazmidová DNA bola nanesená na agarózový gél.

Tab. 9: Restriktčné štiepenie destinačného plazmidu restriktčným enzýmom *ApaL1*

Použité chemikálie	Množstvo
pDNA	2 $\mu$ l
Pufor	1 $\mu$ l
Restriktčný enzým ApaL1	0,2 $\mu$ l
PCR voda	6,8 $\mu$ l
<b>Celkové množstvo reakcie</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>

### 3.2.15 Sekvenovanie destinačného vektoru

Sekvenovanie slúžilo na testovanie pozitívnych kolónií baktérií po vyzozlovaní plazmidovej DNA destinačného vektora pomocou QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kitom opísané v podkapitole 3.2.8. Vzorka s pozitívnou kolóniou bola sekvenovaná firmou SEQme. Výsledky sekvenovania mali potvrdiť, že sa v destinačnom vektore nachádza správne zaklonovaný inzert s odpovedajúcou sekvenciou. Výstup bol porovnaný so sekvenciou vytvorenou v programe SnapGene.

### 3.2.16 Transformácia do *Agrobacterium tumefaciens* a príprava nočnej kultúry

15 µl vzorky DNA s konštruktom *35S::GFP:ROP8* pripraveným klonovaním aplikujem do 200 µl *A. tumefaciens* GV3101 ako zmrazené glycerolové inokulum. Bakteriálne bunky sú transformované vďaka teplotnému šoku, pretože bakteriálna kultúra bola uložená 40 minút na ľade, následne bola zmrazená 5 minút v tekutom dusíku a 15 min. rozmrazovaná pri izbovej teplote. Po pridaní 400 µl SOC média bola kultúra inkubovaná 2 hodiny v tme pri 28 °C. Médium bolo potom rozliate do dvoch Petriho misiek. Sterilnou plastovou hokejkou boli rovnomerne po povrchu rozotreté antibiotiká. Najčastejším antibiotikom je spektinomycín (Spe<sub>100</sub>) ale môže byť použitý aj v kombinácii s rifampicínom, aby bol znemožnený rast iných mikroorganizmov ako *A. tumefaciens* (Rif<sub>50</sub>). Misky boli kultivované v tme pri teplote 28 °C. Deň pred stabilnou transformáciou lucerny boli narastené vyselektované kolónie *A. tumefaciens* s destinačným vektorom na pevnom LB médiu drevenou špajdlou sterilne prenesené do 10 ml tekutého LB média s príslušnými antibiotikami (20 µl rifampicínu a 20 µl spektinomycínu). Kultúra sa nechala kultivovať cez noc v tme, pri 28 °C za stáleho miešania pri 200 RPM.

### 3.2.17 Selekcia kolónií na základe colony PCR s M13 primermi

Základný postup použitia colony PCR pri overovaní je uvedený v podkapitole 3.2.6. Na overenie správnosti transformácie destinačného vektora (templátová DNA) do chemokompetentných buniek *A. tumefaciens* bol použitý pre amplifikáciu úseku s

konštruktom spätný a priamy primer M13. Komponenty PCR reakčnej zmesi sú uvedené v Tab. 10. PCR reakcia prebehla s nastaveným programom (Tab. 11) pre Phire Hot Start II DNA polymerázu (Cat#F122L; Thermo Scientific™). PCR produkty boli overené pomocou 1% DNA agarózovej elektroforézy podľa postupu uvedenom v podkapitole 3.2.2. Pozitívne kolónie boli vypichnuté do tekutého LB média so selekčnými antibiotikami (Spe<sup>R</sup> a Rif<sup>R</sup>) a kultivované podľa postupu v podkapitole 3.2.7.

Tab. 10: Zloženie PCR reakčnej zmesi

Použité chemikálie	Množstvo
PCR voda	4,6 µl
5xBuffer (pufor)	2 µl
2 mmol·l <sup>-1</sup> dNTP Mix	0,2 µl
10 mmol·l <sup>-1</sup> M13 priamy primer	1 µl
10 mmol·l <sup>-1</sup> M13 spätný primer	1 µl
Phire HS II DNA polymeráza	0,2 µl
Templátová DNA	1 µl
<b>Celkové množstvo reakcie</b>	<b>10 µl</b>

Tab. 11: Program nastavenia priebehu fáz PCR reakcie

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklov
Vstupná denaturácia	98 °C	5 min.	1
Denaturácia	98 °C	5 s	
Nasadanie primerov	68,7 °C	5 s	40
Elongácia	72 °C	20 s	
Finálna elongácia	72 °C	1 min.	1
Schladenie	4 °C	∞	-



### 3.3 Tranzientná transformácia listov *Nicotiana benthamiana*

Na začiatku bolo pripravené kokultivačné médium obsahujúce 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MES (pH 5,6) a 150 μM acetosyringónu.

Bakteriálna kultúra *A. tumefaciens* na tranzientnú transformáciu *N. benthamiana* bola pripravená sterilne pridanými 20 μl rifampicínu a 5 μl spectinomycínu. Rezistencia na ne je obsiahnutá v sekvencii konštrukt. Do 5 ml tekutého LB média. 0,5 ml čistého LB média s antibiotikami bolo odobraté, pretože slúžilo ako slepá vzorka, tzv. "blank" pri meraní OD. Do zvyšného média s antibiotikami bolo pridaných 30 μl vopred pripraveného glycerolového inokula *A. tumefaciens* nesúce konštrukt 35S:GFP::*ROP8* v časti 3.2.18. Takto pripravené médium bolo zabalené do alobalu a kultivované cez noc pri teplote 28 °C a 180 RPM na trepačke. Na druhý deň pri zisťovaní OD<sub>600</sub> na spektrofotometri bolo ako prvé zmerané odobraté médium z prvého dňa s antibiotikami bez bakterií ako referenčná vzorka. Pri meraní bolo vždy odpipetovaných 50 μl do sklenenej kyvety v laminárnom boxe. Bolo potrebné nariediť kultúru, aby mala OD<sub>600</sub> výslednú hodnotu 0,7 v 1 ml. Bol vypočítaný objem, ktorý bol centrifugovaný pri 2000 g, 10 min. pri 4 °C. Supernatant bol odliaty pre nahradenie 2 ml kokultivačného média, v ktorom sa pelet rozptýlil na vortexe. Suspenzia sa potom inkubovala 2 hodiny v tme pri izbovej teplote. Netransformované tabakové rastliny boli poliate asi 2 hodiny pred infiltráciou, aby sa im otvorili prieduchy. Po inkubácii sa suspenzia nasávala do injekčnej striekačky a bola opatrne zatlačená proti tlaku prstu na adaxiálnej strane listu v oblasti medzi žilnatinou. Táto oblasť bola označená fixou. Ako negatívna kontrola bolo použité kokultivačné médium. Označené transformované rastliny boli prenesené do fytotronu a prikryté čiernym igelitovým vrecom a umiestnené do tmy pred mikroskopickým pozorovaním, ktoré sa uskutočnilo na 3. deň po transformácii.

Transformované epidermálne bunky boli pozorované Airyscan CSLM vybaveným objektívom Plan-Apochromat 20x/0,8 (Carl Zeiss, Nemecko). V princípe funguje ako vylepšený fluorescenčný mikroskop. Následné digitálne spracovanie pripravených preparátov prebiehalo pomocou softvéru Zen (modrá verzia).

### **3.4 Stabilná transformácia lucerny siatej s využitím somatickej embryogenézy**

Na získanie stabilne transformovanej línie *M. sativa* s fúziou GFP (*eGFP*) s ROP8 poháňaným pod promótorom 35S boli listy zreých rastlín transformované *A. tumefaciens* GV3101 nesúcim tento konštrukt (*35S::GFP:ROP8*) v destinačnom vektore pB7m34GW,0. K získaniu transgénnych línií lucerny siatej boli použité listové explantáty z 2. až 5. stonkového uzlu nekvitnúcich rastlín *M. sativa*. Po ich sterilizácii nasledoval proces somatickej embryogenézy a nakoniec regenerácia transgénnej rastliny. Postup transformačného protokolu vychádzal z práce Samac & Austin-Phillips (2006) pre účinnú transformáciu lucerny siatej. Podmienky kultivácie boli nemenné počas celého priebehu stabilnej transformácie v kultivačnej miestnosti. Sú rozpísané v podkapitole 3.1.2.

#### **3.4.1 Sterilizácia rastlinného materiálu**

Z rastlín kultivovaných v *in vivo* podmienkach boli po odtrhnutí zdravé listy ponorené do 50 ml flakóny s nesterilnou vodou z kohútika. Používané roztoky boli sterilizované cez bakteriálny filter. Odtrhnuté listy boli sterilizované v 25 ml 70 % etanolu po dobu 10 s. Následne boli listy prenesené do 40 ml roztoku milliQ vody so 40 µl Tween-20. V ďalšom kroku boli listy prenesené do roztoku milliQ vody (36 ml), hypochloridu sodného (4 ml) s prídavkom Tween-20 (40 µl). Listy boli v tomto roztoku ponechané 1,5 min. Nakoniec boli sterilizované listy opláchnuté trikrát v Petriho miskách s milliQ vodou.

#### **3.4.2 Kultivácia *A. tumefaciens* na LB médiu**

Bola pripravená kultúra baktérií s vneseným konštruktom podľa postupu v 3.2.16. Kolónie *A. tumefaciens* na pevnom LB médiu s prídavkom antibiotík (Rif<sup>R</sup> a Spe<sup>R</sup>) boli zvlášť prenesené do rozliateho tekutého LB média po 4 ml vo falkónách a boli inkubované pri 28 °C s miešaním podmienkach za tmy počas noci. Pred použitím bolo zisťované OD<sub>600</sub>, ktorého hodnota by sa mala nachádzať v rozmedzí 0.6-0.8, inak bolo potrebné zriedenie kultúry. Takto pripravená bakteriálna kultúra bola stočená v

centrifúge 5 min. na 3000 g pri izbovej teplote. Supernatant bol zliaty a sediment bol rozpustený v čistom tekutom LB médiu bez prídavku antibiotík.

### **3.4.3 Prenos listových explantátov *M. sativa* na SH médium s *A. tumefaciens***

Sterilizované listy boli rozrezané na polovicu pomocou sterilného skalpela a bola oddelená ich spodná časť so stopkou. Tieto listové explantáty boli uložené v plastových flakónoch s 12 ml SH média a 3 ml suspendovanej „štartér“ kultúry *A. tumefaciens* z predchádzajúceho kroku. Boli ponechané za mierneho miešania (20 RPM) 30 min. v tme na trepačke pri 21 °C. Následne boli explantáty umiestnené na filtračný papier, osušené a prenesené na čisté B5H médium. Negatívnu kontrolu predstavovali listové explantáty uložené na čisté LB médium bez baktérií.

### **3.4.4 Kultivácia lucerny siatej na B5H médiu**

Inokulované listové explantáty z SH média boli po osušení prenesené na B5H médium bez obsahu akýchkoľvek antibiotík v počte dvoch trojlístkov na misku, pričom bolo pripravených celkovo 12 misiek s médiom. Toto médium obsahovalo fytohormóny (2,4-D a kinetín) pre indukciu tvorby kalusov.

### **3.4.5 Kultivácia lucerny siatej na B5H médiu s prídavkom antibiotík**

Po 7 dňoch kultivácie sa na povrchu explantátov vytvoril povlak narastených baktérií *A. tumefaciens*. Takéto explantáty bolo nutné premyť 3-5krát v milliQ vode. Explantáty omyté od *A. tumefaciens* a následne osušené boli prenesené na pripravené B5H médium so selekčnými antibiotikami Ppt<sup>R</sup> a Tic<sup>R</sup>.

### **3.4.6 Kultivácia lucerny siatej na B50 médiu**

Po troch týždňoch boli vytvorené kalusy sterilne prenesené na B50 médium s obsahom antibiotík (Ppt<sup>R</sup> a Tic<sup>R</sup>), ktoré už neobsahovalo fytohormóny. V takomto zložení médium indukuje vznik embryí. Zapáskované Petriho misky s kalusmi boli prenesené do fytotronu na kultiváciu. Kalusy boli opäť kultivované zhruba 2-3 týždne, pokiaľ nenarástli somatické embryá.

### 3.4.7 Kultivácia lucerny siatej na MMS médiu

Vzniknuté somatické embryá, ktoré dosiahli vývinové štádium kotyledonárnych listov, boli jednotlivo sterilne prenesené z B50 média na klíčiace MMS médium na konverziu rastliny. Boli uložené tak, aby malo embryo prístup k živinám v médiu. MMS médium bolo pripravené ako základné MS médium s prídavkom Ppt<sup>R</sup> a Tic<sup>R</sup>. Na MMS médiu dochádzalo ku klíčeniu a vytváraniu koreňovej sústavy. Zapáskované misky boli umiestnené do fytotronu. Somatické embryá by mali byť kultivované zhruba 2-3 týždne, pokiaľ by nebol viditeľný rast koreňov. Mala by nasledovať kultivácia klíčencov s najrozvinutejšími koreňmi na MS médiu pre vznik plne regenerovanej rastliny. Z časových dôvodov nebolo možné zrealizovať túto fázu, pretože embryá pre zakoreňovanie potrebovali dlhšie časové obdobie ako dva týždne. Nebolo preto možné zrealizovať kontrolu transformantov mikroskopickou analýzou ani PCR genotypovaním.

## 4 VÝSLEDKY

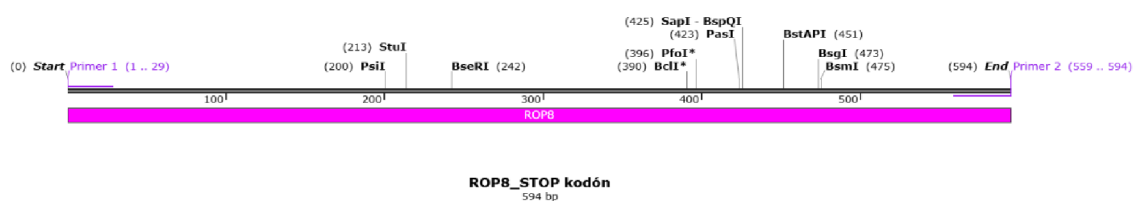
Táto kapitola práce je venovaná dosiahnutým výsledkom počas experimentálnej časti. Jej obsah je tématicky rozdelený do troch samostatných podkapitol, ktoré na seba nadväzujú a sú medzi sebou vzájomne prepojené. Výsledky sú zoradené chronologicky podľa časovej postupnosti, v akej prebiehali. V prvej časti sú popísané výsledky z celého priebehu klonovania pomocou Gateway® technológie pre simultánnu prípravu niekoľkých DNA fragmentov. Druhá časť je zameraná na tranzientnú transformáciu *N. benthamiana* a posledná časť opisuje stabilnú transformáciu lucerny siatej pripraveným konštruktom v prvej časti.

### 4.1 Príprava klonovacích vektorov

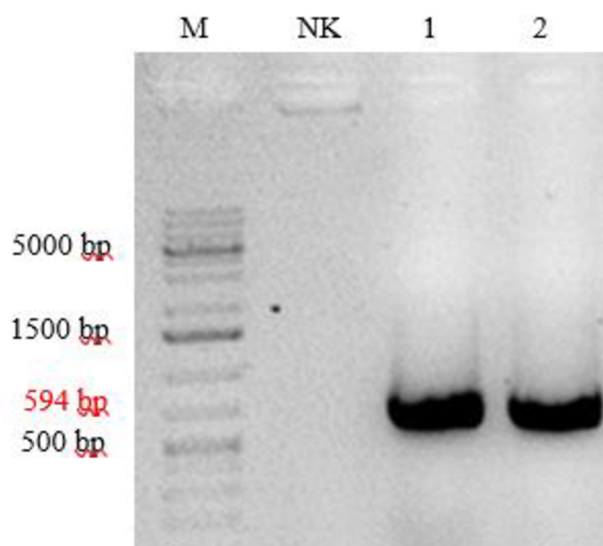
V tejto časti práce sú popísané výsledky získané pri vytváraní konštruktu pre expresiu GFP-fúzneho proteínu ROP8 na princípe molekulárneho klonovania. Takmer celá *in silico* analýza kopírujúca priebeh klonovania spojená s vytvorením vektorových máp bola zhotovená v programe SnapGene. Pre vyhodnotenie restričného štiepenia a sekvenovania bol využitý plazmidový editor ApE. Pre porovnanie homológie sekvencie génu získanej sekvenovaním s dostupnými sekvenciami v databázach a pre overovanie práce v SnapGene, bol využitý program Geneious Prime.

#### 4.1.1 PCR reakcia s *attB* primermi

Amplifikovaná cDNA sekvencia génu *ROP8* so STOP kodónom o veľkosti 594 bp (Obr. 2) bola získaná na základe zistenej sekvencie cDNA *ROP8* z referenčnej databázy lucerny siatej, kultivaru XinJianDaYe (MS.gene055764.t1; Chen et al., 2020) a pomocou páru *att* primerov. Primery boli navrhnuté podľa odporúčania v MultiSite Gateway® konštrukčnom kite pre trojfragmentový vektor a pomocou programu SnapGene. Jedným z kritérií bol počet párov báz zo sekvencie určenej na amplifikáciu a teplota nasadenia primerov ( $T_m$ ) v rozsahu 50-60 °C. Rozhodujúcim bol aj výber DNA polymerázy, ktorá bola súčasťou reakčnej PCR zmesi spolu s inými zložkami. Pre túto reakciu bola vybraná iProof™ High-Fidelity DNA polymeráza. Ako negatívna kontrola bola použitá PCR H<sub>2</sub>O.



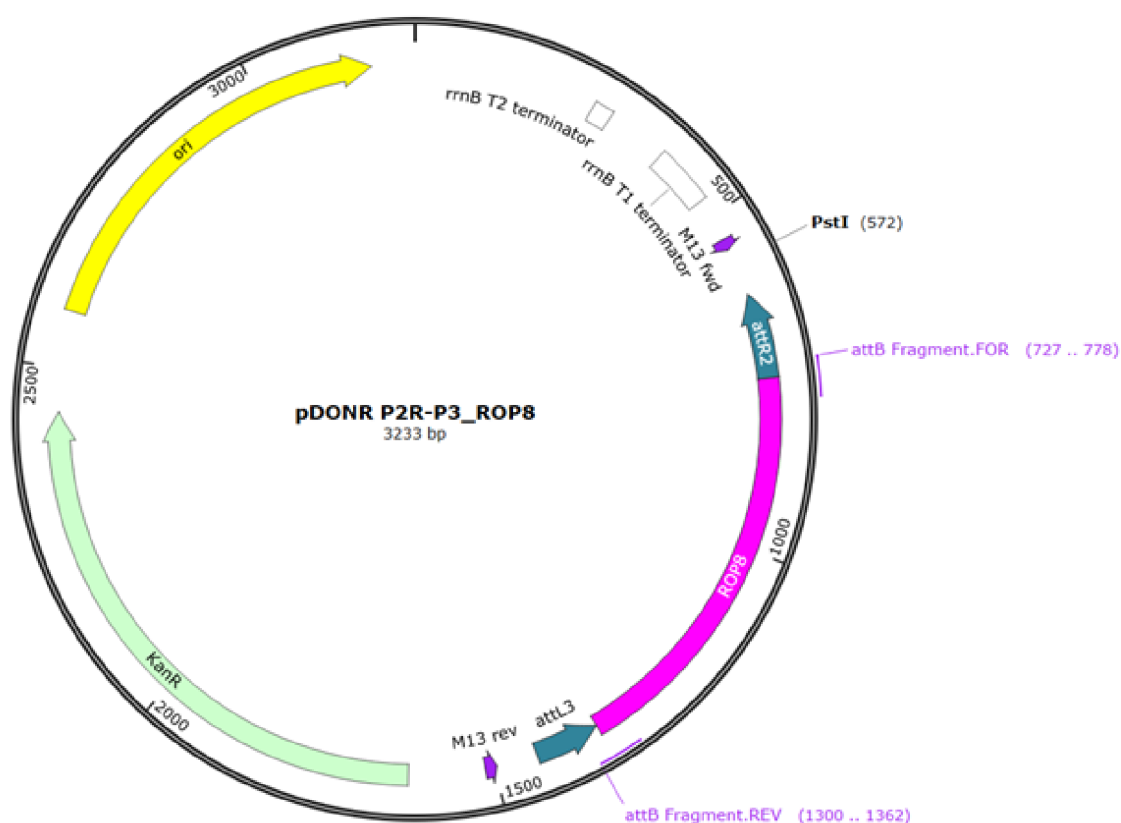
Obrázok 2: PCR produkt s *attB* primermi. Zhotovené pomocou SnapGene.



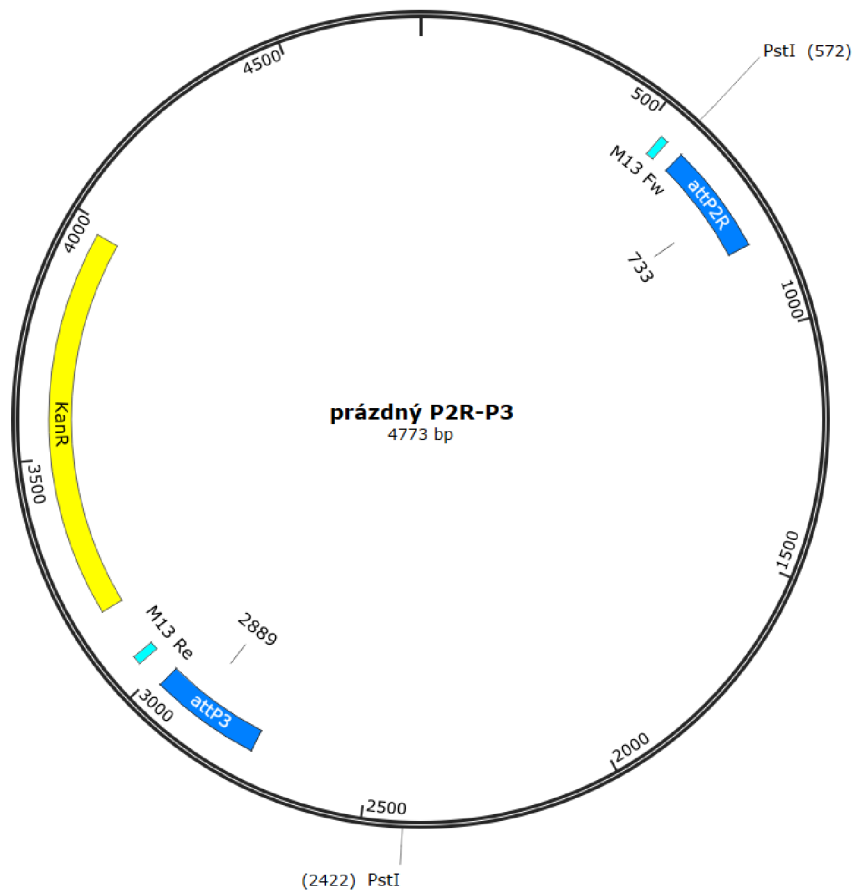
Obrázok 3: PCR produkt cDNA *ROP8* so STOP kodónom. NK – PCR voda. M – marker GeneRuler 1kb Plus DNA ladder.

#### 4.1.2 Príprava a overenie vstupného vektora pomocou restriktčného štiepenia

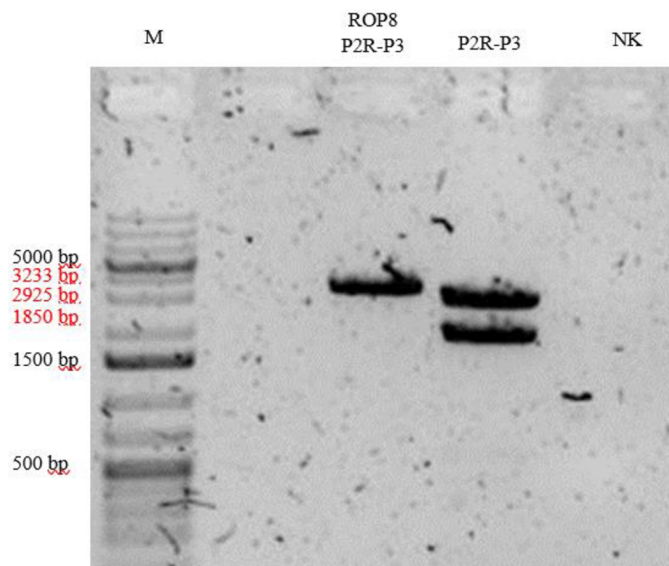
V tejto fáze priebehu klonovania bol štiepený vstupný vektor so zaklonovaným génom *Rop8* v podobe vyizolovanej pDNA s M13 miestami pre nasadenie špecifických primerov (Obr. 4). Pre štiepenie v jednom mieste na vstupnom vektore bol použitý restriktčný enzým *PstI*, čím sa vytvoril fragment DNA s veľkosťou 3233 párov báz (bp). Na prázdnom vektore tento enzým štiepil na dvoch restriktčných miestach a bol zodpovedný za vytvorenie dvoch fragmentov DNA s rôznou dĺžkou reťazca - 2923 bp a 1850 bp (Obr. 5). Výsledok štiepenia je zobrazený na géli (Obr. 6.)



Obrázok 4: *In silico* zhotovená mapa vstupného vektora pDONR P2R-P3 s inzertom ROP8. Zhotovené v programe SnapGene.



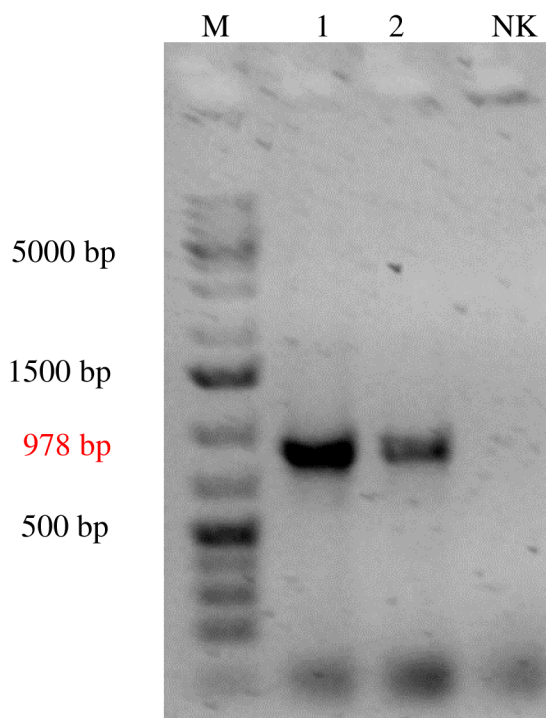
Obrázok 5: *In silico* zhotovená mapa vstupného vektora pDONR P2R-P3 bez inzertu. Zhotovené v programe SnapGene.



Obrázok 6: Restričné štiepenie vstupného klonu génovej sekvencie ROP8 v pEN-P2R-P3 s restričným enzýmom PstI (572 bp) a prázdneho vstupného vektora P2R-P3 s PstI (2925 bp + 1850 bp). NK – PCR voda. M – marker GeneRuler 1kb Plus DNA ladder.

### 4.1.3 Overenie vstupného vektora pomocou colony PCR

PCR reakciou s M13 primermi vznikol PCR produkt o veľkosti 978 bp. Táto hodnota súhlasila s teoretickým predpokladom zisteným pomocou *in silico* klonovania v SnapGene. V reakcii boli použité M13 primery. Výsledok restriktčného štiepenia na 1% agarózovom geli zobrazuje Obr. 7.



Obrázok 7: Snímok agarózového gélu po colony PCR. 1 a 2 - náhodne vybrané kolónie transformovaných chemokompetentých buniek *A. tumefaciens* GV3101 nesúcich destinačný vektor s inzertom GFP-ROP8, NK – negatívna kontrola (PCR voda), M – marker GeneRuler 1kb Plus DNA ladder.

### 4.1.4 Sekvenovanie

Ďalším spôsobom overenia správnosti prevedenia BP reakcie bolo sekvenovanie destinačného vektora (Obr. 8). Porovnaním sekvencií v databázach bolo nájdených 100 homológnych proteínov v iných rastlinách, ktoré dosahovali 87.6% homológie. Z nich až 32 dosiahlo homológiu nad 95%. U väčšiny sa však jednalo iba o predikované sekvencie, ktoré neboli doteraz anotované. Zahrnutím tohto faktu sa počet skutočných potvrdených homológov proteínu znížil. Najväčšia zhoda bola zaznamenaná u rastliny



*Medicago truncatula* a iných členov čeľade bôbovitých rastlín (*Trifolium pratense*). Výsledky sekvenovania boli porovnané pomocou programu ApE.

```

701>ATTTATATCATTTTACGTTTCTCGTTCAACTTTCCTTGACAAAGTGGGATGAGTACAGCAAGATTCATCAAATGTGTTACTGTTGGAGATGGTGCCTGT 800
133>|||||
133>ATTTATATCATTTTACGTTTCTCGTTCAACTTTCCTTGACAAAGTGGGATGAGTACAGCAAGATTCATCAAATGTGTTACTGTTGGAGATGGTGCCTGT 232

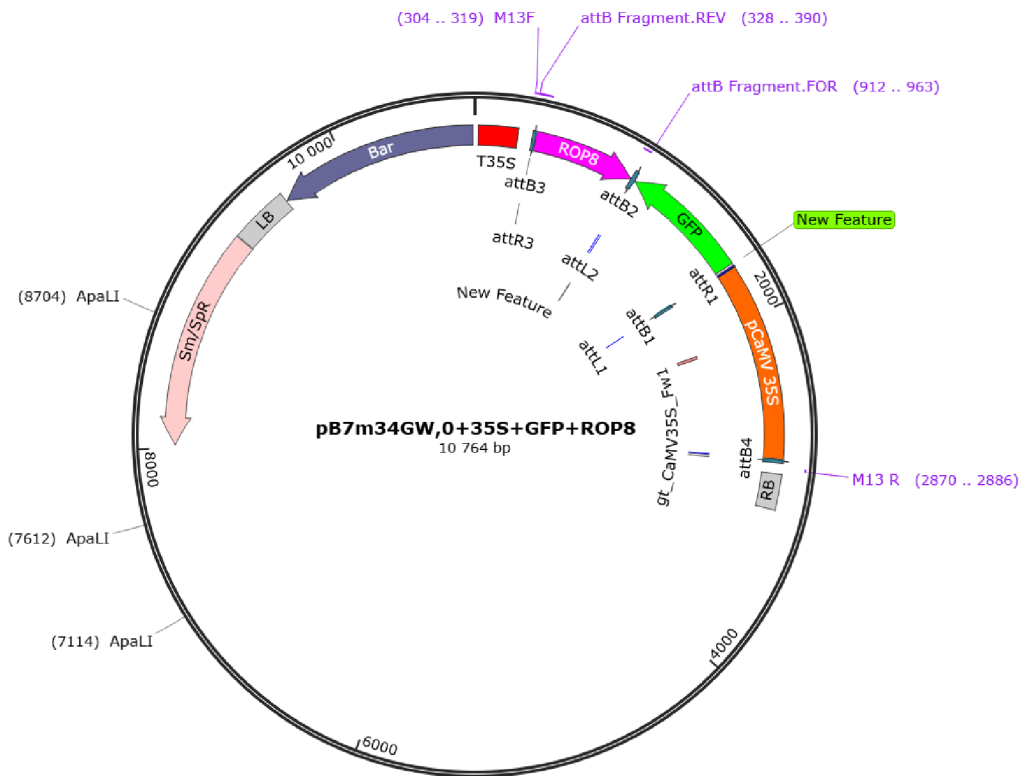
801>GGAAAGACTTGTATGCTTATCTCTTACACAAGCAATACATTCCTACGGATTATGTGCCTACAGTTTTTGATAACTTCAGTGCAAATGTTGGTGTGATG 900
233>|||||
233>GGAAAGACTTGTATGCTTATCTCTTACACAAGCAATACATTCCTACGGATTATGTGCCTACAGTTTTTGATAACTTCAGTGCAAATGTTGGTGTGATG 332

```

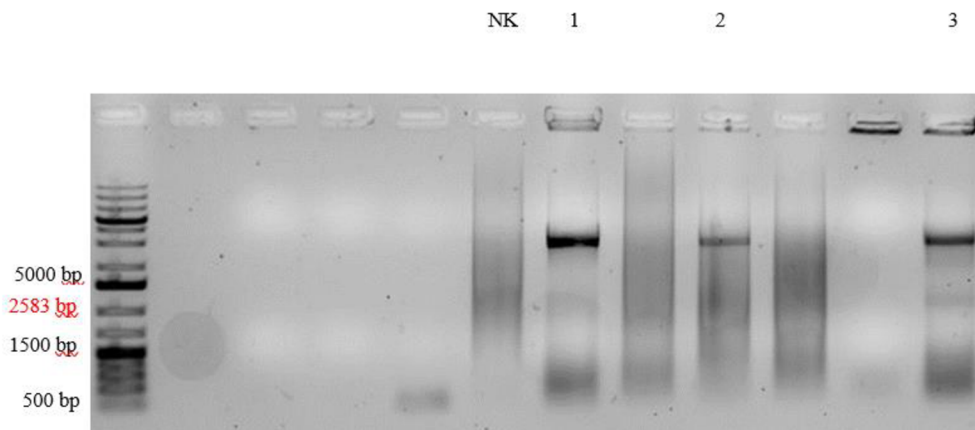
Obrázok 8: Vyznačená časť sekvencie zodpovedá sekvencii cDNA *ROP8* od prvého kodónu. Výsledok bol poskytnutý firmou Seqme.

#### 4.1.5 Overenie destinačného vektora pomocou Colony PCR

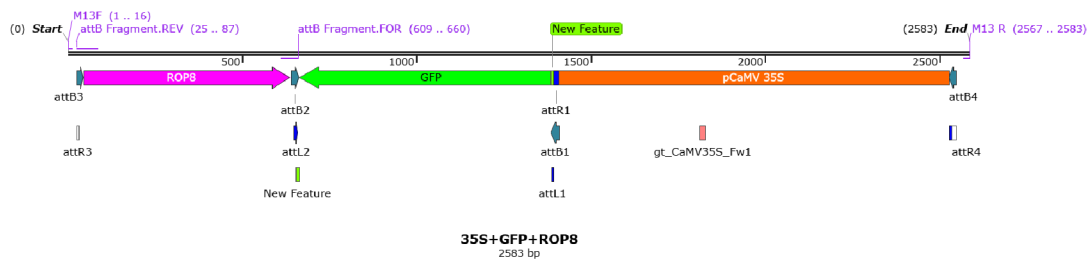
Po overení destinačného vektora so zaklonovaným inzertom (Obr. 9) pomocou restriktčného štiepenia a následného sekvenovania, bol konštrukt transformovaný do chemokompetentných baktérií *A. tumefaciens* GV3101 z nočnej kultúry vo forme bakteriálnych konzerv. Úspešnosť transformácie *A. tumefaciens* bola overená pomocou colony PCR. Veľkosť amplifikovaného PCR produktu (Obr. 10) sa zhodovala s *in silico* lineárnou sekvenciou PCR produktu po LR reakcii (Obr. 11), čo naznačovalo, že daná bakteriálna kolónia obsahovala požadovanú DNA sekvenciu. Pre amplifikovanie boli použité M13 primery. Ako negatívna kontrola bola použitá PCR voda. Pre porovnanie slúžil aj destinačný vektor bez inzertu (Obr. 12). PCR a následná elektroforéza potvrdili prítomnosť konštraktu *35S::GFP:ROP8* v *A. tumefaciens* v troch náhodne vybraných kolóniách zo šiestich v podobe „bandu“ o veľkosti 2583 bp.



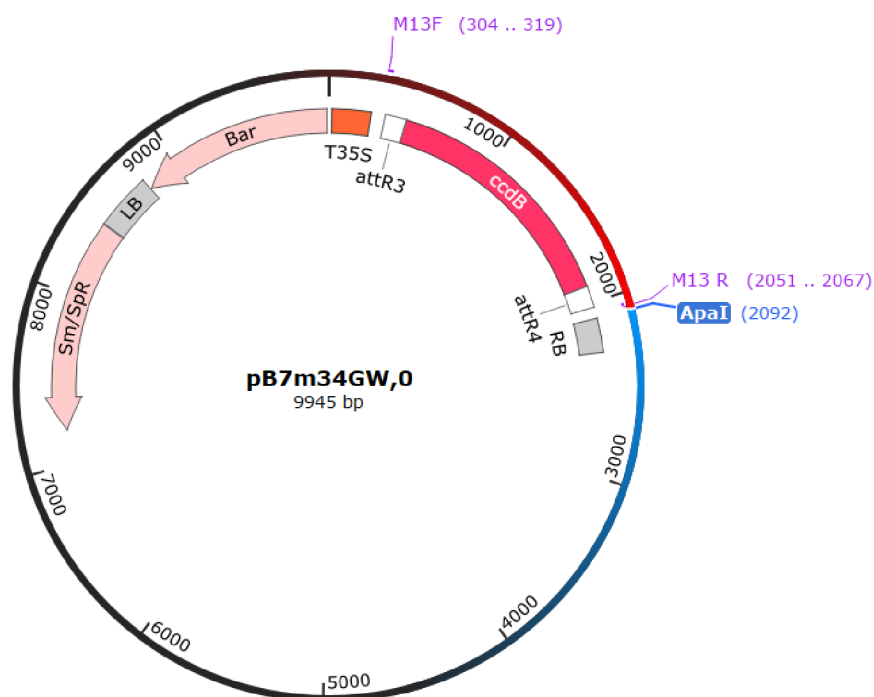
Obrázok 9: *In silico* zhotovená mapa destinačného vektora pB7m34GW, 0 s konštruktom 35S:GFP:ROP8. Zhotovené v programe SnapGene.



Obrázok 10: Reprezentatívny elektroforetický obrázok colony PCR náhodne vybratých kolónií transformovaných chemokompetentých buniek *E. coli* TOP10 so vstupným vektorom.



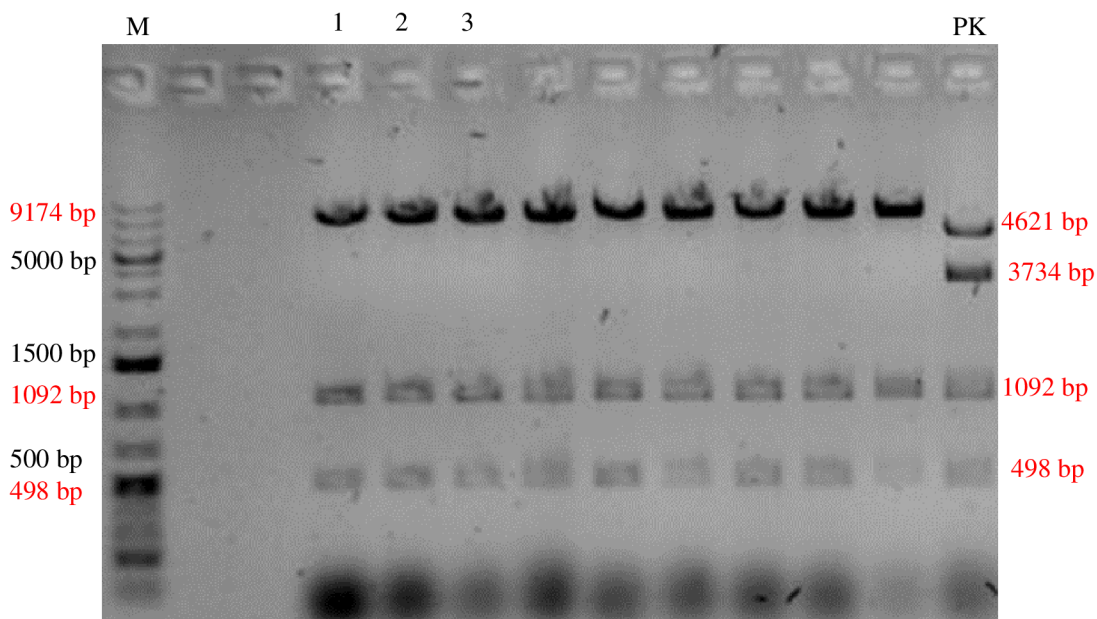
Obrázok 11: PCR produkt po colony PCR. Zhotovené v programe SnapGene.



Obrázok 12: *In silico* zhotovená mapa destinačného vektora pB7m34GW, 0 bez inzertu. Zhotovené v programe SnapGene.

#### 4.1.6 Overenie destinačného vektora pomocou restriktčného štiepenia

V destinačnom vektore pB7m34GW,0 s inzertom ROP8 dochádza k štiepeniu na dvoch miestach s troma očakávanými fragmentami DNA s veľkosťou 9174 bp, 1092 bp a 498 bp. Očakávané veľkosti úsekov sú znázornené na Obr. 5. Ako pozitívna kontrola boli použité prázdne plazmidy, ktoré neniesli zaklonovaný inzert a vykazovali restriktčné štiepenie na odlišných miestach (Obr. 13).



Obrázok 13: Restriktčné štiepenie vstupného klonu génovej sekvencie ROP8 v pB7m34GW,0 s restriktčným enzýmom *ApaL* (498 bp + 1092 bp + 9174 bp) a PK – prázdneho vstupného vektora pB7m34GW,0 s *ApaL* (498 bp + 1092 bp + 3734 + 4621 bp). M – marker GeneRuler 1kb Plus DNA ladder.

#### 4.1.7 Sekvenovanie

Sekvenovaním bola potvrdená prítomnosť *gfp* sekvencie v konštrukte *35S::GFP:ROP8\_pB7m34GW,0*, ktorá sa zhodovala s *in silico* predikciou vo vyznačenej časti reťazca (Obr. 14).

```

* *
9677>TTcttgtacaaagtggcaatggtgagcaaggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccatcctggtcgagctgagcggcgagctaaacggccacaagt>9776
751<TTCTTTGTACAAAGTGGCAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGT>652
1120>----->1120

* * * * *
977>tcacgctgtccggcgaggcgaggcgtatccacctaaccgcaagctgaccctgaagttcatctgaccaccggcaagctgcccgtaccctgagccaccct>9876
65<TCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGGCCCTACCCCT>552
1120>----->1120

* * * * *
9877>cgtgaccaccctgacctaaccggctgacagtgttcagccgctaccggcaccacatgaagcagcagcagcttcttcaagtccgccatgcccgaaggctacgt>9976
551<CGTGACCACCCCTGACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGT>452
1120>----->1120

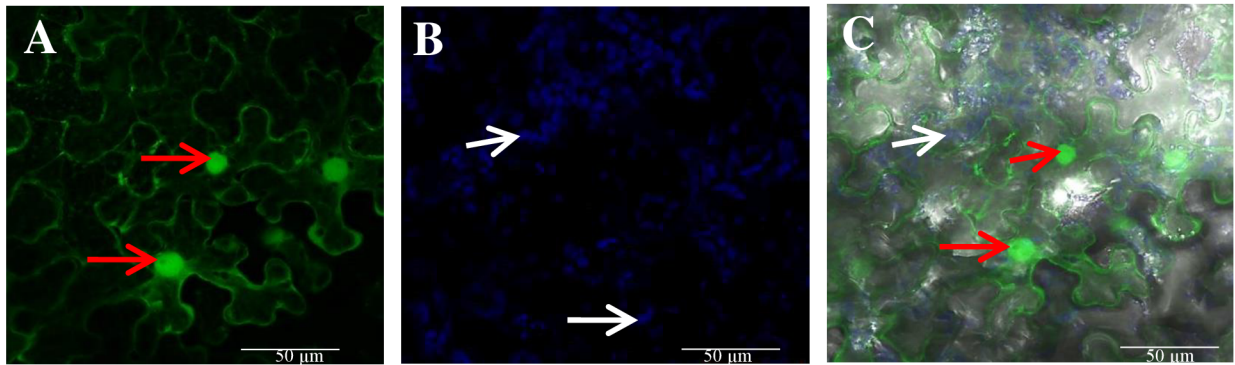
```

Obrázok 14: Výsledok sekvenovania časti pDNA pB7m34GW<sub>0</sub> s inzertom 35S::*GFP:ROP8*, *In silico* pripravená sekvencia pB7m34GW<sub>0</sub> + 35S::*GFP:ROP8* bola porovnaná v programe ApE so sekvenciou vyzolovanej pDNA. Označená oblasť (červený obdĺžnik) predstavuje takmer identickú časť sekvencie *gfp*, ktorá sa nachádza na destinačnom vektore pB7m34GW<sub>0</sub>. Výsledok poskytnutý firmou Seqme.

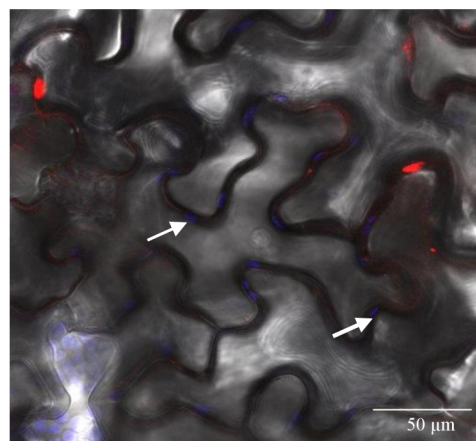
## 4.2 Tranzientná transformácia *Nicotiana benthamiana*

Tranzientná transformácia listov tabaku slúžila na overenie funkčnosti konštruktu 35S::*ROP8:GFP* pred stabilnou transformáciou, ktorá je náročnejšia na prevedenie. Potvrdenie funkčnosti vychádza z predpokladu, že na tretí deň od agroinfiltrácie listov *N. benthamiana*, by mal byť pozorovateľný fluorescenčný signál v listových epidermálnych bunkách, v ktorých bol konštrukt exprimovaný.

Proteín ROP8 značený zeleným fluorescenčným proteínom GFP bol pozorovaný vo veľkej miere v jadrách (okrem jadriek). Fluorescenčný signál bol ďalej prítomný v cytoplazme (okolie organel) a v blízkosti plazmatickej membrány, avšak neznamená to okamžite aj lokalizáciu génu v týchto častiach bunky. Signál nie je rovnomerne rozvrstvený v bunkách, ale v niektorých miestach, napríklad v blízkosti plazmatickej membrány bol signál pozorovaný ako viac difundovaný (Obr. 15 A a C). Mohlo dôjsť k rozštiepeniu viazaného GFP na voľné. Kontrola autofluorescencie je detekovaná ako modré svetlo (Obr. 15 B a C). Negatívnu kontrolu predstavoval v tomto prípade kokultivačný roztok (Obr. 16), kde nebol zachytený žiaden GFP signál. Všetky obrázky z tohto mikroskopovania boli vyhotovené na fluorescenčnom mikroskope Airyscan CLSM.



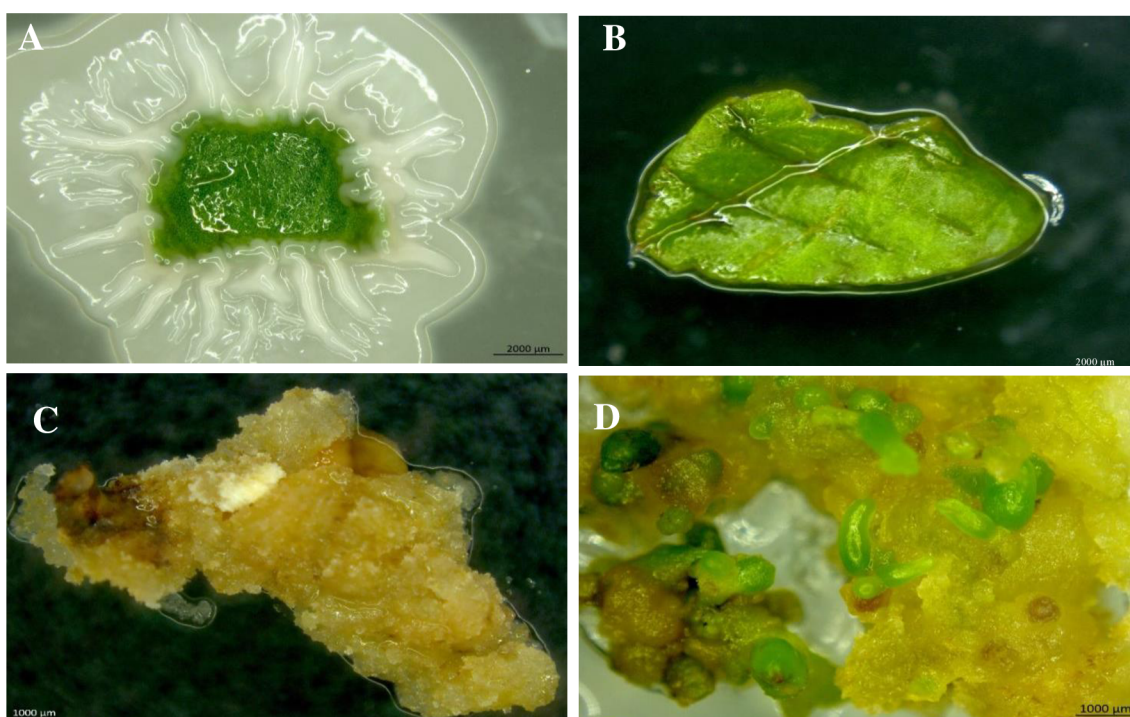
Obr. 15: Lokalizácia fúzného konštruktu  $35S::GFP:ROP8$  proteínu v tranzientne transformovaných bunkách *N. benthamiana*. **A** proteín ROP8 vizualizovaný pomocou fúzie s GFP, kanál pre emisiu 488 nm. **B** kanál pre chlorofyl ako kontrola autofluorescencie, **C** zlúčené kanály s prechádzajúcim svetlom, chlorofylom a GFP. Hroty bielych šípok ukazujú na chloroplasty a červených šípok na jadierka v cytoplazmatických pásoch. Hviezdičky vyznačujú zhluky fluorescenčných signálov na plazmatických membránach. Mierka 50  $\mu\text{m}$ . Airyscan CLSM.



Obrázok 16: Negatívna kontrola v zlúčených kanáloch pre chlorofyl, GFP, prechádzajúce svetlo a mRFP, Hroty bielych šípok ukazujú na chlorofyl v chloroplastoch Mierka 50  $\mu\text{m}$ . Airyscan CLSM.

### 4.3 Stabilná transformácia lucerny siatej

Po overení bakteriálnych kolónií *A. tumefaciens*, je možné tvrdiť, že obsahujú destinačný vektor s konštruktom génu *Rop8*. Bakteriálne suspenzie *Agrobacterium* s týmto konštruktom boli použité k stabilnej transformácii lucerny siatej. Regenerácia rastlín prebehla nepriamou somatickou embryogenézou (Obr. 17). Ako explantáty boli použité sterilizované mladé listy lucerny siatej narezané na polovicu. Tie boli kóultivované na B5H médiu s transformovanými *A. tumefaciens* obsahujúcim požadovaný vektor s inzertom (Obr. 17 A). *A. tumefaciens* po týždni kultivácie obrástlo explantát listu (Obr. 17 A). Explantáty boli omyté vo vode a prenesené na B5H médium so selekčným antibiotikom (Ppt<sup>R</sup>) a eliminačným antibiotikom pre baktérie (Tic<sup>R</sup>) (17 B). Došlo k indukcii tvorbe kalusu (Obr. 17 C). Kalus s bunkami bez funkcie bol prenesený na B50 Ppt<sup>R</sup> /Tic<sup>R</sup> médium, kde na základe zloženia média došlo k diferenciacii a k vytváraniu embryí (Obr. 17 D). Zrelé embryá boli prenesené na MMS Ppt<sup>R</sup> /Tic<sup>R</sup> médium, aby došlo k indukcii rastu koreňov. Dostatočne vyvinuté klíčence nebolo možné z časových dôvodov preniesť na MS médium pre získanie regenerovaných stabilne transformovaných rastlín lucerny siatej.



Obr. 17: Fázy priebehu stabilnej transformácie lucerny siatej. **A.** Listový explantát obrastený *A. tumefaciens* na B5H médiu na 7. deň po transformácii, **B.** listový explantát po premytí *A. tumefaciens* po 7 dňoch kultivácie na B5H médiu s obsahom selekčných antibiotík (TIC, PPT), **C.** vytvorený kalus po 14 dňoch od transformácie na B5H médiu s antibiotikami (TIC, PPT), **D.** kalus s tvoriacimi sa somatickými embryami na B50 médiu s antibiotikami (TIC, PPT). Mierka A 2000 µm a C – D 1000 µm (B-D). A – D AXIO Zoom.c

## 5 DISKUSIA

Hlavným výstupom tejto práce, v ktorom sa spájali všetky ciele, bolo pripraviť klonovaním fúzny konštrukt nesúci fluorescenčné značenie. Použitá technológia klonovania MultiSite Gateway slúžila na simultánne klonovanie viacerých fragmentov DNA (Sasaki et al., 2004). Rovnako ako u klonovania živočíchov, aj pre rastlinné binárne T- DNA vektory boli navrhnuté protokoly pre MultiSite Gateway klonovanie (Karimi et al., 2005) založené na miestne špecifickej rekombinácii. Technológia umožňovala pri príprave konštruktú zostavenie viacerých fragmentov DNA vo vopred definovanom poradí, či orientácii (Karimi et al., 2007).

V experimentálnej časti bakalárskej práce bola ako súčasť jedného z cieľov uskutočnená *in silico* analýza kopírujúca priebeh experimentu. Bola sústredená hlavne na vyhľadávanie sekvencií génov a plazmidov v databázach, návrh primerov, prípravu vektorov po BP a LR reakcii v samotnom procese klonovania a ich štiepenia použitými restriktívnymi enzýmami na špecifických miestach v sekvencii (Elmayan & Vaucheret, 1996a). Na konci jednotlivých experimentov prebehlo overovanie správnosti priebehu klonovania porovnaním s *in silico* teoreticky pripravenými vektormi.

Na začiatku procesu klonovania bolo potrebné získať sekvenciu cDNA lucerny, ktorá kodovala malý proteín viažuce GTP. Bola potrebná amplifikácia metódou PCR. Degenerované oligonukleotidy založené na vysoko konzervovaných aminokyselinových sekvenciách GTPáz je možné využiť ako primery (Yang & Watson, 1993). (Sorek et al., 2007, 2010b; Poraty-Gavra a kol., 2013). Pre tento experiment boli navrhnuté *att* primery pre BP a LR reakciu, ktoré vytvorili vstupný a destinačný vektor. Prítomnosť požadovaného konštruktú bola overená colony PCR alebo sekvenáciou (Seqme). Po izolácii plazmidovej DNA prebehlo overovanie prítomnosti a funkčnosti vytvoreného konštruktú v chemokompetentných bunkách baktérií restriktívnym štiepením. Štiepenie restriktívnymi enzýmami môže okrem iného určiť aj počet kópií transgénu vo vektore (Elmayan & Vaucheret, 1996), čo ale v tomto prípade využívané nebolo.

Tranzientnou transformáciou listov *N. benthamiana* bolo možné potvrdiť účinnosť konštruktú. Zavedené segmenty DNA sú u tranzientnej transformácie exprimované v omnoho vyšších úrovniach ako u stabilnej. Pre kontrolu génovej expresie funkčného konštruktú s ROP8 v listoch *N. benthamiana* musel proteín niesť epitopovú značku



(GFP) (Chalfie et al., 1994; Klinkenberg, 2014). Týmto spôsobom sa určuje jeho funkciu v rastlinách, subcelulárnu lokalizáciu vrátane analýzy účinnosti promótorov alebo interakcií proteín-proteín (Janssen & Gardner, 1990; Li et al., 2009; Sheludko, 2008; Yang et al., 2000). GFP bolo možné nahradiť aj YFP (Lin et al., 2021). Expresia *gfp* cDNA v hostiteľovi mohla spôsobiť mutáciu a produkciu proteínov s rôznymi fluorescenčnými vlastnosťami (Chalfie, 1995), čo mohlo narušiť správnosť výsledkov pozorovania. V mojom preparáte nebola všade rovnaká intenzita fluorescenčného signálu. Expresia transgénu nie vždy koreluje s počtom kópií transgénu a môže sa veľmi líšiť kvôli miestu integrácie, preto sa rozdiely v expresii pripisujú „efektom polohy“ (Elmayan & Vaucheret, 1996; Mlynarova et al., 1996). Na dosiahnutie 2-3-násobne vyššej expresie génov, napríklad pre selekčné markery, než ktorú zabezpečuje hostiteľský genóm, bol použitý silný promótor 35S vírusu karfiolovej mozaiky (CaMV) (Yoo et al., 2005).

ROP8 bol lokalizovaný v jadrách, pričom v jadierkach nevykazoval žiadny signál. Dvojitý membránový obal jadra umožňuje selektívny vstup proteínov cez špecializované komplexy jadrových pórov do 60 kDa. Pre spoľahlivý transport konštruktov naklonovaných s GFP (29 kDa) do jadra musia mať proteíny v primárnej sekvencii nukleárny lokalizačný signál (NLS), pretože by samy o sobe neprešli. Z časových dôvodov nebolo možné overiť veľkosť konštrukt (Nigg, 1997). Veľkosť ROP8 je možné odvodiť od veľkosti jeho homológnych proteínov, ktoré majú veľkosť od 21 do 24 kDa (Feiguelman et al., 2018). Teoreticky by mal byť v podobe konštrukt aj bez NLS transportovaný do jadra bez problémov.

Podľa Lin et al., (2021) ROP8 vykazuje za normálnych podmienok vzory lokalizácie na plazmatickej membráne spolu s cytoplazmatickou, jadrovou a perinukleárnou lokalizáciou. Bodový signál pri tomto pozorovaní, ktorý nebol zachytený pri mojom experimente, značil intracelulárnu lokalizáciu v bunkách. Jeho lokalizácia sa ďalej líšila pri procese autofágie, na ktorom sa podieľa. Za stresových podmienok je ho možné identifikovať v aktívnej podobe na autofagozomálnych štruktúrach alebo sa degraduje vo vakuole (Lin et al., 2021). ROP typu I fúzované s GFP (GFP-ROP6), ku ktorým sa ROP8 radí, exprimované pod 35S promotorom v rastlinách *Arabidopsis*, boli lokalizované iba v plazmatickej membráne (Poraty-Gavra et al., 2013; Sorek et al.,

2007). Výsledok sa nezhoduje s mojím pozorovaním. Môže to naznačovať, že ROP8 nemá veľkú podobnosť s ostatnými zástupcami tohto typu GTPáz. Je dôležité brať do úvahy výber pozorovaného pletiva, pretože v imunolokalizačných experimentoch s polyklonálnymi antiROP protilátkami závisela subcelulárna lokalizácia ROP práve od tohto faktoru (Lin et al., 1996; Molendijk, 2001; Sorek et al., 2010). Napríklad v epidermidis klíčnych listov boli ROP nájdené v plazmatickej membráne a výstupných miestach ER (Zhang et al., 2010).

Ďalším cieľom experimentálnej práce bolo navodenie somatickej embryogenézy a následná stabilná transformácia lucerny siatej s *A. tumefaciens* podľa upraveného protokolu Samac & Austin-Phillips (2006) pre kmeň GV3101. Metóda bola prevedená na listových explantátov rastliny *M. sativa* kultivaru Regen SY (RSY). Slúžila na zavedenie transgénneho konštruktu *35S::GFP:Rop8* do rastliny. Pri kultivácii na rastlinných explantátoch boli viaceré média obohatené o PPT. Miera rezistencie naň by mala po určitej dobe (4 týždne) zostať u odolnejších genotypov konštantná, ale a u menej odolných sa rezistencia vymizla úplne a rastliny neprežili (Wen et al., 2019). PPT sa vyznačuje tým, že môže zmeniť bunkový metabolizmus u *M. truncatula*, čo pravdepodobne platí aj pre *M. sativa*. V prípade využitia selekcie s kanamycínom a hygromycínom by však mohlo dôjsť k nízkemu počtu transgénov, prípadne by bol zrejme pozorovaný výskyt chimérických transgénov (Seabra et al., 2012; Wen et al., 2019).

## 6 ZÁVER

Teoretická časť bakalárskej práce bola venovaná predstaveniu rastliny *M. sativa* – jej všeobecnej charakteristike, významu v genetickom inžinierstve alebo v oblasti pestovania pre zlepšenie vlastností pôdy a jej využitie ako kŕmnej plodiny. Súčasťou rešerše boli metódy stabilnej transformácie, ktoré možno použiť pri transformácii *M. sativa*. Najväčší priestor bol venovaný transformácii prostredníctvom *A. tumefaciens*, pretože táto metóda bola využívaná aj pri tejto práci. Záver teoretického úvodu do problematiky bol venovaný stručnému prehľadu základných informácií o ROP GTPázach. V tejto podkapitole bola spísaná ich základná charakteristika so zaradením, ich cyklus a význam pri signalizácii na stresové faktory a vytváranie vzorov v procese formovania štruktúr počas embryonálneho vývoja, tzv. „patterning“.

Experimentálna časť práce opisuje prípravu vektorov pre vytvorenie konštruktú GFP-fúzneho proteínu ROP8. Pripravený konštrukt bol po zaklonovaní do vhodných vektorov transformovaný do chemokompetentných *A. tumefaciens*, ktoré slúžili pre tranzientnú transformáciu do *N. benthamiana* a stabilnú transformáciu *M. sativa*. Prítomnosť správne zaklonovaného inzertu ROP8 do bakteriálnych plazmidov bola overená metódou colony PCR, restričným štiepením a sekvenovaním.

Zrealizovaná tranzientná transformácia listov *N. benthamiana* slúžila pre testovanie prítomnosti vytvoreného konštruktú. Výsledky práce z mikroskopovania listov konštruktom *35S::GFP:ROP8* potvrdili expresiu génu v jadre. Na ďalšie zváženie zostáva potvrdenie subcelulárna lokalizácie fúzneho proteínu v cytoplazme a plazmatickej membráne pomocou špecifických markerov.

Cieľom stabilnej transformácie bolo vniesť pripravený konštrukt *35S::GFP:ROP8* aj do *M. sativa*. Potvrdenie prítomnosti transgénu u selektantov stabilne transformovanej lucerney nesúcich konštrukt už z časových dôvodov nebolo možné. Takto overené regenerované rastliny mohli byť prenesené do podmienok *ex vitro* a v tejto podobe poskytovať materiál využitý v budúcich experimentoch. Výzkum v spojitosti s týmto proteínom v lucerne by mohol byť zameraný na reguláciu autofágie symbiotických baktérií s koreňmi alebo organizáciu cytoskeletu (kortikálneho, aktínových filamentov) spojenú s definovaním určitého vzoru pri zakladaní buniek, určení tvaru a bunkovej

polarity. Okrem toho všetkého sa podieľajú aj na prenose signálu ako súčasť iných signálnych dráh.

## 7 LITERATURA

- A. R. Jarrett, & J. R. Hoover. (1985). Evaluating the Effect of Increased Concentrations of CO<sub>2</sub> on Infiltration Rate. *Transactions of the ASAE*, 28(1), 179–182. <https://doi.org/10.13031/2013.32224>
- Acharya, J. P., Lopez, Y., Gouveia, B. T., de Bem Oliveira, I., Resende, M. F. R., Muñoz, P. R., & Rios, E. F. (2020). Breeding Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Adapted to Subtropical Agroecosystems. *Agronomy*, 10(5), 742. <https://doi.org/10.3390/agronomy10050742>
- Albrecht, K. A., & Beauchemin, K. A. (2015). *Alfalfa and Other Perennial Legume Silage* (pp. 633–664). <https://doi.org/10.2134/agronmonogr42.c14>
- Angers, D. A. (1992). Changes in Soil Aggregation and Organic Carbon under Corn and Alfalfa. *Soil Science Society of America Journal*, 56(4), 1244–1249. <https://doi.org/10.2136/sssaj1992.03615995005600040039x>
- Angers, D. A., Kay, B. D., & Groenevelt, P. H. (1987). Compaction Characteristics of a Soil Cropped to Corn and Bromegrass. *Soil Science Society of America Journal*, 51(3), 779–783. <https://doi.org/10.2136/sssaj1987.03615995005100030037x>
- Armstrong, J. M. (1954). Cytological studies in Alfalfa polyploids. *Canadian Journal of Botany*, 32(4), 531–542. <https://doi.org/10.1139/b54-050>
- Aslani borj, M., Etesami, H., & Alikhani, H. A. (2022). Silicon improves the effect of phosphate-solubilizing bacterium and arbuscular mycorrhizal fungus on phosphorus concentration of salinity-stressed alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Rhizosphere*, 24, 100619. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100619>
- 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(2), 149–162. <https://doi.org/10.1007/BF00033736>
- Austin, S., Bingham, E. T., Mathews, D. E., Shahan, M. N., Will, J., & Burgess, R. R. (1995a). *Production and field performance of transgenic alfalfa (Medicago sativa L.) expressing alpha-amylase and manganese-dependent lignin peroxidase* (pp. 381–393). [https://doi.org/10.1007/978-94-011-0357-2\\_47](https://doi.org/10.1007/978-94-011-0357-2_47)
- Austin, S., Bingham, E. T., Mathews, D. E., Shahan, M. N., Will, J., & Burgess, R. R. (1995b). Production and field performance of transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) expressing alpha-amylase and manganese-dependent lignin peroxidase. *Euphytica*, 85(1–3), 381–393. <https://doi.org/10.1007/BF00023971>
- Baral, R., Lollato, R. P., Bhandari, K., & Min, D. (2022). Yield gap analysis of rainfed alfalfa in the United States. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.931403>

- Barry, T. N., & McNabb, W. C. (1999). The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *The British Journal of Nutrition*, 81(4), 263–272.
- Bartlett, M. S., & Haldane, J. B. S. (1934). The theory of inbreeding in autotetraploids. *Journal of Genetics*, 29(2), 175–180. <https://doi.org/10.1007/BF02982194>
- Bates, G. W. (1995). Chapter 26 Electroporation of Plant Protoplasts and Tissues (pp. 363–373). [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)61043-2](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)61043-2)
- Bent, A. (2006). <i>Arabidopsis thaliana</i> Floral Dip Transformation Method. In *Agrobacterium Protocols* (Vol. 343, pp. 87–104). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:87>
- Berken, A. (2006). ROPs in the spotlight of plant signal transduction. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(21), 2446–2459. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6197-1>
- Berken, A., Thomas, C., & Wittinghofer, A. (2005). A new family of RhoGEFs activates the Rop molecular switch in plants. *Nature*, 436(7054), 1176–1180. <https://doi.org/10.1038/nature03883>
- Berken, A., & Wittinghofer, A. (2008). Structure and function of Rho-type molecular switches in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(3), 380–393. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.008>
- Bingham, E. T., Hurley, L. V., Kaatz, D. M., & Saunders, J. W. (1975). Breeding Alfalfa Which Regenerates from Callus Tissue in Culture<sup>1</sup>. *Crop Science*, 15(5), 719–721. <https://doi.org/10.2135/cropsci1975.0011183X001500050032x>
- Bingham, E. T., McCoy, T. J., & Walker, K. A. (2015). *Alfalfa Tissue Culture* (pp. 903–929). <https://doi.org/10.2134/agronmonogr29.c29>
- Birch, R., & Franks, T. (1991). Development and Optimisation of Microprojectile Systems for Plant Genetic Transformation. *Functional Plant Biology*, 18(5), 453. <https://doi.org/10.1071/PP9910453>
- Blondon, F., Marie, D., Brown, S., & Kondorosi, A. (1994). Genome size and base composition in *Medicago sativa* and *M. truncatula* species. *Genome*, 37(2), 264–270. <https://doi.org/10.1139/g94-037>
- Bolton, J. L., Goplen, B. P., & Baenziger, H. (2015). *World Distribution and Historical Developments* (pp. 1–34). <https://doi.org/10.2134/agronmonogr15.c1>
- Bora, K. S., & Sharma, A. (2011). Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: A review. *Pharmaceutical Biology*, 49(2), 211–220. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.504732>

- Borg, S., Pødenphant, L., Jensen, T. J., & Poulsen, C. (1999). Plant cell growth and differentiation may involve GAP regulation of Rac activity. *FEBS Letters*, *453*(3), 341–345. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00750-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00750-4)
- Boulter, E., & Garcia-Mata, R. (2010). RhoGDI: A rheostat for the Rho switch. *Small GTPases*, *1*(1), 65–68. <https://doi.org/10.4161/sgtp.1.1.12990>
- Boureux, A., Vignal, E., Faure, S., & Fort, P. (2007). Evolution of the Rho Family of Ras-Like GTPases in Eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution*, *24*(1), 203–216. <https://doi.org/10.1093/molbev/msl145>
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., & McCormick, F. (1991a). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, *349*(6305), 117–127. <https://doi.org/10.1038/349117a0>
- Bourne, H. R., Sanders, D. A., & McCormick, F. (1991b). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, *349*(6305), 117–127. <https://doi.org/10.1038/349117a0>
- Bracha-Drori, K., Shichrur, K., Lubetzky, T. C., & Yalovsky, S. (2008). Functional Analysis of Arabidopsis Postprenylation CaaX Processing Enzymes and Their Function in Subcellular Protein Targeting. *Plant Physiology*, *148*(1), 119–131. <https://doi.org/10.1104/pp.108.120477>
- Brembu, T., Winge, P., Bones, A. M., & Yang, Z. (2006a). A RHOse by any other name: a comparative analysis of animal and plant Rho GTPases. *Cell Research*, *16*(5), 435–445. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310055>
- Brembu, T., Winge, P., Bones, A. M., & Yang, Z. (2006b). A RHOse by any other name: a comparative analysis of animal and plant Rho GTPases. *Cell Research*, *16*(5), 435–445. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310055>
- Brink, G. E., & Marten, G. C. (1989). Harvest Management of Alfalfa-Nutrient Yield vs. Forage Quality, and Relationship to Persistence. *Journal of Production Agriculture*, *2*(1), 32–36. <https://doi.org/10.2134/jpa1989.0032>
- Brink, G., Hall, M., Shewmaker, G., Undersander, D., Martin, N., & Walgenbach, R. (2010). Changes in Alfalfa Yield and Nutritive Value within Individual Harvest Periods. *Agronomy Journal*, *102*(4), 1274–1282. <https://doi.org/10.2134/agronj2010.0080>
- Broderick, G. A. (1985). Alfalfa Silage or Hay Versus Corn Silage as the Sole Forage for Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, *68*(12), 3262–3271. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(85\)81235-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)81235-2)

- Brown, D. C. W., & Atanassov, A. (1985). Role of genetic background in somatic embryogenesis in Medicago. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 4(2), 111–122. <https://doi.org/10.1007/BF00042269>
- Brown, D. E., & Bingham, E. T. (1994). Selfing in an Alfalfa Seed Production Field. *Crop Science*, 34(4), 1110–1112. <https://doi.org/10.2135/cropsci1994.0011183X003400040050x>
- Brown, P. W., & Tanner, C. B. (1983). Alfalfa Stem and Leaf Growth during Water Stress<sup>1</sup>. *Agronomy Journal*, 75(5), 799–805. <https://doi.org/10.2134/agronj1983.00021962007500050017x>
- Brummer, E. C., & Bouton, J. H. (1991). Plant Traits Associated with Grazing-Tolerant Alfalfa. *Agronomy Journal*, 83(6), 996–1000. <https://doi.org/10.2134/agronj1991.00021962008300060014x>
- Brummer, E. C., & Bouton, J. H. (1992). Physiological Traits Associated with Grazing-Tolerant Alfalfa. *Agronomy Journal*, 84(2), 138–143. <https://doi.org/10.2134/agronj1992.00021962008400020003x>
- Burezq, H. (2022). Reproductive Ecology of Forage Alfalfa (*Medicago sativa* L.): Recent Advances. In *Plant Reproductive Ecology - Recent Advances*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.100640>
- Busbice, T. H. (1969). Inbreeding in Synthetic Varieties<sup>1</sup>. *Crop Science*, 9(5), 601–604. <https://doi.org/10.2135/cropsci1969.0011183X000900050026x>
- Cao, X., Xie, H., Song, M., Lu, J., Ma, P., Huang, B., Wang, M., Tian, Y., Chen, F., Peng, J., Lang, Z., Li, G., & Zhu, J.-K. (2023). Cut–dip–budding delivery system enables genetic modifications in plants without tissue culture. *The Innovation*, 4(1), 100345. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2022.100345>
- Chalfie, M. (1995). GREEN FLUORESCENT PROTEIN. *Photochemistry and Photobiology*, 62(4), 651–656. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1995.tb08712.x>
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994). Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science*, 263(5148), 802–805. <https://doi.org/10.1126/science.8303295>
- Chen, B., Sun, Y., Niu, J., Jarugumilli, G. K., & Wu, X. (2018). Protein Lipidation in Cell Signaling and Diseases: Function, Regulation, and Therapeutic Opportunities. *Cell Chemical Biology*, 25(7), 817–831. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.05.003>
- Chen, F., & Dixon, R. A. (2007). Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nature Biotechnology*, 25(7), 759–761. <https://doi.org/10.1038/nbt1316>



- Chen, H., Zeng, Y., Yang, Y., Huang, L., Tang, B., Zhang, H., Hao, F., Liu, W., Li, Y., Liu, Y., Zhang, X., Zhang, R., Zhang, Y., Li, Y., Wang, K., He, H., Wang, Z., Fan, G., Yang, H., ... Qiu, Q. (2020). Allele-aware chromosome-level genome assembly and efficient transgene-free genome editing for the autotetraploid cultivated alfalfa. *Nature Communications*, *11*(1), 2494. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16338-x>
- Chen, X., Naramoto, S., Robert, S., Tejos, R., Löffke, C., Lin, D., Yang, Z., & Friml, J. (2012). ABP1 and ROP6 GTPase Signaling Regulate Clathrin-Mediated Endocytosis in Arabidopsis Roots. *Current Biology*, *22*(14), 1326–1332. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.020>
- Chowrira, G. M., Akella, V., & Lurquin, P. F. (1995). Electroporation-mediated gene transfer into intact nodal meristems in planta. *Molecular Biotechnology*, *3*(1), 17–23. <https://doi.org/10.1007/BF02821331>
- Christou, P. (1992). Genetic transformation of crop plants using microprojectile bombardment. *The Plant Journal*, *2*(3), 275–281. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1992.00275.x>
- Collins, M., Lang, D. J., & Kelling, K. A. (1986). Effects of Phosphorus, Potassium, and Sulfur on Alfalfa Nitrogen-Fixation under Field Conditions <sup>2</sup>. *Agronomy Journal*, *78*(6), 959–963. <https://doi.org/10.2134/agronj1986.00021962007800060005x>
- Cox, A. D., & Der, C. J. (2002). Ras Family Signaling: Therapeutic Targeting. *Cancer Biology & Therapy*, *1*(6), 599–606. <https://doi.org/10.4161/cbt.306>
- Crea, F., Bellucci, M., Damiani, F., & Arcioni, S. (1995). Genetic control of somatic embryogenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L. cv. Adriana). *Euphytica*, *81*(2), 151–155. <https://doi.org/10.1007/BF00025427>
- Curtin, S. J., Miller, S. S., Dornbusch, M. R., Farmer, A. D., & Gutierrez-Gonzalez, J. (2021). *Targeted Mutagenesis of Alfalfa* (pp. 271–283). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-74466-3\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-030-74466-3_16)
- Curtin, S. J., Xiong, Y., Michno, J., Campbell, B. W., Stec, A. O., Čermák, T., Starker, C., Voytas, D. F., Eamens, A. L., & Stupar, R. M. (2018). <scp>CRISPR</scp>/Cas9 and <scp>TALEN</scp> s generate heritable mutations for genes involved in small <scp>RNA</scp> processing of *Glycine max* and *Medicago truncatula*. *Plant Biotechnology Journal*, *16*(6), 1125–1137. <https://doi.org/10.1111/pbi.12857>
- D'Aoust, M. (2004). *Efficient and reliable production of pharmaceuticals in alfalfa. Molecular Farming: Plant-Made Pharmaceuticals and Technical Proteins* (R. Fischer & S. Schillberg, Eds.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/3527603638>
- Deinum, E. E., & Jacobs, B. (2024). Rho of Plants patterning: linking mathematical models and molecular diversity. *Journal of Experimental Botany*, *75*(5), 1274–1288. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad447>

- DerMardirossian, C., & Bokoch, G. M. (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends in Cell Biology*, *15*(7), 356–363. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.05.001>
- Desgagnés, R., Laberge, S., Allard, G., Khoudi, H., Castonguay, Y., Lapointe, J., Michaud, R., & Vézina, L.-P. (1995). Genetic transformation of commercial breeding lines of alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *42*(2), 129–140. <https://doi.org/10.1007/BF00034229>
- Dewey, D. R. (1966). Inbreeding Depression in Diploid, Tetraploid, and Hexaploid Crested Wheatgrass<sup>1</sup>. *Crop Science*, *6*(2), 144–147. <https://doi.org/10.2135/cropsci1966.0011183X000600020011x>
- D'Halluin, K., Botterman, J., & De Greef, W. (1990). Engineering of Herbicide-Resistant Alfalfa and Evaluation under Field Conditions. *Crop Science*, *30*(4), 866–871. <https://doi.org/10.2135/cropsci1990.0011183X003000040020x>
- Diatta, A. A., Min, D., & Jagadish, S. V. K. (2021). *Drought stress responses in non-transgenic and transgenic alfalfa—Current status and future research directions* (pp. 35–100). <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2021.06.002>
- Dieterich Mabin, M. E., Brunet, J., Riday, H., & Lehmann, L. (2021). Self-Fertilization, Inbreeding, and Yield in Alfalfa Seed Production. *Frontiers in Plant Science*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.700708>
- Du, S., Erickson, L., & Bowley, S. (1994a). Effect of plant genotype on the transformation of cultivated alfalfa (*Medicago sativa*) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, *13*(6). <https://doi.org/10.1007/BF00232631>
- Du, S., Erickson, L., & Bowley, S. (1994b). Effect of plant genotype on the transformation of cultivated alfalfa (*Medicago sativa*) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, *13*(6). <https://doi.org/10.1007/BF00232631>
- Duan, Q., Kita, D., Li, C., Cheung, A. Y., & Wu, H.-M. (2010). FERONIA receptor-like kinase regulates RHO GTPase signaling of root hair development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(41), 17821–17826. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005366107>
- Elmayan, T., & Vaucheret, H. (1996a). Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *The Plant Journal*, *9*(6), 787–797. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.9060787.x>
- Elmayan, T., & Vaucheret, H. (1996b). Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *The Plant Journal*, *9*(6), 787–797. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.9060787.x>

- Fehér, A. (2015). Somatic embryogenesis — Stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(4), 385–402. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.07.005>
- Feiguelman, G., Fu, Y., & Yalovsky, S. (2018). ROP GTPases Structure-Function and Signaling Pathways. *Plant Physiology*, 176(1), 57–79. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01415>
- Firdaous, L., Dhulster, P., Amiot, J., Doyen, A., Lutin, F., Vézina, L.-P., & Bazinet, L. (2010). Investigation of the large-scale bioseparation of an antihypertensive peptide from alfalfa white protein hydrolysate by an electromembrane process. *Journal of Membrane Science*, 355(1–2), 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2010.03.018>
- Fowler, J. E. (2010). *Integrated G Proteins Signaling in Plants* (S. Yalovsky, F. Baluška, & A. Jones, Eds.). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-03524-1>
- Fraga, H. P. F., Vieira, L. N., Caprestano, C. A., Steinmacher, D. A., Micke, G. A., Spudeit, D. A., Pescador, R., & Guerra, M. P. (2012). 5-Azacytidine combined with 2,4-D improves somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret by means of changes in global DNA methylation levels. *Plant Cell Reports*, 31(12), 2165–2176. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1327-8>
- Fromm, M., Callis, J., Taylor, L. P., & Walbot, V. (1987). *Electroporation of DNA and RNA into plant protoplasts* (pp. 351–366). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)53064-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)53064-6)
- Fromm, M. E., Taylor, L. P., & Walbot, V. (1986). Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature*, 319(6056), 791–793. <https://doi.org/10.1038/319791a0>
- Fromm, M., & Walbot, V. (1987). *Transient Expression of DNA in Plant Cells* (pp. 303–310). [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6977-3\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6977-3_13)
- Fu, C., Hernandez, T., Zhou, C., & Wang, Z.-Y. (2015). *Alfalfa (Medicago sativa L.)* (pp. 213–221). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1695-5\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1695-5_17)
- Fu, Y. (2015). The cytoskeleton in the pollen tube. *Current Opinion in Plant Biology*, 28, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.10.004>
- Fu, Y., Gu, Y., Zheng, Z., Wasteneys, G., & Yang, Z. (2005). Arabidopsis Interdigitating Cell Growth Requires Two Antagonistic Pathways with Opposing Action on Cell Morphogenesis. *Cell*, 120(5), 687–700. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.026>

- Fu, Y., Xu, T., Zhu, L., Wen, M., & Yang, Z. (2009). A ROP GTPase Signaling Pathway Controls Cortical Microtubule Ordering and Cell Expansion in Arabidopsis. *Current Biology*, *19*(21), 1827–1832. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.08.052>
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, *50*(1), 151–158. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5)
- Gao, Y., Zhang, Y., Wu, H.-Z., Min, X., Zhang, B., Kim, D.-S., Yan, X., & Zhang, C.-J. (2024). Optimization and establishment of Agrobacterium-mediated transformation in alfalfa (*Medicago sativa* L.) using eGFP as a visual reporter. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *156*(1), 7. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02659-4>
- Gawel, E., Grzelak, M., & Janyszek, M. (2017). Lucerne (*Medicago sativa* L.) in the human diet—Case reports and short reports. *Journal of Herbal Medicine*, *10*, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2017.07.002>
- Gelvin, S. B. (2006). <i>Agrobacterium</i> Transformation of <i>Arabidopsis thaliana</i> Roots: A Quantitative Assay. In *Agrobacterium Protocols* (pp. 105–114). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:105>
- Gelvin, S. B. (2017). Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the Plant Genome. *Annual Review of Genetics*, *51*(1), 195–217. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035320>
- Goff, S. A., Klein, T. M., Roth, B. A., Fromm, M. E., Cone, K. C., Radicella, J. P., & Chandler, V. L. (1990). Transactivation of anthocyanin biosynthetic genes following transfer of B regulatory genes into maize tissues. *The EMBO Journal*, *9*(8), 2517–2522. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07431.x>
- Gopinath, K. A., Saha, S., Mina, B. L., Pande, H., Kundu, S., & Gupta, H. S. (2008). Influence of organic amendments on growth, yield and quality of wheat and on soil properties during transition to organic production. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, *82*(1), 51–60. <https://doi.org/10.1007/s10705-008-9168-0>
- Gough, K. C., Hawes, W. S., Kilpatrick, J., & Whitelam, G. C. (2001). Cyanobacterial GR6 glutamate-1-semialdehyde aminotransferase: a novel enzyme-based selectable marker for plant transformation. *Plant Cell Reports*, *20*(4), 296–300. <https://doi.org/10.1007/s002990100337>
- Gu, Y., Fu, Y., Dowd, P., Li, S., Vernoud, V., Gilroy, S., & Yang, Z. (2005). A Rho family GTPase controls actin dynamics and tip growth via two counteracting downstream pathways in pollen tubes. *The Journal of Cell Biology*, *169*(1), 127–138. <https://doi.org/10.1083/jcb.200409140>

- Gurich, N., & González, J. E. (2009). Role of Quorum Sensing in *Sinorhizobium meliloti* -Alfalfa Symbiosis. *Journal of Bacteriology*, *191*(13), 4372–4382. <https://doi.org/10.1128/JB.00376-09>
- Gyeryeong, B., & Lee, J.-T. (2021). Effects of Alfalfa Cultivation on Soil Erosion and Maize Production in Highland Agriculture. *Journal of Environmental Science International*, *30*(2), 145–152. <https://doi.org/10.5322/JESI.2021.30.2.145>
- Hernández-Fernández, M. M., & Christie, B. R. (1989). Inheritance of somatic embryogenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Genome*, *32*(2), 318–321. <https://doi.org/10.1139/g89-447>
- Hoekema, A., Hirsch, P. R., Hooykaas, P. J. J., & Schilperoort, R. A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, *303*(5913), 179–180. <https://doi.org/10.1038/303179a0>
- Ivanchenko, M., Vejlupkova, Z., Quatrano, R. S., & Fowler, J. E. (2000). Maize ROP7 GTPase contains a unique, CaaX box-independent plasma membrane targeting signal. *The Plant Journal*, *24*(1), 79–90. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00855.x>
- Jacobs, B., Molenaar, J., & Deinum, E. E. (2019). Small GTPase patterning: How to stabilise cluster coexistence. *PLOS ONE*, *14*(3), e0213188. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213188>
- Jaffe, A. B., & Hall, A. (2005). RHO GTPASES: Biochemistry and Biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *21*(1), 247–269. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721>
- Janssen, B.-J., & Gardner, R. C. (1990). Localized transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium*. *Plant Molecular Biology*, *14*(1), 61–72. <https://doi.org/10.1007/BF00015655>
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, *6*(13), 3901–3907. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02730.x>
- Johnson, R. C., & Tieszen, L. L. (1994). Variation for Water-Use Efficiency in Alfalfa Germplasm. *Crop Science*, *34*(2), 452–458. <https://doi.org/10.2135/cropsci1994.0011183X003400020027x>
- Jones, H. D., & Sparks, C. A. (2009). *Stable Transformation of Plants* (pp. 111–130). [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-427-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-427-8_7)

- Jones, M. A., Shen, J.-J., Fu, Y., Li, H., Yang, Z., & Grierson, C. S. (2002). The Arabidopsis Rop2 GTPase Is a Positive Regulator of Both Root Hair Initiation and Tip Growth. *The Plant Cell*, *14*(4), 763–776. <https://doi.org/10.1105/tpc.010359>
- Kahn, R. A., Der, C. J., & Bokoch, G. M. (1992). The ras superfamily of GTP-binding proteins: guidelines on nomenclature. *The FASEB Journal*, *6*(8), 2512–2513. <https://doi.org/10.1096/fasebj.6.8.1592203>
- Karimi, M., Bleys, A., Vanderhaeghen, R., & Hilson, P. (2007). Building Blocks for Plant Gene Assembly. *Plant Physiology*, *145*(4), 1183–1191. <https://doi.org/10.1104/pp.107.110411>
- Karimi, M., De Meyer, B., & Hilson, P. (2005). Modular cloning in plant cells. *Trends in Plant Science*, *10*(3), 103–105. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.01.008>
- Karlen, D. L., Erbach, D. C., Kaspar, T. C., Colvin, T. S., Berry, E. C., & Timmons, D. R. (1990). Soil Tillage: A Review of Past Perceptions and Future Needs. *Soil Science Society of America Journal*, *54*(1), 153–161. <https://doi.org/10.2136/sssaj1990.03615995005400010024x>
- Kausch, A. P., Nelson-Vasilchik, K., Hague, J., Mookkan, M., Quemada, H., Dellaporta, S., Fragoso, C., & Zhang, Z. J. (2019). Edit at will: Genotype independent plant transformation in the era of advanced genomics and genome editing. *Plant Science*, *281*, 186–205. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.01.006>
- Kawashima, T., Maruyama, D., Shagirov, M., Li, J., Hamamura, Y., Yelagandula, R., Toyama, Y., & Berger, F. (2014a). Dynamic F-actin movement is essential for fertilization in Arabidopsis thaliana. *ELife*, *3*. <https://doi.org/10.7554/eLife.04501>
- Kawashima, T., Maruyama, D., Shagirov, M., Li, J., Hamamura, Y., Yelagandula, R., Toyama, Y., & Berger, F. (2014b). Dynamic F-actin movement is essential for fertilization in Arabidopsis thaliana. *ELife*, *3*. <https://doi.org/10.7554/eLife.04501>
- Kielly, G. A., & Bowley, S. R. (1992). Genetic control of somatic embryogenesis in alfalfa. *Genome*, *35*(3), 474–477. <https://doi.org/10.1139/g92-070>
- Kikkert, J. R., Vidal, J. R., & Reisch, B. I. (2005). Stable Transformation of Plant Cells by Particle Bombardment/Biolistics. In *Transgenic Plants* (Vol. 286, pp. 061–078). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-827-7:061>
- Kineman, B. D., Brummer, E. C., Paiva, N. L., & Birt, D. F. (2010). Resveratrol From Transgenic Alfalfa for Prevention of Aberrant Crypt Foci in Mice. *Nutrition and Cancer*, *62*(3), 351–361. <https://doi.org/10.1080/01635580903407213>
- Kjøller, L., & Hall, A. (1999). Signaling to Rho GTPases. *Experimental Cell Research*, *253*(1), 166–179. <https://doi.org/10.1006/excr.1999.4674>

- Klein, T. M., Gradziel, T., Fromm, M. E., & Sanford, J. C. (1988). Factors Influencing Gene Delivery into Zea Mays Cells by High-Velocity Microprojectiles. *Nature Biotechnology*, 6(5), 559–563. <https://doi.org/10.1038/nbt0588-559>
- Klinkenberg, J. (2014). Extraction of Chloroplast Proteins from Transiently Transformed *Nicotiana benthamiana* Leaves. *BIO-PROTOCOL*, 4(18). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1238>
- Kuchuk, N., Komarnitski, I., Shakhovskiy, A., & Gleba, Y. (1990). Genetic transformation of *Medicago* species by *Agrobacterium tumefaciens* and electroporation of protoplasts. *Plant Cell Reports*, 8(11), 660–663. <https://doi.org/10.1007/BF00269987>
- Kumar, M., Tomar, M., Potkule, J., Reetu, Punia, S., Dhakane-Lad, J., Singh, S., Dhumal, S., Chandra Pradhan, P., Bhushan, B., Anitha, T., Alajil, O., Alhariri, A., Amarowicz, R., & Kennedy, J. F. (2022). Functional characterization of plant-based protein to determine its quality for food applications. *Food Hydrocolloids*, 123, 106986. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106986>
- Kumar, S. (2011). Biotechnological advancements in alfalfa improvement. *Journal of Applied Genetics*, 52(2), 111–124. <https://doi.org/10.1007/s13353-011-0028-2>
- Kumar, T., Bao, A.-K., Bao, Z., Wang, F., Gao, L., & Wang, S.-M. (2018a). The progress of genetic improvement in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 54(2), 41–51. <https://doi.org/10.17221/46/2017-CJGPB>
- Kumar, T., Bao, A.-K., Bao, Z., Wang, F., Gao, L., & Wang, S.-M. (2018b). The progress of genetic improvement in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 54(2), 41–51. <https://doi.org/10.17221/46/2017-CJGPB>
- Kumar, T., Bao, A.-K., Bao, Z., Wang, F., Gao, L., & Wang, S.-M. (2018c). The progress of genetic improvement in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 54(2), 41–51. <https://doi.org/10.17221/46/2017-CJGPB>
- Lai, F.-M., & McKersie, B. D. (1994a). Scale-up of somatic embryogenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L.) I subculture and indirect secondary somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37(2), 151–158. <https://doi.org/10.1007/BF00043609>
- Lai, F.-M., & McKersie, B. D. (1994b). Scale-up of somatic embryogenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L.) I subculture and indirect secondary somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37(2), 151–158. <https://doi.org/10.1007/BF00043609>
- Lavy, M., Bracha-Drori, K., Sternberg, H., & Yalovsky, S. (2002). A Cell-Specific, Prenylation-Independent Mechanism Regulates Targeting of Type II RACs. *The Plant Cell*, 14(10), 2431–2450. <https://doi.org/10.1105/tpc.005561>

- Lavy, M., & Yalovsky, S. (2006). Association of Arabidopsis type-II ROPs with the plasma membrane requires a conserved C-terminal sequence motif and a proximal polybasic domain. *The Plant Journal*, *46*(6), 934–947. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02749.x>
- Lei, Y., Hannoufa, A., & Yu, P. (2017a). The Use of Gene Modification and Advanced Molecular Structure Analyses towards Improving Alfalfa Forage. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(2), 298. <https://doi.org/10.3390/ijms18020298>
- Lei, Y., Hannoufa, A., & Yu, P. (2017b). The Use of Gene Modification and Advanced Molecular Structure Analyses towards Improving Alfalfa Forage. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(2), 298. <https://doi.org/10.3390/ijms18020298>
- Li, C., Lu, H., Li, W., Yuan, M., & Fu, Y. (2017). A ROP2-RIC1 pathway fine-tunes microtubule reorganization for salt tolerance in Arabidopsis. *Plant, Cell & Environment*, *40*(7), 1127–1142. <https://doi.org/10.1111/pce.12905>
- Li, H., Wu, G., Ware, D., Davis, K. R., & Yang, Z. (1998). Arabidopsis Rho-Related GTPases: Differential Gene Expression in Pollen and Polar Localization in Fission Yeast. *Plant Physiology*, *118*(2), 407–417. <https://doi.org/10.1104/pp.118.2.407>
- Li, J.-F., Park, E., von Arnim, A. G., & Nebenführ, A. (2009). The FAST technique: a simplified Agrobacterium-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of Arabidopsis and other plant species. *Plant Methods*, *5*(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-5-6>
- Li, L., & Yuan, H. (2013). Chromoplast biogenesis and carotenoid accumulation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *539*(2), 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.07.002>
- Li, Q., Liu, G.-B., Zhang, Z., Tuo, D.-F., Bai, R., & Qiao, F. (2017). Relative contribution of root physical enlacing and biochemical exudates to soil erosion resistance in the Loess soil. *CATENA*, *153*, 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2017.01.037>
- Li, X., & Brummer, E. C. (2009). Inbreeding Depression for Fertility and Biomass in Advanced Generations of Inter- and Intraspecific Hybrids of Tetraploid Alfalfa. *Crop Science*, *49*(1), 13–19. <https://doi.org/10.2135/cropsci2008.04.0205>
- Li, X., & Brummer, E. C. (2012). Applied Genetics and Genomics in Alfalfa Breeding. *Agronomy*, *2*(1), 40–61. <https://doi.org/10.3390/agronomy2010040>
- Li, X., Cai, W., Liu, Y., Li, H., Fu, L., Liu, Z., Xu, L., Liu, H., Xu, T., & Xiong, Y. (2017). Differential TOR activation and cell proliferation in *Arabidopsis* root and shoot apices. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(10), 2765–2770. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618782114>



- Li, X., Weng, J., & Chapple, C. (2008). Improvement of biomass through lignin modification. *The Plant Journal*, *54*(4), 569–581. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03457.x>
- Li, Y., & Su, D. (2017). Alfalfa Water Use and Yield under Different Sprinkler Irrigation Regimes in North Arid Regions of China. *Sustainability*, *9*(8), 1380. <https://doi.org/10.3390/su9081380>
- Li, Z., Li, Z., Gao, X., Chinnusamy, V., Bressan, R., Wang, Z., Zhu, J., Wu, J., & Liu, D. (2012). ROP11 GTPase Negatively Regulates ABA Signaling by Protecting ABI1 Phosphatase Activity from Inhibition by the ABA Receptor RCAR1/PYL9 in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology*, *54*(3), 180–188. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2012.01101.x>
- Lin, D., Nagawa, S., Chen, J., Cao, L., Chen, X., Xu, T., Li, H., Dhonukshe, P., Yamamuro, C., Friml, J., Scheres, B., Fu, Y., & Yang, Z. (2012). A ROP GTPase-Dependent Auxin Signaling Pathway Regulates the Subcellular Distribution of PIN2 in *Arabidopsis* Roots. *Current Biology*, *22*(14), 1319–1325. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.019>
- Lin, Y., Wang, Y., Zhu, J. K., & Yang, Z. (1996). Localization of a Rho GTPase Implies a Role in Tip Growth and Movement of the Generative Cell in Pollen Tubes. *The Plant Cell*, 293–303. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.2.293>
- Lin, Y., Zeng, Y., Zhu, Y., Shen, J., Ye, H., & Jiang, L. (2021). Plant Rho GTPase signaling promotes autophagy. *Molecular Plant*, *14*(6), 905–920. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.03.021>
- Lindenmayer, R. B., Hansen, N. C., Brummer, J., & Pritchett, J. G. (2011). Deficit Irrigation of Alfalfa for Water-Savings in the Great Plains and Intermountain West: A Review and Analysis of the Literature. *Agronomy Journal*, *103*(1), 45–50. <https://doi.org/10.2134/agronj2010.0224>
- Liu, W., Chen, A., Luo, L., Sun, J., Cao, L., Yu, G., Zhu, J., & Wang, Y. (2010). Characterization and Expression Analysis of *Medicago truncatula* ROP GTPase Family during the Early Stage of Symbiosis. *Journal of Integrative Plant Biology*, *52*(7), 639–652. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00944.x>
- Liu, W., Liang, Z., Shan, C., Marsolais, F., & Tian, L. (2013). Genetic transformation and full recovery of alfalfa plants via secondary somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *49*(1), 17–23. <https://doi.org/10.1007/s11627-012-9463-y>
- Long-Xi Y, & Chittaranjan K. (2021). *The Alfalfa Genome* (L.-X. Yu & C. Kole, Eds.). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-74466-3>

- Mariotti D, Davey M. R., Draper J, Freeman J. P., & Cocking E. C. (1984). Crown Gall Tumorigenesis in the Forage Legume & *Medicago sativa* L. *Plant and Cell Physiology*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076736>
- Marten, G. C. (2015). *Breeding Forage Grasses to Maximize Animal Performance* (pp. 71–104). <https://doi.org/10.2135/cssaspecpub15.c6>
- Marten, G. C., Buxton, D. R., & Barnes, R. F. (2015). *Feeding Value (Forage Quality)* (pp. 463–491). <https://doi.org/10.2134/agronmonogr29.c14>
- Mendrinna, A., & Persson, S. (2015). Root hair growth: it's a one way street. *F1000Prime Reports*, 7. <https://doi.org/10.12703/P7-23>
- Michalczyk, M., Fiutak, G., & Tarko, T. (2019). Effect of hot water treatment of seeds on quality indicators of alfalfa sprouts. *LWT*, 113, 108270. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108270>
- Min, D. (2016). Effects of Cutting Interval between Harvests on Dry Matter Yield and Nutritive Value in Alfalfa. *American Journal of Plant Sciences*, 07(08), 1226–1231. <https://doi.org/10.4236/ajps.2016.78118>
- Mlynarova, L., Keizer, LCP., Stiekema, W. J., & Nap, J. P. (1996). Approaching the Lower Limits of Transgene Variability. *The Plant Cell*, 1589–1599. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.9.1589>
- Mohammadi-Nasab, A., Motallebi-Azar, A., Movafeghi, A., & Dadpour, M. (2011). Callus induction and embryogenesis of alfalfa (*Medicago sativa* L.) using hypocotyl thin cell layer culture. *Russian Agricultural Sciences*, 37(4), 303–306. <https://doi.org/10.3103/S1068367411040148>
- Molendijk, A. J. (2001). Arabidopsis thaliana Rop GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth. *The EMBO Journal*, 20(11), 2779–2788. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.11.2779>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nelson, B. K., Cai, X., & Nebenführ, A. (2007). A multicolored set of *in vivo* organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *The Plant Journal*, 51(6), 1126–1136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03212.x>
- Nelson, W. F., & Satter, L. D. (1990). Effect of Stage of Maturity and Method of Preservation of Alfalfa on Production by Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 73(7), 1800–1811. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78860-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78860-1)

- Nelson, W. F., & Satter, L. D. (1992). Impact of Alfalfa Maturity and Preservation Method on Milk Production by Cows in Early Lactation. *Journal of Dairy Science*, 75(6), 1562–1570. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77913-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77913-2)
- Nigg, E. A. (1997). Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature*, 386(6627), 779–787. <https://doi.org/10.1038/386779a0>
- Ninković, S., Miljuš-Djukić, J., & Nešković, M. (1995). Genetic transformation of alfalfa somatic embryos and their clonal propagation through repetitive somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 42(3), 255–260. <https://doi.org/10.1007/BF00029996>
- Nitsch, J. P., & Nitsch, C. (1969). Haploid Plants from Pollen Grains. *Science*, 163(3862), 85–87. <https://doi.org/10.1126/science.163.3862.85>
- Ozyigit, I. I. (2020). Gene transfer to plants by electroporation: methods and applications. *Molecular Biology Reports*, 47(4), 3195–3210. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05343-4>
- Parada, L. F., Tabin, C. J., Shih, C., & Weinberg, R. A. (1982). Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature*, 297(5866), 474–478. <https://doi.org/10.1038/297474a0>
- Pereira, L. F., & Erickson, L. (1995a). Stable transformation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) by particle bombardment. *Plant Cell Reports*, 14(5). <https://doi.org/10.1007/BF00232030>
- Pereira, L. F., & Erickson, L. (1995b). Stable transformation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) by particle bombardment. *Plant Cell Reports*, 14(5). <https://doi.org/10.1007/BF00232030>
- Perfect, E., Kay, B. D., van Loon, W. K. P., Sheard, R. W., & Pojasok, T. (1990). Rates of Change in Soil Structural Stability under Forages and Corn. *Soil Science Society of America Journal*, 54(1), 179–186. <https://doi.org/10.2136/sssaj1990.03615995005400010028x>
- Perhald, A., Endre, G., Kevei, Z., Kiss, G. B., & Kereszt, A. (2006). Strategies to obtain stable transgenic plants from non-embryogenic lines: complementation of the nn 1 mutation of the NOR1 gene in *Medicago sativa* MN1008. *Plant Cell Reports*, 25(8), 799–806. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0117-6>
- Poraty-Gavra, L., Zimmermann, P., Haigis, S., Bednarek, P., Hazak, O., Stelmakh, O. R., Sadot, E., Schulze-Lefert, P., Gruissem, W., & Yalovsky, S. (2013). The Arabidopsis Rho of Plants GTPase AtROP6 Functions in Developmental and Pathogen Response Pathways. *Plant Physiology*, 161(3), 1172–1188. <https://doi.org/10.1104/pp.112.213165>

- Potrykus, I. (1991). Gene Transfer to Plants: Assessment of Published Approaches and Results. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42(1), 205–225. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.001225>
- Qin, Y., & Yang, Z. (2011). Rapid tip growth: Insights from pollen tubes. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 22(8), 816–824. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.06.004>
- Quecini, V. M. (1999). *Transferência direta de genes para plantas de <i>Stylosanthes guianensis</i> (Aubl.) Sw.* [Universidade de São Paulo]. <https://doi.org/10.11606/T.11.1999.tde-20210104-194445>
- Quecini, V. M., Oliveira, C. A. de, Alves, A. C., & Vieira, M. L. C. (2002). Factors influencing electroporation-mediated gene transfer to *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. protoplasts. *Genetics and Molecular Biology*, 25(1), 73–80. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572002000100014>
- Quiros, C. F., & Bauchan, G. R. (2015). *The Genus Medicago and the Origin of the Medicago sativa Comp* (pp. 93–124). <https://doi.org/10.2134/agronmonogr29.c3>
- Reiner, D. J. (2018). Small GTPases. *WormBook*, 1–65. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.67.2>
- Riday, H., Reisen, P., Raasch, J. A., Santa-Martinez, E., & Brunet, J. (2015). Selfing Rate in an Alfalfa Seed Production Field Pollinated with Leafcutter Bees. *Crop Science*, 55(3), 1087–1095. <https://doi.org/10.2135/cropsci2014.04.0295>
- Ridley, A. J. (2001). Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends in Cell Biology*, 11(12), 471–477. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(01\)02153-5](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(01)02153-5)
- Rivero, L., Scholl, R., Holomuzki, N., Crist, D., Grotewold, E., & Brkljacic, J. (2014). *Handling Arabidopsis Plants: Growth, Preservation of Seeds, Transformation, and Genetic Crosses* (pp. 3–25). [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-580-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-580-4_1)
- Rooke, J. A., & Hatfield, R. D. (2015). *Biochemistry of Ensiling* (pp. 95–139). <https://doi.org/10.2134/agronmonogr42.c3>
- Rumbaugh, M. D., Caddel, J. L., & Rowe, D. E. (2015). *Breeding and Quantitative Genetics* (pp. 777–808). <https://doi.org/10.2134/agronmonogr29.c25>
- Russelle, M. (2001). Alfalfa. *American Scientist*, 89(3), 252. <https://doi.org/10.1511/2001.3.252>
- Samac, D. A. (1995). Strain specificity in transformation of alfalfa by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 43(3), 271–277. <https://doi.org/10.1007/BF00039955>

- Samac, D. A., & Austin-Phillips, S. (2006). Alfalfa (*Medicago sativa* L.). In *Agrobacterium Protocols* (Vol. 343, pp. 301–312). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:301>
- Samac, D. A., & Lamb, J. F. S. (2000). REGISTRATIONS OF GERMPLASM. *Crop Science*, 40(3), 863–863. <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.403863x>
- Sanford, J. C. (1990). Biolistic plant transformation. *Physiologia Plantarum*, 79(1), 206–209. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1990.790131.x>
- Sangra, A., Shahin, L., & Dhir, S. K. (2019a). Long-Term Maintainable Somatic Embryogenesis System in Alfalfa (*Medicago sativa*) Using Leaf Explants: Embryogenic Sustainability Approach. *Plants*, 8(8), 278. <https://doi.org/10.3390/plants8080278>
- Sangra, A., Shahin, L., & Dhir, S. K. (2019b). Optimization of Isolation and Culture of Protoplasts in Alfalfa (*Medicago sativa*) Cultivar Regen-SY. *American Journal of Plant Sciences*, 10(07), 1206–1219. <https://doi.org/10.4236/ajps.2019.107086>
- Saruul, P., Srienc, F., Somers, D. A., & Samac, D. A. (2002). Production of a Biodegradable Plastic Polymer, Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate, in Transgenic Alfalfa. *Crop Science*, 42(3), 919–927. <https://doi.org/10.2135/cropsci2002.9190>
- Sasaki, Y., Sone, T., Yoshida, S., Yahata, K., Hotta, J., Chesnut, J. D., Honda, T., & Imamoto, F. (2004). Evidence for high specificity and efficiency of multiple recombination signals in mixed DNA cloning by the Multisite Gateway system. *Journal of Biotechnology*, 107(3), 233–243. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.10.001>
- Saunders, J. W., & Bingham, E. T. (1972). Production of Alfalfa Plants from Callus Tissue<sup>1</sup>. *Crop Science*, 12(6), 804–808. <https://doi.org/10.2135/cropsci1972.0011183X001200060026x>
- Schasteen, C. S. (2024). Oilseeds, Legumes and Derived Products. In *Encyclopedia of Food Safety* (pp. 33–45). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822521-9.00159-3>
- Schenk, R. U., & Hildebrandt, A. C. (1972a). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, 50(1), 199–204. <https://doi.org/10.1139/b72-026>
- Schenk, R. U., & Hildebrandt, A. C. (1972b). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, 50(1), 199–204. <https://doi.org/10.1139/b72-026>
- Schepetilnikov, M., Makarian, J., Srour, O., Geldreich, A., Yang, Z., Chicher, J., Hammann, P., & Ryabova, L. A. (2017). <sc>GTP</sc> ase <sc>ROP</sc> 2

- binds and promotes activation of target of rapamycin, <sc>TOR</sc> , in response to auxin. *The EMBO Journal*, 36(7), 886–903.  
<https://doi.org/10.15252/emj.201694816>
- Schiene, K., Pühler, A., & Niehaus, K. (2000). Transgenic tobacco plants that express an antisense construct derived from a *Medicago sativa* cDNA encoding a Rac-related small GTP-binding protein fail to develop necrotic lesions upon elicitor infiltration. *Molecular and General Genetics MGG*, 263(5), 761–770.  
<https://doi.org/10.1007/s004380000248>
- Schmidt, W. K., Tam, A., Fujimura-Kamada, K., & Michaelis, S. (1998). Endoplasmic reticulum membrane localization of Rce1p and Ste24p, yeast proteases involved in carboxyl-terminal CAAX protein processing and amino-terminal a-factor cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(19), 11175–11180.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.19.11175>
- Seabra, A. R., Pereira, P. A., Becker, J. D., & Carvalho, H. G. (2012). Inhibition of Glutamine Synthetase by Phosphinothricin Leads to Transcriptome Reprogramming in Root Nodules of *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 25(7), 976–992. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-11-0322>
- Seabra, M. C., & Wasmeier, C. (2004). Controlling the location and activation of Rab GTPases. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(4), 451–457.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.06.014>
- Seiler, G. J. (1991). Registration of Alfalfa Hybrid Regen-Sy Germplasm for Tissue Culture and Transformation Research. *Crop Science*, 31(4), 1098–1098.  
<https://doi.org/10.2135/cropsci1991.0011183X003100040075x>
- Shahin, E. A., Spielmann, A., Sukhapinda, K., Simpson, R. B., & Yashar, M. (1986). Transformation of Cultivated Alfalfa Using Disarmed *Agrobacterium tumefaciens*<sup>1</sup>. *Crop Science*, 26(6), 1235–1239.  
<https://doi.org/10.2135/cropsci1986.0011183X002600060033x>
- Shao, C.-Y., Russinova, E., Iantcheva, A., Atanassov, A., McCormac, A., Chen, D.-F., Elliott, M. C., & Slater, A. (2000a). Rapid transformation and regeneration of alfalfa (*Medicago falcata* L.) via direct somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, 31(3), 155–166. <https://doi.org/10.1023/A:1006306909722>
- Shao, C.-Y., Russinova, E., Iantcheva, A., Atanassov, A., McCormac, A., Chen, D.-F., Elliott, M. C., & Slater, A. (2000b). Rapid transformation and regeneration of alfalfa (*Medicago falcata* L.) via direct somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, 31(3), 155–166. <https://doi.org/10.1023/A:1006306909722>

- Sheaffer, C. C., & Marten, G. C. (1990). Alfalfa Cutting Frequency and Date of Fall Cutting. *Journal of Production Agriculture*, 3(4), 486–491. <https://doi.org/10.2134/jpa1990.0486>
- Sheludko, Y. (2008). Agrobacterium-Mediated Transient Expression as an Approach to Production of Recombinant Proteins in Plants. *Recent Patents on Biotechnology*, 2(3), 198–208. <https://doi.org/10.2174/187220808786241033>
- Shetty, K., & McKersie, B. D. (1993). Proline, thioproline and potassium mediated stimulation of somatic embryogenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Science*, 88(2), 185–193. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(93\)90090-M](https://doi.org/10.1016/0168-9452(93)90090-M)
- Shillito, R. D., Saul, M. W., Paszkowski, J., Müller, M., & Potrykus, I. (1985). High Efficiency Direct Gene Transfer to Plants. *Nature Biotechnology*, 3(12), 1099–1103. <https://doi.org/10.1038/nbt1285-1099>
- Singer, S. D., Hannoufa, A., & Acharya, S. (2017). Molecular improvement of alfalfa for enhanced productivity and adaptability in a changing environment. *Plant, Cell & Environment*. <https://doi.org/10.1111/pce.13090>
- Small, E. (2011). *Alfalfa and Relatives*. NRC Research Press CABI. <https://doi.org/10.1079/9781845937508.0000>
- Somers, D. A., Samac, D. A., & Olhoft, P. M. (2003). Recent Advances in Legume Transformation. *Plant Physiology*, 131(3), 892–899. <https://doi.org/10.1104/pp.102.017681>
- Sorek, N., Gutman, O., Bar, E., Abu-Abied, M., Feng, X., Running, M. P., Lewinsohn, E., Ori, N., Sadot, E., Henis, Y. I., & Yalovsky, S. (2011). Differential Effects of Prenylation and S -Acylation on Type I and II ROPS Membrane Interaction and Function . *Plant Physiology*, 155(2), 706–720. <https://doi.org/10.1104/pp.110.166850>
- Sorek, N., Poraty, L., Sternberg, H., Bar, E., Lewinsohn, E., & Yalovsky, S. (2007). Activation Status-Coupled Transient S Acylation Determines MembranePartitioning of a Plant Rho-Related GTPase. *Molecular and Cellular Biology*, 27(6), 2144–2154. <https://doi.org/10.1128/MCB.02347-06>
- Sorek, N., Segev, O., Gutman, O., Bar, E., Richter, S., Poraty, L., Hirsch, J. A., Henis, Y. I., Lewinsohn, E., Jürgens, G., & Yalovsky, S. (2010). An S-Acylation Switch of Conserved G Domain Cysteines Is Required for Polarity Signaling by ROP GTPases. *Current Biology*, 20(10), 914–920. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.03.057>
- Sørmo, C. G., Leiros, I., Brembu, T., Winge, P., Os, V., & Bones, A. M. (2006). The crystal structure of Arabidopsis thaliana RAC7/ROP9: The first RAS superfamily

- GTPase from the plant kingdom. *Phytochemistry*, 67(21), 2332–2340.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.011>
- Suttie, J. M. (2008). Forages, *The Science of Grassland Agriculture; Volume II*; 6<sup>th</sup> Edition. Edited by R.F Barnes, C J. Nelson, K. J Moore and M. Collins. Ames, Iowa and Oxford: Blackwell Publishing (2007). pp. 790, £90.00. ISBN 978-081304217. *Experimental Agriculture*, 44(1), 130–131.  
<https://doi.org/10.1017/S0014479707005686>
- Tague, B. W., & Mantis, J. (2006). &lt;i>In Planta Agrobacterium&lt;/i>-Mediated Transformation by Vacuum Infiltration. In *Arabidopsis Protocols* (Vol. 323, pp. 215–224). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59745-003-0:215>
- Tesfaye, M., Denton, M. D., Samac, D. A., & Vance, C. P. (2005). Transgenic alfalfa secretes a fungal endochitinase protein to the rhizosphere. *Plant and Soil*, 269(1–2), 233–243. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-0520-0>
- Tesfaye, M., Silverstein, K. A. T., Bucciarelli, B., Samac, D. A., & Vance, C. P. (2006). The Affymetrix Medicago GeneChip® array is applicable for transcript analysis of alfalfa (*Medicago sativa*). *Functional Plant Biology*, 33(8), 783.  
<https://doi.org/10.1071/FP06065>
- Thomas, C., Fricke, I., Scrima, A., Berken, A., & Wittinghofer, A. (2007). Structural Evidence for a Common Intermediate in Small G Protein-GEF Reactions. *Molecular Cell*, 25(1), 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.11.023>
- Tian, L., Brown, D. C. W., & Watson, E. (2002). Continuous long-term somatic embryogenesis in alfalfa. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 38(3), 279–284. <https://doi.org/10.1079/IVP2001286>
- Tichá, M., Illéssová, P., Hrbáčková, M., Basheer, J., Novák, D., Hlaváčková, K., Šamajová, O., Niehaus, K., Ovečka, M., & Šamaj, J. (2020). Tissue culture, genetic transformation, interaction with beneficial microbes, and modern bio-imaging techniques in alfalfa research. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(8), 1265–1280. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1814689>
- Toma-Fukai, & Shimizu. (2019). Structural Insights into the Regulation Mechanism of Small GTPases by GEFs. *Molecules*, 24(18), 3308.  
<https://doi.org/10.3390/molecules24183308>
- Vernoud, V., Horton, A. C., Yang, Z., & Nielsen, E. (2003). Analysis of the Small GTPase Gene Superfamily of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 131(3), 1191–1208.  
<https://doi.org/10.1104/pp.013052>
- Vetter, I. R., & Wittinghofer, A. (2001). The Guanine Nucleotide-Binding Switch in Three Dimensions. *Science*, 294(5545), 1299–1304.  
<https://doi.org/10.1126/science.1062023>



- Viands, D. R., Sun, P., & Barnes, D. K. (2015). *Pollination Control: Mechanical and Sterility* (pp. 931–960). <https://doi.org/10.2134/agronmonogr29.c30>
- Vigil, D., Cherfils, J., Rossman, K. L., & Der, C. J. (2010). Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nature Reviews Cancer*, *10*(12), 842–857. <https://doi.org/10.1038/nrc2960>
- Walley, F. L., Tomm, G. O., Matus, A., Slinkard, A. E., & van Kessel, C. (1996). Allocation and Cycling of Nitrogen in an Alfalfa-Bromegrass Sward. *Agronomy Journal*, *88*(5), 834–843. <https://doi.org/10.2134/agronj1996.00021962008800050025x>
- Wan, Y., Sorensen, E. L., & Liang, G. H. (1988). Genetic control of in vitro regeneration in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Euphytica*, *39*(1), 3–9. <https://doi.org/10.1007/BF00025103>
- Weeks, J. T., Ye, J., & Rommens, C. M. (2008). Development of an in planta method for transformation of alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic Research*, *17*(4), 587–597. <https://doi.org/10.1007/s11248-007-9132-9>
- Wei, Z., Liu, Y., Lin, C., Wang, Y., Cai, Q., Dong, Y., & Xing, S. (2011). Transformation of alfalfa chloroplasts and expression of green fluorescent protein in a forage crop. *Biotechnology Letters*, *33*(12), 2487–2494. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0709-2>
- Wen, L., Chen, Y., Schnabel, E., Crook, A., & Frugoli, J. (2019). Comparison of efficiency and time to regeneration of Agrobacterium-mediated transformation methods in *Medicago truncatula*. *Plant Methods*, *15*(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0404-1>
- Wennerberg, K., Rossman, K. L., & Der, C. J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science*, *118*(5), 843–846. <https://doi.org/10.1242/jcs.01660>
- Wherlock, M., & Mellor, H. (2002). The Rho GTPase family: a Rac to Rho story. *Journal of Cell Science*, *115*(2), 239–240. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.2.239>
- Winge, P., Brembu, T., & Bones\*, A. M. (1997). Cloning and characterization of rac-like cDNAs from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, *35*(4), 483–495. <https://doi.org/10.1023/A:1005804508902>
- Winge, P., Brembu, T., Kristensen, R., & Bones, A. M. (2000). Genetic Structure and Evolution of RAC-GTPases in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, *156*(4), 1959–1971. <https://doi.org/10.1093/genetics/156.4.1959>
- Xu, T., Dai, N., Chen, J., Nagawa, S., Cao, M., Li, H., Zhou, Z., Chen, X., De Rycke, R., Rakusová, H., Wang, W., Jones, A. M., Friml, J., Patterson, S. E., Bleecker, A. B., & Yang, Z. (2014). Cell Surface ABP1-TMK Auxin-Sensing Complex Activates ROP

- GTPase Signaling. *Science*, 343(6174), 1025–1028.  
<https://doi.org/10.1126/science.1245125>
- Yang, Y., Li, R., & Qi, M. (2000). In vivo analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *The Plant Journal*, 22(6), 543–551.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00760.x>
- Yang, Z. (2002). Small GTPases. *The Plant Cell*, 14(suppl 1), S375–S388.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.001065>
- Yang, Z., & Watson, J. C. (1993). Molecular cloning and characterization of rho, a ras-related small GTP-binding protein from the garden pea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(18), 8732–8736.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.90.18.8732>
- Yoo, S. Y., Bomblies, K., Yoo, S. K., Yang, J. W., Choi, M. S., Lee, J. S., Weigel, D., & Ahn, J. H. (2005). The 35S promoter used in a selectable marker gene of a plant transformation vector affects the expression of the transgene. *Planta*, 221(4), 523–530. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1466-4>
- Yoo, S.-D., Cho, Y.-H., & Sheen, J. (2007). Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols*, 2(7), 1565–1572. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.199>
- Zemenchik, R. A., Wollenhaupt, N. C., & Albrecht, K. A. (2002). Bioavailable Phosphorus in Runoff from Alfalfa, Smooth Bromegrass, and Alfalfa–Smooth Bromegrass. *Journal of Environment Quality*, 31(1), 280.  
<https://doi.org/10.2134/jeq2002.0280>
- Zemenchik, R. A., Wollenhaupt, N. C., Albrecht, K. A., & Bosworth, A. H. (1996). Runoff, Erosion, and Forage Production from Established Alfalfa and Smooth Bromegrass. *Agronomy Journal*, 88(3), 461–466.  
<https://doi.org/10.2134/agronj1996.00021962008800030017x>
- Zhang, B., He, C., Burnham, M., & Zhang, L. (2016). Evaluating the coupling effects of climate aridity and vegetation restoration on soil erosion over the Loess Plateau in China. *Science of The Total Environment*, 539, 436–449.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.132>
- Zhang, C., Kotchoni, S. O., Samuels, A. L., & Szymanski, D. B. (2010). SPIKE1 Signals Originate from and Assemble Specialized Domains of the Endoplasmic Reticulum. *Current Biology*, 20(23), 2144–2149. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.11.016>
- 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), 170–178. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(09\)60081-X](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60081-X)

Zheng, Z.-L., & Yang, Z. (2000). The Rop GTPase: an emerging signaling switch in plants. *Plant Molecular Biology*, 44(1), 1–9.  
<https://doi.org/10.1023/A:1006402628948>

Research and Markets. <https://www.globenewswire.com/news-release/2018/11/07/1647183/0/en/Global-Alfalfa-Hay-Market-Trends-and-Forecasts-Report-2018-2023-China-UAE-and-Saudi-Arabia-are-Major-Importers-of-US-Exports-with-the-US-and-Spain-Being-the-Major-Exporters-Global.html> (23.12.2023)

Global Alfalfa Hay Market 2018-2023: Saudi Arabia imports is Projected to Grow at a Maximum Rate, Due to the Country's Banning of Forage Crops Production in 2019. (2018, November 8). PR Newswire.

<https://link.gale.com/apps/doc/A561465153/AONE?u=anon~caf3aca4&sid=sitemap&xid=9881642a>

Putnam D. (2019). The Good, Bad, and Ugly for Hay Exports. Hay Forage Grower. Available at: <https://hayandforage.com/article-2420-the-good-bad-and-ugly-for-hay-exports.html> (Accessed March 05, 2021). March 2019 issue of Hay & Forage Grower 30-31.

Putnam, D. H., Summers, C. G., & Orloff, S. B. (2007). Alfalfa production systems in California. Irrigated alfalfa management for Mediterranean and desert zones. 1–19. (Vol. 3512). UCANR Publications. Available at: <https://alfalfa.ucdavis.edu/irrigatedalfalfa/> (Accessed February 10, 2022).

Summers, C. G., & Putnam, D. H. (Eds.). (2008). Irrigated alfalfa management for Mediterranean and desert zones (Vol. 3512). UCANR Publications.

(Qinghua, Y. (2007). Advances in alfalfa diseases in China. *PLANT PROTECTION-BEIJING-*, 33(1), 6.).

Pitt, R. E. (1990). Silage and hay preservation (Northeast Regional Agricultural Engineering Service). 5th edition, Ithaca, New York, 53 strán.

Wallentine, M. V. (1993). Silage storage systems in the arid west. *Silage Production from Seed to Animal*, 124-133.

USDA-NASS (2022). Data and statistics. United States Department of Agriculture, National Agricultural Statistics Service. Available at: [https://www.nass.usda.gov/Data\\_and\\_Statistics/index.php](https://www.nass.usda.gov/Data_and_Statistics/index.php) (Accessed March 10, 2022).

Erdman, R. (1993). Silage fermentation characteristics affecting feed intake. In *Silage production from seed to animal*. NRAES-67. (Northeast Regional Agricultural Engineering Service). Ithaca, New York, (210-219).

Ramaiah S. M., Daniel Skinner D. Z.. (1997). Particle bombardment: A simple and efficient method of alfalfa (*Medicago sativa* L.) pollen transformation. *Current Science*, Vol. 73, No. 8, 674-682 (9 pages)

## 8 ZOZNAM SKRATIEK

2,4-D	kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABA	kyselina abscisová
Amp <sup>R</sup>	ampicilín
ApE	A plasmid Editor
<i>bar</i>	herbicíd bialaphos
bp	páry nukleotidových báz
CAMV	vírus karfiolovej mozaiky
CDPK	Ca <sup>2+</sup> -závislá proteínkináza (Ca <sup>2+</sup> -dependent protein kinase)
CPK	kalmodulínu podobná doménová proteínkináza (Calmodulin like domain protein kinase)
CRIB	Cdc42/Rac-interagujúcu väzobnú doména
CRISPR	klastrované pravidelne rozmiestnené krátke palindromické opakovania
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiaminotetraoctová kyselina
<i>eGFP</i>	zosilnený zelený fluorescenčný proteín
ER	endoplazmatické retikulum
<i>G. max</i>	<i>Glycine max</i>
GAP	GTPázu aktivujúce proteíny
GDP	guanozindifosfát
GEF	guanínové nukleotidové výmenné faktory
GFP	zelený fluorescenčný proteín
GTP	guanozintrifosfát
<i>GUS</i>	β-glukuronidáza
<i>hpt</i>	hygromycín fosfotransferáza
Kan <sup>R</sup>	kanamycín
<i>M. sativa</i>	<i>Medicago sativa</i>
<i>M. truncatula</i>	<i>Medicago truncatula</i>
NLS	Jadrový lokalizačný signál
<i>nptII</i>	gén pre neomycín fosfotransferázu
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PPT (Ppt <sup>R</sup> )	fosfínotricín
PTM	postranlačné modifikácie
<i>Ras</i>	gén potkanieho sarkómu
Rif <sup>R</sup>	rifampicín
ROP	Rho rastlín

RopGDI  
Spe<sup>R</sup>  
Tic<sup>R</sup>  
Vir  
WUE

ROP disociačné inhibítory guanínových nukleotidov  
spektinomycín  
tikarcilín  
efektorové proteíny virulencie  
lepšia efektívnosť využitia vody