

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Test rezistence transgenních rostlin vojtěšky (*Medicago sativa* L.) vůči abiotickému stresu

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Petr Urbíš
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.
Rok:	2018

Prohlašuji, že jsem práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorů. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na mou práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne:

.....

Poděkování

„Chtěl bych poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce doc. Mgr. Miroslavu Ovečkovi, Ph.D., za obětovaný čas a odborné rady při vedení mé práce. Dále bych chtěl poděkovat celému kolektivu Oddělení buněčné biologie za cenné rady a pomoc v laboratoři a v neposlední řadě také své rodině za podporu a motivaci v průběhu celého studia.“

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Petr Urbiš
Název práce	Test rezistence transgenních rostlin vojtěšky (<i>Medicago sativa</i> L.) vůči abiotickému stresu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení buněčné biologie CRH
Vedoucí práce	doc. Mgr. M. Ovečka, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Tato bakalářská práce byla zaměřena na porovnání odolnosti transgenních rostlin tolíce vojtěšky (*Medicago sativa* L.) se sníženou expresí proteinu SIMKK (stresem indukovaná mitogenem aktivovaná protein kinasa kinasa), metodou RNA interference, vůči solnému stresu. Pro studium signální dráhy, ve které je SIMKK zapojena, indukované stresem solí, byla provedena detekce proteinů SIMK (stresem indukovaná mitogenem aktivovaná protein kinasa) a MMK3 (Medicago mitogenem aktivovaná protein kinasa 3), které jsou součástí této kaskády. Navíc byl tento efekt studován u rostlin, které byly kokultivovány s půdními bakteriemi *Sinorhizobium meliloti*, vytvářející s rostlinami tolíce vojtěšky symbiotický vztah. Výsledky této práce ukazují, že potlačením produkce MAPKK dochází ke snížení reakcí na vnější stresové podmínky i poklesu schopnosti vytvářet symbiotický vztah se *Sinorhizobium meliloti*. U rostlin *SIMKK RNAi* se sníženou expresí SIMKK docházelo také ke snížení exprese SIMK, co však bylo kompenzováno zvýšenou expresí proteinu MMK3, který rostlině zřejmě vynahrazuje částečnou absenci proteinu SIMK.

Klíčová slova	<i>Medicago sativa</i> , SIMKK, solný stres, Western blot
Počet stran	80
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Petr Urbiš
Title	Abiotic stress tolerance in transgenic alfalfa plants(<i>Medicago sativa</i> L.)
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Cell Biology CRH
Supervisor	doc. Mgr. M. Ovečka, Ph.D.
The year of presentation	2018

Abstract

This bachelor thesis is focused on the comparison of resistance of transgenic plants of alfalfa (*Medicago sativa* L.) with decreased expression of SIMKK (stress induced mitogen-activated protein kinase kinase) by RNA interference, treated with salt stress. For the study of SIMKK signaling pathways induced by salt stress, the detection of SIMK proteins (stress-induced mitogen-activated protein kinase) and MMK3 (*Medicago* mitogen-activated protein kinase 3) that are part of this cascade was performed. Plants were co-cultivated with *Sinorhizobium meliloti*, soil bacteria, which create a symbiotic interaction with alfalfa plants. The results of this work show that suppressing MAPKK in the signaling pathway leads to a reduced response to external stress conditions and a decrease in the symbiotic interaction between the plant and the bacterium. *SIMKK RNAi* plants with reduced SIMKK expression also exhibited decreased SIMK expression. In these plants, increased expression of the MMK3 protein appears to compensate for the partial absence of SIMK protein.

Keywords	<i>Medicago sativa</i> , SIMKK, salt stress, Western blot
Number of pages	80
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

CÍLE PRÁCE	8
1. ÚVOD.....	1
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	3
2.1 Tolice vojtěška (<i>Medicago sativa</i>).....	3
2.1.1 Charakteristika	3
2.1.2 Listy a stonek	3
2.1.3 Kořen.....	4
2.1.4 Květ.....	5
2.1.5 Plody a semena	6
2.1.6 Využití.....	7
2.2 Reakce rostlin na solný stres	8
2.2.1 Stres u rostlin způsobený NaCl.....	8
2.2.2 Reakce na solný stres u huseníčku rolního (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	9
2.2.3 Reakce na solný stres u tolíce vojtěšky (<i>Medicago sativa</i>).....	10
2.3 Mitogenem aktivované protein kinasy	11
2.3.1 Všeobecná charakteristika MAP kinas.....	11
2.3.2 Stresem indukovaná mitogen aktivovaná protein kinasa SIMK u <i>Medicago sativa</i>	14
2.5 Tvorba hlízek	16
2.5.1 Symbiotická interakce rostlin s půdními bakteriemi.....	16
2.5.2 Bakteriální Nod faktory	16
2.5.3 Interakce rhizobakterií s kořenovými vlásky	17
2.5.4 Tvorba infekčního vlákna	17
2.5.5 Vznik kořenové hlízky	17
2.5.6 Vznik symbiozómu	19
2.4 Detekce specifických proteinů metodou Western blot (imunoblot).....	20
2.4.1 Charakteristika imunoblotingu.....	20
2.4.2 Příprava vzorků	20
2.4.3 Separace proteinů elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS	21
2.4.4 Přenos proteinů z gelu na membránu	22
2.4.5 Blokování nespecifických vazeb, promývání a aplikace protilátek	23
2.4.6 Detekce proteinů	23
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
3.1 Materiál.....	25

3.1.1 Použité chemikálie	25
3.1.2 Použité protilátky:	26
3.1.3 Roztoky a média:	27
3.1.4 Použité přístroje	29
3.1.5 Software pro zpracování výsledků	30
3.1.6 Rostlinný materiál	30
3.1.7 Bakteriální materiál.....	31
3.2 Metody	31
3.2.1 Příprava MS média pro výsev semen a udržování rostlin v <i>in vitro</i> podmínkách.....	31
3.2.2 Povrchová sterilizace semen	31
3.2.3 Výsev a kultivace semenáčků tolíce vojtěšky (<i>Medicago sativa</i>).....	32
3.2.4 Aplikace stresu.....	32
3.2.5 Odběr vzorků	33
3.2.6 Homogenizace vzorků.....	33
3.2.7 Extrakce proteinů	33
3.2.8 Měření koncentrace proteinů	34
3.2.9 Příprava vzorků pro nanesení na gel	35
3.2.10 Výroba gelů.....	35
3.2.11 Gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu	36
3.2.12 Přenos proteinů na membránu.....	36
3.2.13 Blokování nespecifických vazeb a aplikace protilátek	37
3.2.14 Detekce proteinů	38
3.2.15 Odstranění navázaných protilátek z membrán	38
3.2.16 Vyhodnocování	38
4. VÝSLEDKY	39
4.1 Pozorování fenotypu <i>in vitro</i> a <i>ex vitro</i> rostlin po aplikaci solného stresu	39
4.1.1 Pozorování fenotypu kontrolních a transgenních rostlin tolíce vojtěšky (<i>Medicago sativa</i>) kultivaru Regen SY.....	39
4.1.2 Pozorování fenotypu rostlin tolíce vojtěšky (<i>Medicago sativa</i>) cv. Europe	46
4.2 Detekce proteinů po aplikaci solného stresu.....	48
4.2.1 Detekce proteinů z rostlin pěstovaných <i>in vitro</i>	48
4.2.2 Detekce proteinů z rostlin, pěstovaných <i>ex vitro</i>	57
5. DISKUZE.....	66
6. ZÁVĚR.....	68
7. SEZNAM LITERATURY	69
8. SEZNAM ZKRATEK	78

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

Vypracování rešerše zaměřené na:

- základní popis vojtěšky a význam vojtěšky pro zemědělství
- reakce rostlin na vnější abiotické stresové faktory
- podíl signálních proteinů na regulaci vývojových procesů rostlin a jejich reakcí na vnější stresové podmínky
- metody hodnocení fenotypu rostlin po aplikaci abiotických stresových faktorů

Praktická část

- cílená kultivace kontrolních a transgenních rostlin vojtěšky v podmínkách *in vitro* a *in vivo*
- aplikace vybraných stresů a vyhodnocování míry rezistence mezi liniemi
- pomocí kvalitativních a kvantitativních metod vyhodnocování stanovit, do jaké míry potlačení exprese MAPKK u vojtěšky ovlivní reakci rostlin na stres.
- vyhodnocování fenotypových změn, vyvolaných abiotickým stresem, na rostlinách vojtěšky

1. ÚVOD

Tato bakalářská práce se zabývá vlivem vybraných abiotických stresových faktorů na transgenní linie (*SIMKK RNAi*) tolice vojtěšky (*Medicago sativa* L.) jak v *in vitro*, tak v *ex vitro* podmínkách, a testováním možných změn rostlin vojtěšky v reakcích na abiotické stresové faktory při symbióze s půdní bakterií *Sinorhizobium meliloti*. Tolice vojtěška je vytrvalá dvouděložná rostlina z čeledi bobovitých (*Fabaceae*). Vyznačuje se fialově zbarvenými květy. Rostlina se využívá především jako krmivo pro dobytek a díky symbióze s půdními bakteriemi pomáhá obohacovat půdu v okolí kořenů o dusík, který mohou rostliny využít. Je také často využívána jako modelový organismus a uplatňuje se i v moderních biotechnologiích (Bouton, 2012). U rostlin se vyvinuly mechanismy aktivace receptorů a signálních drah, citlivých k různým biotickým a abiotickým vlivům. Jelikož rostliny jsou vázány na konkrétní místo svého růstu, aktivace signálních drah pomáhají rostlinám v adaptaci a vhodné odpovědi na různé podněty (Colcombet and Hirt, 2008; Rodriguez *et al.*, 2010; Smékalová, 2014). V této práci jsem se zaměřil na vliv abiotického stresu, způsobeného zasolením, na expresi proteinů SIMK (stress-induced mitogen-activated protein kinase) a SIMKK (stress-induced mitogen-activated protein kinasekinase). SIMKK je enzym, protein kinasa, který se účastní mnoha buněčných procesů jako je regulace exprese genů, buněčného dělení a diferenciace buněk. Je součástí několikastupňové signální fosforylační kaskády, při které dochází k postupné aktivaci jednotlivých členů prostřednictvím fosforylace, a tedy k přenosu signálu. U transgenních linií *M. sativa* byla exprese SIMKK potlačena metodou RNA interference (RNAi). Jde o proces regulace transkripce i exprese genů vzájemným ovlivňováním (vyrušením) fragmentů dvoušroubovicové RNA (dsRNA) a exprimovaných genů. Zajímalo mě, jak se bude lišit obsah proteinu SIMK za současného působení soli u *ex vitro* pěstovaných transgenních linií SIMKK RNAi, které byly zároveň inokulovány bakterií *Sinorhizobium meliloti*. Tato práce sleduje obsah protein kinas SIMK a MMK3, které jsou zahrnuty v signálních dráhách, regulovaných SIMKK. Pro potvrzení fosforylace, a tedy aktivace studovaných protein kinas, při přenosu signálu v dané kaskádě byla použita fosfo-specifická protilátka, reaktivní jen s

fosforylovanými kinasami. Cílem této práce bylo porovnat míru rezistence na stres způsobený zasolením u *ex vitro* kontrolních rostlin a transgenních linií SIMKK RNAi, v porovnání s kontrolními rostlinami vojtěšky rostoucích v *in vitro* podmínkách.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Tolice vojtěška (*Medicago sativa*)

2.1.1 Charakteristika

Tolice vojtěška (*Medicago sativa* L.) je vzpřímená, téměř lysá rostlina vysoká 30 - 80 cm, která kvete od května do října (Randuška, 1986; Schauer, 2007). Nejčastěji roste na chudém, suchém trávníku, kamenné zdi, okraji cesty, náspu, poli, rumišti, štěrkovém místě a jiných sušších ruderalizovaných loukách a mezích. Vojtěška se hojně pěstuje jako pícnina a její původ je nejspíš někde z oblasti Malé Asie a Kašmíru (Kubát, 2002). Z mediteránní až subkontinentální Asie se tolice vojtěška rozšířila do Evropy. Diploidní stav vojtěšky je $2n = 32$ (Kubát, 2002).

2.1.2 Listy a stonek

Tolice vojtěška (*Medicago sativa*) vytváří lodyhy vyrůstající z kořenového krčku. Lodyhy dorůstají výšky 0,9 až 1 m. Jedna rostlina vytváří 12 až 15 internodií. V uzlinách (nodech) se lodyha značně větví a vytváří kolem 4-8 větví. Rostlinu vojtěšky pak tvoří trs, který může mít přibližně 20 lodyh. Hmotnostní podíl lodyh kolísá podle hustoty porostu, a tedy především podle růstové fáze od 40 do 60 % (Velich, 1991). Podíl lodyh rostliny se s postupujícím vývinem a stárnutím rostliny zvyšuje a zároveň dochází k jejich lignifikaci¹, která snižuje její stravitelnost, a tedy její krmnou hodnotu. Proces lignifikace je značně urychlen při nástupu kvetení vojtěšky (Klesnil *et al.*, 1978). V příčném řezu stonku mají lodyhy kruhovitý nebo čtyřhranný tvar zelené barvy. Ve spodní části někdy nafialovělé v důsledku přítomnosti antokyanů (Hrabě *et al.*, 2004). Listy tolice vojtěšky jsou tří četné obvejčité až obkopynaté, uspořádané střídavě. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 10-30 x 4-10 mm. V horní třetině jsou nepravidelně zubaté a špičaté s ostnem (Schauer, 2007). Prostřední list má delší řapík mezi 2-3 mm, na rozdíl od dvou vedlejších více přisedlých listů s řapíkem dlouhým 0,5-1,5 mm (Randuška, 1986; Kubát, 2002). Barva listů se pohybuje v odstínech světle až tmavě zelené. Na řapících u báze se vytvářejí palisty (Hrabě *et al.*, 2004). Při suchu,

¹ dřevnatění

způsobným nedostatkem vláhy se snižuje v listech turgor², tyto listy se začínají sklápět, a tak se rostlina chrání proti ztrátě vody (Velich, 1991). Tolice vojtěška (*Medicago sativa*) je typická právě velkolepou soustavou listové plochy, které se nejvíce vytvářejí v prvním užitkovém roce a největší listovou plochu v první seči. Podle mnoha různých autorů tvoří za všechny seče v rozsahu 10 až 50 m² 1m² pokrytí listů (Lichner *et al.*, 1983).

2.1.3 Kořen

Důležitým vegetativním orgánem, ze kterého je vojtěška schopna obrůstat je kořenový krček, ten je vytvořen po zasetí vojtěšky a růstem hlavní lodyhy, jejíž spodní uzlina postupně sílí a postupem času dochází k produkci odnožovacích pupenů, tedy zóny odnožování. Tyto pupeny jsou většinou vytvořeny ve vertikálním směru, což způsobuje rozvětvení a se zvyšujícím se věkem rostliny protáhlý a prohloubený krček (Velich, 1991). Pro kořenovou soustavu vojtěšky jsou charakteristické 4 - 6 křivých kořenů dosahující v roce výsevu při jarní setbě na podzim hloubky 1,5 m nebo až 5 metrů v propustných půdách. Při letním výsevu se nevytváří křivé kořeny, ale dochází k většímu větvení, a to až 0,8 metrů od hlavního kořene. Avšak celková intenzita zakořenění a mohutnost kořenů vojtěšky je závislá na více faktorech, jako jsou půdní podmínky, agrotechnika a hlavně zpracování půdy a době výsevu (Regal a Krajčovič, 1963; Klesnil *et al.*, 1978; Velich, 1991; Šantrůček *et al.*, 2007). Postupem času se u tolice vojtěšky (*Medicago sativa*) projevuje tzv. kořenová kontrakce, což je jev, kdy se kořenový krček začne zatahovat do půdy a spodní pupeny jsou už v prvním roce zataženy až 15 mm do půdy. Toto pokračuje s přibývajícím lety. Vytvářejí se pupeny i na těch nejspodnějších uzlinách lodyh, což vede k většímu větvení kořenového krčku, který se prodlužuje a zatahuje ještě více do hloubky půdy (Velich, 1991). Výhodou zatahování kořenového krčku pod povrch půdy spočívá především v ochraně před abiotickým (chlad) a biotickým (hlodavci, hmyz) stresem (Velich, 1991). Bohužel však bývá relativně často napaden houbovými a bakteriálními chorobami, což omezuje výnos a životnost rostliny (Šantrůček *et al.*, 2001). Po zasetí a vyrůstání rostlin se nejdříve 4 krát rychleji tvoří kořenová soustava než nadzemní, a tak se nejvíce kořenové hmoty (30

² vnitřní napětí

- 60 % z celkového množství) nachází přibližně v hloubce 0,4 - 0,6 metrů pod povrchem půdy, což je pro rostlinu velmi prospěšné při shromažďování vody (Velich, 1991; Šantrůček *et al.*, 2001). Podle Klesnila (1978) vytváří vojtěška největší množství kořenové hmoty ze všech plodin a píce. To připadá na 7,5 - 12 t/ha suché hmoty u vyvinutého porostu. Samotné kořeny obsahují velké množství ligninu, a tak jsou velmi pomalu rozkládány, což z nich dělá velmi dobrý materiál pro zvýšení úrodnosti půdy (Klesnil *et al.*, 1978; Šantrůček *et al.*, 2001). Dále kořeny tolíce vojtěšky (*Medicago sativa*) obsahují velké množství prvků, jako jsou dusík (2 %), draslík (0,9 %), vápník (1,3 %) a fosfor (0,3 %, Velich, 1991). Kořenová soustava vojtěšky má velmi kladný vliv na vývoj mikroorganismů přítomných v půdě tím, že je schopna do půdy vylučovat relativně velké množství oxidu uhličitého a okyselovat půdu, a to má za následek uvolňování prvků z jejich méně vhodných sloučenin, což zabezpečuje markantní zpomalení ztráty živin z půdy v průběhu let (Lichner *et al.*, 1983).

2.1.4 Květ

Stejně jako je tomu u většiny bobovitých (motýlokvětých) rostlin, i u tolíce vojtěšky (*Medicago sativa*) je květ velmi charakteristicky stavěný. Kalich je pětizubý s chloupky na žilkách. Koruna se skládá z 5 lístků, přičemž dva spodní srůstají v člunek, který uzavírá generativní orgány. Dva postranní lístky tvoří volná křídla a horní list je pavézou, neboli štítkem (Randuška, 1986; Graman, 1991). Květy, které jsou 8-12 mm dlouhé, vyrůstají v počtu 12-25 na dlouhých stopkách v protáhlém až kulovitěm hlávkovitěm hrozně, 10-60 mm dlouhém, v úžlabí podpůrných listenů (Randuška, 1986; Velich, 1991; Schauer, 2007). Podle počtu odnoží, rozvětvení porostu a jeho hustoty vytváří jedna rostlina tolíce vojtěšky (*Medicago sativa*) kolem 25-250 hroznů (Velich, 1991). Barva všech květů v květenství se pohybuje v odstínech modré a fialové, zřídka bledě modré, s tmavou kresbou na pavéze (Randuška, 1986; Kubát, 2002; Schauer, 2007). Květenství vojtěšky kvete přibližně 2-5 dnů, pokud nedojde k opylení tak 6-7 dnů. Po 8-9 dnech květ vadne a opadá. Samotně květenství pak kvete 10-20 dnů (Graman, 1991). Podle způsobu opylování je tolíce vojtěška (*Medicago sativa*) z 89 % cizosprašná entomogamická³ rostlina. Samosprašná bývá jen z 10 % a to

³ hmyzosnubná (hmyzosprašná)

jen tehdy, jsou-li nevhodné podmínky pro opylující hmyz. To způsobí nasazení malého počtu semen, přičemž rostliny z nich vzešlé jsou jen málo životaschopné (Graman, 1991; Chloupek, 2000). K opylení je tedy důležitý vysoký počet opylovačů, jako jsou čmeláci a včely. Stejně jako u všech bobovitých rostlin s typicky členěným květem se i u vojtěšky objevuje v rámci rostlinné říše velmi netradiční způsob opylení, tzv. explozivní způsob. V závislosti na morfologickém uspořádání květních částí, těžší hmyz, který usedá na květ, uvede do pohybu pružinový mechanismus pro překonání "květního zámku", a tím i uvolnění prašníků a blizny (Graman, 1991). Avšak v semenářství zapříčiňuje tento mechanismus řadu problémů, které se projevují v nevyrovnané až nízké produkci semen (Velich, 1991).

2.1.5 Plody a semena

Plodem tolíce vojtěšky (*Medicago sativa*) je vícesemenný spirálovitý lusk. Lusk má 1,5 až 4 nepravidelné závitky a je síťnatě žilkovaný a přitiskle chlupatý (Randuška, 1986; Velich, 1991; Kubát, 2002; Schauer, 2007; Pelikán, 2012). Rostlina má malá semena, kterých je v lusu 5-7 v závislosti na opylení (Velich, 1991). Barva semen se pohybuje od žluté, žlutohnědé až k olivově zelené (Hood a Howard, 2002; Pelikán, 2012). Tvar semena je nepravidelný ledvinovitý (Hood a Howard, 2002; Pelikán, 2012). Zárodek je chráněn poměrně tvrdým obalem, který způsobuje nerovnoměrné bobtnání semen, a tedy i jejich klíčení. Tato tvrdosemenost však zajišťuje semenům vojtěšky schopnost přežít dlouhotrvající období nepříznivých podmínek. Tvrdost semen je způsobena prostoupením osemení kutinem a suberinem (Štráfelda, 1962). Vznik tvrdosemenosti je v době utváření semen doprovázen suchým a teplým počasím. Přičemž se rozšiřují palisádové buňky osemení, až dojde k jejich natlačení na sebe, a tedy k inhibici přístupu vody a kyslíku skrz obal semena (Švecová, 2007). Tvrdost semen je přirozeně způsobena časem sklizně, ale je také ovlivněna lokalizací semen v lusu. Podle Štráfeldy (1962) se zvyšuje jejich tvrdost se vzrůstající vzdáleností od kalichu. Dále tvrdí, že se tvrdosemenost přenáší do dalších generací v daleko větší míře než z rostlin, které bobtnají rychleji. Množství takovýchto tvrdých semen se pohybuje kolem 60-70 % (Hrabě *et al.*, 2004). Hmotnost tisíce semen (HTS) je v rozmezí od 1,5-2,4 g (Velich, 1991; Pelikán, 2012).

2.1.6 Využití

Tolice vojtěška (*Medicago sativa*) má mnoho různých způsobů využití. V první řadě je třeba zmínit její užití jako pícniny, tedy ke krmivu, zejména jako pastvu pro dobytek. Na základě převažujících chemických látek, v tomto případě dusíkatých, lze vojtěšku zařadit mezi bílkovinné pícniny. Kromě obsahu proteinů, aminokyselin a dusičnanů obsahuje rostlina vlákninu, cukry a prvky jako fosfor, hořčík, draslík a vápník (Římovský, 1989). K dalším možnostem jejího využití je výroba sena a siláže. Dále je vojtěška jako každá rostlina užitečná pro svou schopnost produkovat mnoho hluboko rostoucích gravitropních kořenů a zabraňovat tak erozi půdy, a také v biotechnologických aplikacích, jako je fytořemediace (Fulkerson, 1981). Méně známé způsoby použití tolíce vojtěšky (*Medicago sativa*) je výroba bílkovinných extraktů a koncentrátů, které je možné podávat jak zvířatům, tak lidem. Semena vojtěšky se již dnes prodávají v obchodech se zdravou výživou. V neposlední řadě její význam spočívá, díky symbióze s půdními hlízkovými bakteriemi fixujícími dusík, v akumulaci a obohacování dusíku ve formě dusičnanů a amoniaku v půdě.

2.2 Reakce rostlin na solný stres

2.2.1 Stres u rostlin způsobený NaCl

Většina solných stresů v přírodě je způsobena solemi sodíku, především chloridu sodného. NaCl může mít silné nepříznivé účinky na růst a vývoj rostlin a má obzvláště závažné důsledky pro výnosy plodin (Yadav *et al.*, 2011; Smékalová *et al.*, 2014). Zvýšení slanosti půdy může být způsobeno několika faktory: odpařováním vody, srážkami a zvětráváním půd (Mahajan a Tuteja, 2005; Smékalová *et al.*, 2014). Stres ze zasolení je primárně způsoben toxicitou sodíku. Různé rostliny vykazují různé hranice tolerance vůči soli. Velmi odolné rostliny vůči zasolení se nazývají halofyty, jejich opakem jsou glykofyty, tedy rostliny velmi citlivé k zasolení. Většina půdních rostlin jsou glykofyty a nemohou tolerovat koncentrace Na^+ nad 50 mM (Munns a Tester, 2008; Smékalová *et al.*, 2014). Nízké limity pro toleranci k zasolení mají především luštěniny (hrách, fazole), střední odolnost platí pro obilniny (žito, oves, pšenice, ječmen) a velmi vysoká rezistence je u některých píceňin a "technických" plodin (trávy, vojtěška, slunečnice, řepa, Maianu a kol., 1965; Levitt, 1980). Reakce rostlin na solný stres může být indikována zastavením růstu, nekrotickým odumíráním pletiv (Ehlig a Bernstein, 1958; Strogonov, 1964; Levitt, 1980), následuje ztráta turgoru, opadání listů, a nakonec smrt celé rostliny (Kovalskaia, 1958; Levitt, 1980). Když je rostlina vystavena solnému stresu, znamená to, že hodnoty chemického potenciálu, aktivity, a tedy i koncentrace soli se mnohem zvýší. Jak sůl difúzí prochází pomocí gradientu a proniká rostlinou, nastávají v rostlinách dvě změny: změna iontové rovnováhy a snížení potenciálu vody. Pokud sůl nevstoupí do buňky, dojde pouze k změně vodního potenciálu. Inhibice růstu indukovaná solí je jen částečně reverzibilní. Kořeny pod vlivem solného stresu například dodávají do nadzemní části méně hormonů, čímž narušují jejich rovnováhu v listech a zvyšují tuhost buněčné stěny (O'Leary, 1970; Levitt, 1980). Proto i když je do listů dodáváno dostatečné množství vody, dojde ke snížení růstu a buněčného dělení. Nárůst tuhosti buněčné stěny způsobené zasolením, je pravděpodobně ireverzibilní. Nicméně, jako v případě i jiných stresů, pokud je životaschopnost meristémů zachována, růst se znovu zahájí po odstranění stresu, avšak ne se stejnou rychlostí, jak tomu bylo před stresem. Pokud sůl snižuje vnější vodní

potenciál pod hladinu uvnitř buňky, vystavuje buňku sekundárnímu důsledku z nedostatku vody - osmotickému stresu. Koncentrace solí uvnitř buňky je přirozeně nižší než vně, kvůli přítomnosti organických látek (Marré a Servettaz, 1959; Levitt, 1980). Jak se zvyšuje koncentrace organických látek v cytoplazmě, postupně se obnovuje hodnota turgoru. Hlavní příčinou inhibice růstu indukované NaCl je obtížná absorpce minerálních živin kvůli konkurenci s Na^+ . Rostliny se však mohou, v případě sekundárního poškození, chránit před osmotickou dehydratací akumulací solí, dokud celková osmotická koncentrace není vyšší než koncentrace v kořenovém médiu. Aktivní ochranu rostlin proti soli představuje odstraňování Na^+ z buněk pomocí Na^+/H^+ antiportéru, dále je to udržování vysokých vnitrobuněčných hodnot poměru K^+/Na^+ pomocí HKT transportérů a posléze i vakuolární sekvestrace Na^+ přes NHX1 antiportér, který je lokalizován v tonoplastu (Munns a Tester, 2008; Smékalová *et al.*, 2014). Inhibice růstu rostlin je doprovázena více metabolickými poruchami, především při respiraci, fotosyntéze, syntéze bílkovin a syntéze nukleových kyselin. Enzymová aktivita je v některých případech snížena, ale často se naopak zvyšuje. Dále byl zaznamenán zásah do metabolismu sacharidů (Bhardwaj, 1959; Levitt, 1980) a syntézy chlorofylu a karotenu (Kim, 1958; Levitt, 1980). Z uvedeného vyplývá, že poškození buněk vysokými koncentracemi solí nemusí být způsobeno jenom jejím přímým účinkem, ale též nepřímým účinkem, prostřednictvím jedné nebo více těchto metabolických poruch.

2.2.2 Reakce na solný stres u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*)

V reakci na podmínky prostředí, jako je i zvýšená koncentrace solí v půdě, bylo u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) prokázáno, že dochází k akumulaci mRNA pro MEKK1 (MAPKKK; Mizoguchi *et al.*, 1996; Sinha *et al.*, 2011). Mutantní rostliny *Arabidopsis mek1* vykazují zlepšený růst za podmínek vysoké salinity, což naznačuje, že MEKK1 může být negativním regulátorem reakce na zasolení u *Arabidopsis* (Su *et al.*, 2007; Smékalová *et al.*, 2014). Signály pocházející ze stresových podmínek z prostředí jsou přenášeny především dvěma MAPK kaskádami. Jedna z nich je signální kaskáda se zapojením MPK4 (MEKK1-MEK1/MKK2-MPK4) a druhá kaskáda zahrnuje MPK6 a MAPK3 (Ichimura *et al.*, 2000; Sinha *et al.*, 2011). MAPK signální dráha indukovaná solným stresem obsahuje MEKK1 jako nadřazený ("upstream")

aktivátor kinasy MKK2 a podřazené ("downstream") MAPK MPK4 a MPK6 (Teige *et al.*, 2004; Sinha *et al.*, 2011). Důkazem funkčnosti této dráhy jsou mutantní rostliny *Arabidopsis mkk2*, které jsou přecitlivělé na sůl (Teige *et al.*, 2004; Smékalová *et al.*, 2014). Z pozdějších studií vyplývá, že především aktivace MPK6 hraje zásadní roli v počátečních stádiích detoxikace Na⁺, protože tato kinasa rychle fosforyluje SOS1 Na⁺/H⁺ antiportér a tím jej indukuje na úkor celkového okyselení cytosolu (Yu *et al.* 2010; Smékalová *et al.*, 2014). Solným stresem sekundárně způsobený osmotický stres u *Arabidopsis thaliana* aktivuje expresi MPK3, MPK4 a MPK6 (Droillard *et al.*, 2002; Droillard *et al.*, 2004; Sinha *et al.*, 2011), avšak hyperosmotický stres způsobený solí vede k jejich různé aktivaci (Droillard *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2011; Persak a Pitzschke, 2013; Smékalová *et al.*, 2014).

2.2.3 Reakce na solný stres u tolíce vojtěšky (*Medicago sativa*)

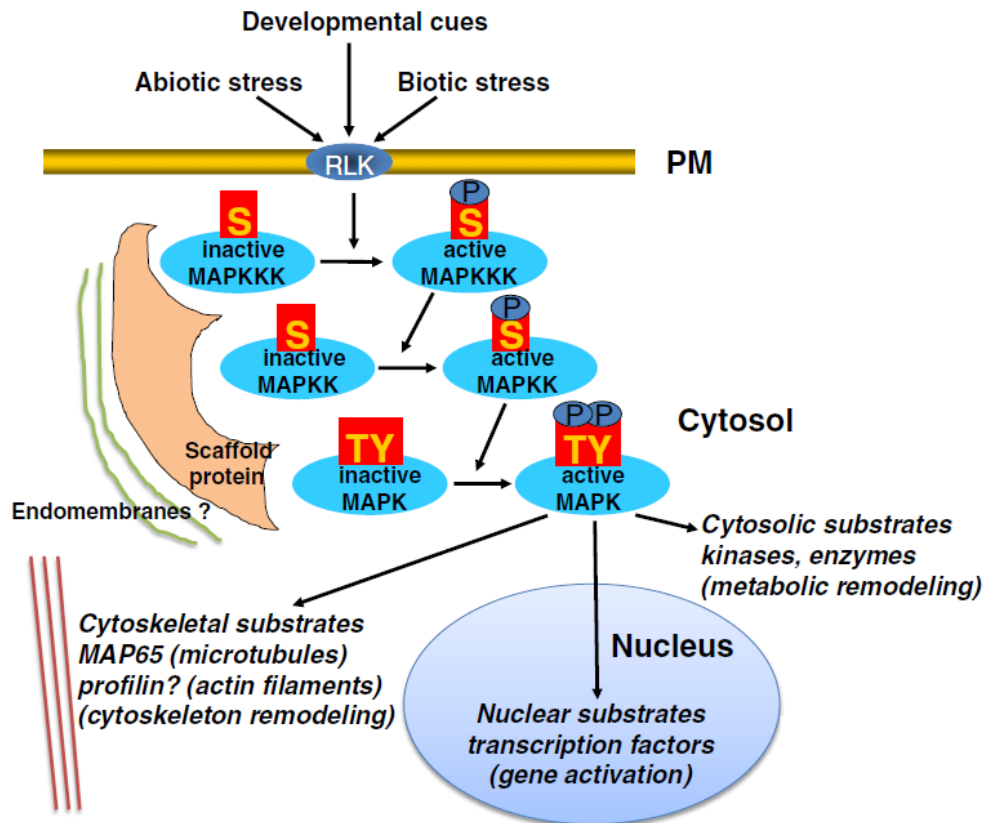
Kvůli sníženému výnosu tolíce vojtěšky (*Medicago sativa*) způsobeného stresem ze zasolení (50 - 200mM koncentrace NaCl; Bekki *et al.*, 1987; Jin *et al.*, 2010), je tato problematika často studována. Za účelem zvýšení tolerance vojtěšky vůči soli bylo několik genů klonováno, charakterizováno a u některých genů byla využita metoda zvýšené exprese (Yang *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2010). Se známých MAPK vojtěšky byla identifikována jako solným stresem indukovaná SIMK (stress-induced mitogen-activated protein kinase) o velikosti 46,6 kDa (Munnik *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 2011). Metodou yeast-two hybrid ke zjišťování interakcí mezi proteiny byla identifikována kinasa SIMKK jako nadřazený ("upstream") aktivátor SIMK. SIMKK interaguje specificky se SIMK a zprostředkovává její aktivaci způsobenou solí v *in vivo* i *in vitro* podmínkách (Kiegerl *et al.*, 2000; Sinha *et al.*, 2011). V případě semen tolíce vojtěšky stres ze zasolení snižuje jejich klíčivost mnohem víc než mannitol, který se používá pro simulaci osmotického stresu ze sucha. Kořeny vojtěšky po klíčení vykazovaly pětikrát vyšší růst v přítomnosti mannitolu než v přítomnosti NaCl (Strogonov, 1964).

2.3 Mitogenem aktivované protein kinasy

2.3.1 Všeobecná charakteristika MAP kinas

Mitogenem aktivované protein kinasy (MAPK, MAP kinasy) jsou velmi důležitou součástí buněčné signalizace, neboť svým typickým uspořádáním v signalizační kaskády jsou schopny fosforylací přenášet signál. Důvodem pro tuto komplexitu je neschopnost rostlin aktivně opustit dané stanoviště, což vede k nutnosti adekvátně a efektivně reagovat na všechny podněty, jak biotické, tak abiotické. MAPK kaskáda je evolučně konzervovaný signální transdukční modul, vyvinutý pro přenos extracelulárních signálů na základě určitých podnětů. MAPK kaskáda obsahuje tři komponenty: MAP kinasa kinasa kinasa (MAP3K/MAPKKK/MEKK), MAP kinasa kinasa (MAP2K/MAPKK/MEK) a MAP kinasa (MAPK/MPK; Mishra *et al.*, 2006; Rodriguez *et al.*, 2010; Sinha *et al.*, 2011), vzájemně interagující prostřednictvím fosforylace. MAP3Ks jsou serin/threoninové kinasy, fosforylující dvě aminokyseliny v S/T-X-S/T motivu aktivační smyčky MAP2K (Tena *et al.*, 2001; Jonak *et al.*, 2002; Mishra *et al.*, 2006; Sinha *et al.*, 2011). MAP2Ks fosforylují MAPKs na reziduích threoninu a tyrozinu v neměnném motivu T-X-Y (Chang *et al.*, 2001; Sinha *et al.*, 2011). MAPKs jsou serin/threoninové kinasy schopné fosforylovat širokou škálu substrátů, zahrnující jiné kinasy, transkripční faktory nebo cytoskeletální proteiny. Tyto kinasy hrají různé role v intra i extra celulární signalizaci rostlin, přenosem informací ze senzorických a receptorových komplexů na plasmatické membráně až k substrátům, které se podílejí na náležité buněčné odpovědi. Formace, integrita a subcelulární lokalizace specifické MAPK kaskády může být zprostředkována pomocí integračních ("scaffold") proteinů a adaptorových nebo kotvících proteinů (Whitmarsh *et al.*, 1998; Bardwell *et al.*, 2001; Takekawa *et al.*, 2005; Sinha *et al.*, 2011). Signalizace skrz MAP kinasové kaskády může vést k buněčným odpovědím zahrnujícím buněčné dělení, genovou expresi, diferenciaci i odpovědi na různé stresy (Šamajová *et al.*, 2013) a aktivace transkripčních faktorů (Ishihama a Yoshioka, 2012). Signalizační MAPK jsou aktivovány po aktivaci primárních faktorů vnímání extracelulárních signálů, což jsou receptorové proteiny, sekundární poslové a hormony. Pro deaktivaci (defosforylaci) MAP kinas po přenosu signálu jsou důležité specifické MKPs (MAPK fosfatasy; Ulm *et*

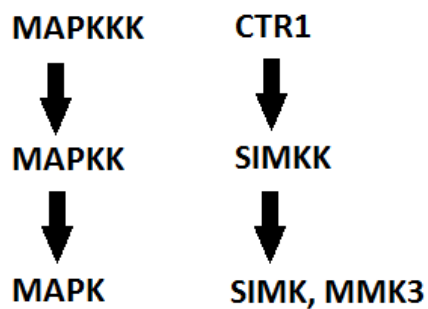
al., 2002; Sinha *et al.*, 2011). U rostlin jsou MAPK aktivovány při přenosu specifických signálů pocházejících z abiotických stresů jako je chlad, zasolení, mechanický stres, stres z poranění, vysoká či nízká teplota, UV záření, osmotický šok, těžké kovy aj. (Sinha, 2011).



Obr. 1 Model přenosu signálu prostřednictvím subcelulárně organizované kaskády mitogenem-aktivovaných proteinkinas (MAPKs). Ty jsou organizovány v proteinových komplexech, tzv. MAPK modulech, které jsou drženy společně tzv. "lešením" (scaffold). Tyto proteiny "lešení" mají vazebná místa pro MAP3K, MAP2K a MAPK a obvykle mají specifické domény, které se mohou vázat v endomembránách na fosfolipidy. MAPK signalizace může být vyvolána různými podněty, jako je stres a vývojové signály. Během přenosu signálu jsou MAP3K a MAP2K postupně fosforylovány (P) a aktivovány na zbytcích serinu (S) nebo threoninu (T), zatímco MAPK musí být dvojitě fosforylovány na reziduích treoninu (T) a tyrosinu (Y). Fosforylace jednotlivých komponent je zajištěna hydrolýzou ATP. Aktivované MAPK se uvolňují z modulu, přemísťují se v buňce a regulují další substráty (např. transkripční faktory, proteinové kinasy, enzymy a cytoskeletální proteiny) lokalizované v různých subcelulárních kompartmentech (jádro, cytosol, cytoskelet, Šamajová *et al.*, 2013).

2.3.2 Stresem indukovaná mitogen aktivovaná protein kinasa SIMK u *Medicago sativa*

V *Medicago sativa* byla MsSIMK (stresem indukovaná MAPK) identifikována jako MAPK podílející se na signalizaci abiotických stresů nebo při působení elicitorů. Metodami jako yeast two-hybrid analýza a meziproteinové interakční studie *in vitro* a *in vivo* byla identifikována SIMK kinasa (MsSIMKK, MAPKK) jako nejsilnější aktivátor SIMK (Cardinale *et al.*, 2002). SIMK vykazuje vysokou strukturní a sekvenční homologii k již dobře prostudované AtMPK6 (Bekešová *et al.*, 2015) z *Arabidopsis thaliana*. Molekulová hmotnost SIMK je 46,6 kDa a vykazuje absolutně identickou sekvenci ve své C terminální oblasti s AtMPK6. Naproti tomu SIMKK vykazuje vysokou sekvenční homologii s AtMKK4 a AtMKK5 z *Arabidopsis thaliana* (Ichimura *et al.*, 1998). Dále bylo prokázáno, že SIMKK aktivuje SIMK v reakci na stres ze soli (Kiergerl *et al.*, 2000). Bylo zjištěno, že značná část jaderného obsahu SIMKK i SIMK se po jejich aktivaci stresem ze soli přesouvá do cytoplazmy, kde spolu kolokalizují v specifických cytoplazmatických kompartmentech (Ovečka *et al.* 2014). Nadměrná exprese SIMKK v rostlinách *Arabidopsis* vede k vyšší aktivaci endogenních MPK6 a MPK3 i po krátkodobém působení soli, a tedy k zvýšené citlivosti těchto rostlin na stres způsobený solí. (Ovečka, 2014). Kromě aktivace biotickým a abiotickým stresem, může být SIMK také zapojena, společně s dynamickým aktinovým cytoskeletem, do vývoje a formování kořenových vlásků (Šamaj *et al.*, 2002).



Obr. 2. Model MAPK modulu zprostředkovávajícího signalizaci v rostlině tolice vojtěšky (*Medicago sativa*). CTR1 je negativní regulátor MAPKK SIMKK a MAPK SIMK/MMK3. CTR1 reguluje MAPKK v reakci na etylén. SIMKK může být aktivována stresem ze soli, patogenními elicitory a těžkými kovy. Aktivace MMK3 spočívá v působení mechanického stresu, stresu z poranění, sucha, chladu a těžkých kovů. SIMK je aktivována především osmotickým stresem a stresem, způsobeným těžkými kovy a solí (Sinha *et al.*, 2011).

2.5 Tvorba hlízek

2.5.1 Symbiotická interakce rostlin s půdními bakteriemi

Kořenové hlízky se nacházejí u rostlin, které si vytvářejí symbiotický (mutualistický) vztah s bakteriemi rodu *Rhizobium*, které jsou schopné fixovat vzdušný dusík. Mezi tyto leguminózní rostliny patří i *Medicago sativa*, která je hostitelem *Sinorhizobium meliloti* (Barker *et al.* 1990; Rose, 2008; Amor *et al.* 2003; Choi *et al.*, 2004; Kouchi *et al.*, 2010; Sulieman a Schulze, 2010). Symbiotický vztah je indukován pomocí chemických látek. Hostitelské rostliny produkují flavonoidní látky a betainy, které při nižších koncentracích lákají rhizobakterie a při vyšších koncentracích způsobují u bakterií expresi plazmidových nod genů k vytvoření tzv. Nod faktorů (Catoira, 2000). Rostliny produkují flavonoidy specificky pro daný druh rhizobakterií. Rostlina je schopna vnímat bakteriální Nod faktory pomocí extracelulárních receptorových LysM kinasových domén (Bateman a Bycroft, 2000) a intracelulárních serin/treoninových kinas, které spuštěním signální receptorové kaskády ovlivňují další děje v buňce. Tyto receptory jsou uloženy v plasmatické membráně buněk rhizodermis (Madsen *et al.*, 2003; Radutoiu *et al.*, 2003). Tato kaskáda také zahrnuje LRR-like kinasu (Leucine rich receptor-like kinase, SYMRK; Ivanov *et al.*, 2010), vápníkem aktivované draslíkové kanály, umístěné v jaderném obalu (*Medicago* DMI1, Ivanov *et al.*, 2010) a protein kinasu závislou na vápníku/kalmodulinu (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase, CCaMK, Ivanov *et al.*, 2010).

2.5.2 Bakteriální Nod faktory

Před a během kontaktu rhizodermálních buněk s rhizobakteriemi se uplatňují lipochitooligosacharidy ze skupiny Nod faktorů. Tyto stimulační sloučeniny jsou schopny iniciovat meristemickou aktivitu v buňkách rostlinných pletiv, která vede k tvorbě hlízek (Dénarie *et al.*, 1996; Fernandez-Pascual *et al.*, 2006). Přejíždí z rhizobakterie do rostliny a vyznačují se vysokou hostitelskou specifitou. Například u *Medicago truncatula* byly identifikovány Nod faktory LYK3 a NFP (Ardourel *et al.* 1994; Limpens *et al.* 2003; Arrighi *et al.* 2006; Smit *et al.* 2007; Kouchi *et al.*, 2010).

2.5.3 Interakce rhizobakterií s kořenovými vlásky

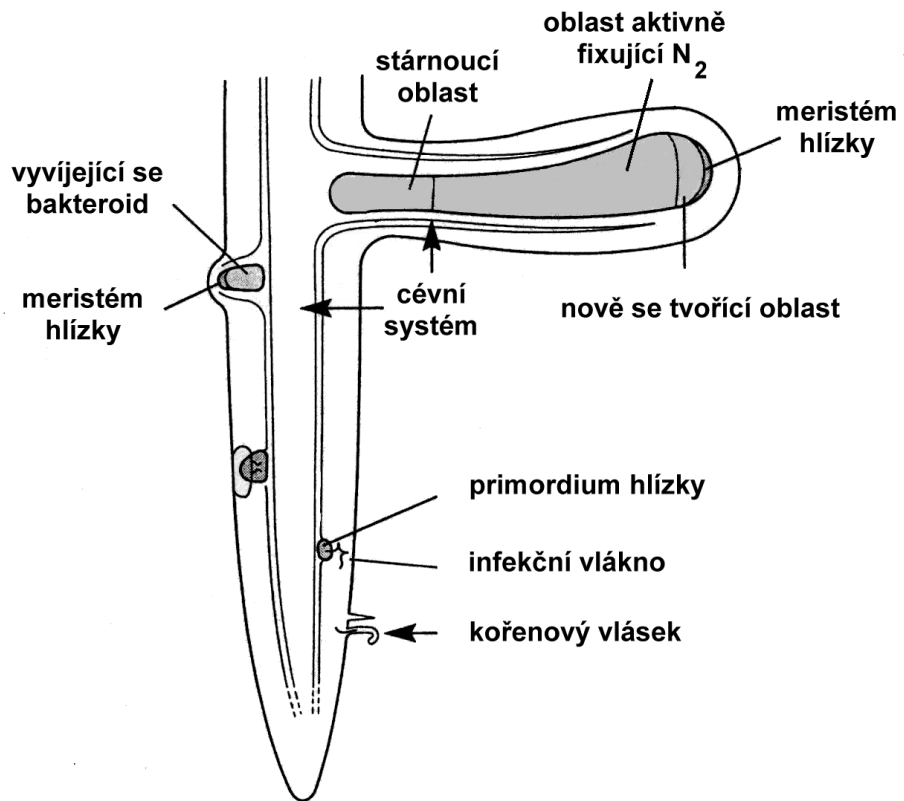
Vlivem Nod faktorů dochází k deformaci kořenového vlásku, kdy zvýšená propustnost Ca^{2+} a H^+ iontů způsobí depolarizaci plasmatické membrány (Felle *et al.*, 1999; Wais *et al.*, 2002; Fernandez-Pascual *et al.*, 2006). Kořenový vlásek se postupně stáčí kolem rhizobakterie, čímž ji uzavře do spirálou vzniklého prostoru uvnitř.

2.5.4 Tvorba infekčního vlákna

Jakmile dojde ke kontaktu rhizobakterie a buněčné stěny zatočeného kořenového vlásku hostitelské rostliny, dojde k indukci tvorby infekčního vlákna ("infection thread", Jones *et al.* 2007). Toto vlákno je obaleno jak vnořenou plasmatickou membránou, tak buněčnou stěnou hostitelské buňky (Endre *et al.*, 2002). Infekční vlákno s množícími se rhizobakteriemi postupně prorůstá k primární kůře kořene, membrána kolem vlákna se rozpustí a bakterie se endocytózou dostávají do buněk rostliny a vytvoří se primordium (základ hlízky; Van Spronsen *et al.*, 1994; Foucher *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2007).

2.5.5 Vznik kořenové hlízky

Poté dojde k vytvoření tzv. cytoplasmatického mostu, spojujícího infekční vlákno a primordium. Most je vytvořen z rostlinných buněk, u kterých dochází ke změně cytoplasmu buňky. Během tohoto procesu dochází k iniciaci tvorby hlízky (Timmers *et al.*, 1999; Foucher *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2007). Vlivem Nod faktorů dojde u rostliny k nadměrné expresi proteinu cyklinu CycA2, který umožňuje opětovnou aktivaci buněčného cyklu, a tedy dělení diferencovaných buněk (Roudier *et al.*, 2000; Mergaert *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2007).



Obr. 3. Jednotlivá stadia tvorby kořenových hlízek na kořeni rostliny (Upravené z https://is.muni.cz/el/1431/jaro2015/Bi7240/um/2015_Symbioticka_fixace_dusiku_Text.pdf)

2.5.6 Vznik symbiozomu

Buňky rhizobakterií, které vstoupily do hlízkového primordia, se mění a vytvářejí bakteroid, ve kterém probíhá syntéza nitrogenasy, a tedy dochází k fixaci dusíku (Brewin, 1991; Perret *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2007). Bakterioidy jsou obalené rostlinnou peribakteroidní plasmatickou membránou v symbiozomy. Výměna látek mezi bakterioidy a rostlinnou buňkou probíhá právě skrz tuto membránu (Day *et al.*, 2001; Prell *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2007). Z hlízky do cytoplasmy rostlinné buňky je transportován NH_4^+ . V opačném směru dochází k transportu organických látek a vody. Kyslík vstupuje do hlízky pomocí hemoproteinu leghemoglobinu, který je produkován rostlinnou buňkou, a který je nezbytný pro fixaci dusíku (Ott *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2007).

2.4 Detekce specifických proteinů metodou Western blot (imunoblot)

2.4.1 Charakteristika imunoblotingu

Western blotting (imunobloting) je důležitá technika používaná v biochemii, buněčné a molekulární biologii. Metoda slouží k ověření přítomnosti a obsahu proteinů, kinasové aktivity, buněčné lokalizace, interakcí mezi proteiny nebo k monitorování posttranskripčních modifikací (Nairn *et al.*, 1982; Bass *et al.*, 2017), ubiquitinaci (Paul *et al.*, 2012; Bass *et al.*, 2017), glykosylaci (Péré-Brissaud *et al.*, 2015; Bass *et al.*, 2017) a methylaci (Voelkel *et al.*, 2013; Bass *et al.*, 2017). Při použití metody western blotu je možné separovat, detekovat a identifikovat specifické proteiny z komplexní směsi proteinů extrahovaných z homogenizovaných buněk (De Cecco *et al.*, 2009; Simpson *et al.*, 2010). Technika sekvenčně využívá tři kroky: rozdělení proteinů podle velikosti, přenos na pevný nosič (membránu) a označení cílového proteinu pro vizualizaci použitím vhodné primární a sekundární protilátky, konjugované s enzymem. Při této technice se směs proteinů rozdělí na základě molekulové hmotnosti, a tedy podle velikosti, denaturační gelovou elektroforézou v přítomnosti detergentu dodecylsiranu sodného. Tyto rozdělené proteiny ve formě gelu jsou pak přeneseny na PVDF membránu, ve formě proteinového pásu. Po tomto přenosu se specifický protein identifikuje tak, že se membrána s imobilizovanými proteiny inkubuje v roztoku obsahujícím protilátku vůči tomuto proteinu. Navázání první (primární) protilátky na specifický protein se detekuje inkubací se sekundární protilátkou konjugovanou s enzymem či fluoroforem.

2.4.2 Příprava vzorků

Pro přípravu vzorků k jejich následné separaci je nutné použít extrakční pufr, které rozvolní proteiny a oddělí je od zbytku buněk a pletiv (Structural Genomics Consortium *et al.*, 2008). Rozvolnění proteinů je nezbytné pro pozdější navázání protilátky, neboť protilátky jsou schopny se navázat jen na část proteinu zvanou epitop, která velmi často bývá nedostupná z důvodů prostorové terciární struktury složeného proteinu. Extrakční pufr tedy umožní rozpletení proteinu (Cleland, 1964; Lin *et al.*, 1985; Kurien *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2013; Bass *et al.*, 2017). Dále je třeba inhibovat enzymy rozkládající proteiny - proteasy a enzymy, schopné defosforylovat již fosforylované

proteiny - fosfatasy, inhibitory těchto enzymů (Gordon, 1991; Scopes, 1994; Sharma a Carew, 2002; Grabski, 2009; Bass *et al.*, 2017). Po dobu působení extrakčních pufrů je nutné udržovat vzorky při teplotě 4°C (Mahmood a Yang, 2012; Bass *et al.*, 2017). Po působení extrakčního pufru je nutné oddělit proteiny, rozptýlené v pufru, od zbytků pletiv a buněk centrifugací. Vzniklý extrakt obsahuje proteiny, které je však nutné redukovat a denaturovat. Denaturace se provádí použitím nanášecího Laemmliho pufru (Laemmli; 1970; Bass *et al.*, 2017), který obsahuje neiontový detergent dodecylsíran sodný (SDS). Pufr se přidá k extraktu a dále se směs zahřeje na 95°C po dobu 5 minut. SDS denaturuje proteiny a svým navázáním na ně způsobí, že proteiny budou mít negativní náboj. Tím je docíleno pohybu proteinů v gelu na základě své molekulové hmotnosti. V pufru se také nachází 2-merkptoethanol pro odstranění disulfidických vazeb v proteinech, glycerol pro zvýšení hustoty nanášeného vzorku, což napomáhá jeho aplikaci a barvivo bromfenolová modř k vizualizaci vzorků při jejich aplikaci na gel.

2.4.3 Separace proteinů elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS

Separace proteinů se provádí pomocí gelové elektroforézy v polyakrylamidovém gelu, což je polymer, který se skládá z akrylamidových podjednotek zesíťovaných N,N'-metylenbisakrylamidem (bisakrylamid, Raymond a Weintraub, 1959; Bass *et al.*, 2017). K polymeraci akrylamidu s bisakrylamidem dochází při laboratorní teplotě pouze v přítomnosti volných radikálů, pomocí oxidačního činidla peroxosulfátu amonného (APS), který způsobuje homolytické štěpení vazeb O-O. Jako katalyzátor polymerace je standardně využíván tetramethylethyldiamin (TEMED), který reaguje s APS. Velikost pórů gelu, pro co nejlepší separaci proteinů o dané velikosti, závisí na poměru akrylamidu a bisakrylamidu, tedy jejich celkové koncentraci (Ornstein, 1964; Bass *et al.*, 2017). Při vyšší koncentraci jsou póry v gelu menší, a jsou tedy vhodnější pro analýzu malých proteinů. Pro denaturované proteiny se do gelů přidává také dodecylsíran sodný, pro udržení negativního náboje proteinů, navázáním na anionty SDS, díky čemuž se pohybují od kladného k zápornému pólu a jejich rychlost při migraci je závislá pouze na jejich molekulové hmotnosti (Laemmli, 1970; Towbin *et al.*,

1979). Hotový gel se skládá ze dvou samostatných gelů o různém pH. Zaostrující horní gel má nižší koncentraci akrylamidu a pH 6,8 (Walker, 1994; Bass *et al.*, 2017). Spodní separovací gel má vyšší koncentraci akrylamidu a jeho pH je vyšší (8,8). Zaostrující gel, kvůli velkým pórům, způsobí, že jím mohou projít i velké proteiny, aniž by svou velikostí znemožnily postup menších proteinů (Ornstein, 1964; Bass *et al.*, 2017). Při nanášení vzorků do jamek gelu se do první jamky aplikuje proteinový marker, který se skládá ze směsi proteinů o známé velikosti. Vytvoření pásů, znázorňujících dané velikosti proteinů, migrujících po gelu slouží pro vyhodnocení velikosti hledaných proteinů ve vzorcích.

2.4.4 Přenos proteinů z gelu na membránu

Přenesení proteinů z polyakrylamidového gelu na membránu se provádí přes elektroforetický transfer (elektroblot) pomocí elektrického proudu. Membrány, na které jsou proteiny přeneseny, jsou buď nitrocelulosové (Towbin *et al.*, 1979; Bass *et al.*, 2017) nebo polyvinylidendifluoridové (PVDF, Kurien a Scofield, 2006; Bass *et al.*, 2017). Před samotným transferem je možné proteiny vizualizovat použitím barviv, které cíleně barví proteiny. Pomocí barviva Coomassie brilliant blue G-250 je možné vizualizovat proteiny přímo v gelu po separaci. Toto barvení nám slouží jako kontrola úspěšné separace a celkové přítomnosti proteinů ve formě pásů. Barvení Coomassie brilliant blue G-250 je ireverzibilní (Burnette, 1981; Aldridge *et al.*, 2008; Hagiwara *et al.*, 2010; Romero-Calvo *et al.*, 2010; Welinder *et al.*, 2012; Lanoix *et al.*, 2012; Colella *et al.*, 2012; Gürtler *et al.*, 2013). Pro úspěšný přenos proteinů je nutné složit sendvič. Celá kazeta se sendvičem je vložena do komory v tanku, plně v kontaktu s elektrodami (Kyhse-Andersen, 1984; Bjerrum a Schafer-Nielsen 1986; Tovey a Baldo 1987). Po transferu je možné zkontrolovat jeho úspěšnost nabarvením již přenesených proteinů na membráně barvivem Ponceau S. Toto barvení je reverzibilní, je tedy možné jej odstranit postupným promýváním membrány (Antharavally *et al.*, 2004; Aldridge *et al.*, 2008; Alegria-Schaffer *et al.*, 2009; Hagiwara *et al.*, 2010; Romero-Calvo *et al.*, 2010; Welinder *et al.*, 2012; Lanoix *et al.*, 2012; Colella *et al.*, 2012; Gürtler *et al.*, 2013; Bass *et al.*, 2017).

2.4.5 Blokování nespecifických vazeb, promývání a aplikace protilátek

Jelikož jsou membrány vysoce afinitní k proteinům, je třeba zajistit, aby se protilátky při jejich inkubaci s membránou navázaly specificky pouze ke svým antigenům ve vzorku a ne k celému povrchu membrány. Pro tento účel slouží blokace membrány v blokovacích roztocích, které mají za úkol navázat se na volná místa na membráně (Jensen, 2012; Bass *et al.*, 2017), čímž umožní protilátce specificky se navázat pouze na daný antigen. Pro blokování jsou používány nejčastěji blokovací roztoky obsahující sušené mléko nebo hovězí sérový albumin (Crossland *et al.*, 2013; Franchi *et al.*, 2014; Bass *et al.*, 2017). Jejich použití však závisí na dané protilátce, neboť využití mléka v blokovacím roztoku interferuje při detekci fosforylovaných proteinů, protože mléko obsahuje kasein, který je sám fosfoproteinem (Mahmood & Yang, 2012; Bass *et al.*, 2017). Po blokaci, a tedy před aplikací protilátek, je nutné membránu promývat v promývacích roztocích z důvodu odstranění nežádoucího pozadí, které vzniká vlivem nespecifického navázání protilátek, avšak při intenzivním promývání může docházet ke snížení účinnosti blokování. Promývání se provádí pomocí fosfátových nebo tris tlumivých roztoků (pufrů) s přidavkem detergentu. Aplikace a inkubace primární protilátky se odehrává většinou v blokovacím roztoku. Doba inkubace s primární protilátkou závisí na jednotlivých protilátkách a může být inkubována od několika hodin až přes noc při 4°C. Primární protilátka je zvolena podle druhu antigenu na proteinu, který hledáme. Primární protilátky po specifickém navázání na daný protein, jsou specificky detekovány konjugovanými sekundárními protilátkami. Po promytí se aplikuje sekundární protilátka vhodně naředěna v promývacím roztoku po dobu 1-2 hodin. Sekundární protilátky jsou značeny buď enzymem, fluoroforem nebo jsou konjugovány s biotinem. Při výběru sekundární protilátky je třeba zvolit jiný hostitelský organismus, než ten, ve kterém byla připravena primární protilátka (Lipman *et al.*, 2005; Bass *et al.*, 2017).

2.4.6 Detekce proteinů

Detekování proteinů při western blottingu je nejčastěji založeno na enzymatických reakcích (Crossland *et al.*, 2013; Bass *et al.*, 2017). Pro enzymatickou detekci se nejčastěji využívají enzymy navázané na sekundární protilátky jako je alkalická fosfatasa (AP, Bronstein *et al.*, 1989; Bass *et al.*, 2017) nebo křenová peroxidasa (HRP,

Kricka, 1991; Bass *et al.*, 2017). Enzymatická detekce spočívá v chemiluminiscenci, při které enzym reaguje se substrátem, čímž vznikne nestabilní produkt, který je stabilizován až vyzářením určitého kvanta světla a vznikne signál (Kricka, 1991; Alegria-Schaffer *et al.*, 2009; Bass *et al.*, 2017). Podle množství navázané sekundární protilátky s enzymem, je odvozena i intenzita chemiluminiscenčního signálu, a tedy i obsah daného proteinu. Je však velmi důležité si uvědomit, že data získaná detekcí jsou pouze semikvantitativní (Willmann *et al.*, 2014; Bekešová *et al.*, 2015). Detekce nám poskytuje především relativní srovnání hladin proteinů, ale ne jejich absolutní naměřené množství.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

P 0.45 PVDF Blotting Membrane Amersham TM Hybond TM (GE Healthcare Life science), PVDC fólie (Sarogold), Kádinky, odměrné válce, pinzety, Pasteurovy pipety, filtrační papír, hliníková fólie, skleněné nádoby na membrány, hrubší a tenčí skla na gely, centrifugační kyvety, mikrozkuhavky, celulózové ubrousky, magnetické míchadla, sterilní špičky, nůžky, sterilní čtverhranné Petriho misky, černé igelitové obaly, parafilm, chirurgická páska

3.1.1 Použité chemikálie

Chlorid sodný (Sigma-Aldrich)

Dodecylsírán sodný (SDS, Sigma-Aldrich)

Hydroxid sodný (Sigma-Aldrich)

10% Hypochlorid sodný (Sigma-Aldrich)

D +(-) Sacharosa (Sigma-Aldrich)

N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED, Sigma-Aldrich)

Peroxosíran amonný (Sigma-Aldrich)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich)

Tween ® 20 (Sigma-Aldrich)

Ledová kyselina octová (Sigma-Aldrich)

37% Kyselina chlorovodíková (Sigma-Aldrich)

Acrylamide/bis-acrylamide 37,5:1, 40% (BioRad)

Protein Assay Dye Reagent Concentrate 5x (BioRad)

DL-Dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich)

Ethanol denat. 96% (Lihovar Kojetín)

Glycerol (Sigma-Aldrich)

Glycine (Sigma-Aldrich)

4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina (HEPES, Duchefa Biochemie)

Incidur (Ecolab)
Methanol (Sigma-Aldrich)
2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)
Chlorid hořečnatý (Sigma-Aldrich)
Ponceau S (Sigma-Aldrich)
Fluorid sodný (Sigma-Aldrich)
Ethylen glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N,N tetraoctová kyselina (EGTA, Sigma-Aldrich)
4x Laemli Sample buffer (BioRad)
Precision Plus Protein TM Dual Color Standards (BioRad)
Clarity TM Western ECL Substrate (BioRad): Lumonil/enhancer solution a Peroxide solution
cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)
PhosSTOP (Roche)
BSA (hovězí sérový albumin; Sigma-Aldrich)
Blotting-Grade Blocker (BioRad)
Isopropanol (Sigma-Aldrich)
Sterilní destilovaná voda
Vodovodní voda
Murashige and Skoog basal salt mixture (Duchefa Biochemie)
Gellan gum powder (Alfa Aesar)

3.1.2 Použité protilátky:

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

3.1.3 Roztoky a média:

Sterilizační roztok na sterilizaci semen *M. sativa*

- 3,3 ml 10% hypochlorid sodný
- 1,7 ml 70% etanol
- kapka Tween 20

Pevné MS médium

- 4,3 g.l⁻¹ Murashige and Skoog médium-Basal salt mixture (M0221)
- 30 g.l⁻¹ sacharosa
- 4,5 g.l⁻¹ Gellan gum
- Doplnit MiliQ H₂O
- Upravit pH na 5,7 pomocí 1M KOH, sterilizace autoklávem

Tekuté MS médium

- 4,3 g.l⁻¹ Murashige and Skoog médium-Basal salt mixture (M0221)
- 30 g.l⁻¹ sacharosa
- Doplnit MiliQ H₂O
- Upravit pH na 5,7 pomocí 1M KOH, sterilizace autoklávem

Tekuté MS médium s 250 µM NaCl

- 4,3 g.l⁻¹ Murashige and Skoog médium-Basal salt mixture (M0221)
- 30 g.l⁻¹ sacharosa
- 14.61 g.l⁻¹ NaCl
- Doplnit MiliQ H₂O
- Upravit pH na 5,7 pomocí 1M KOH, sterilizace autoklávem

Vodný roztok s 200 µM NaCl

- 11,69 g.l⁻¹ NaCl
- Doplnit MiliQ H₂O do 1 litru

Transfer pufr 10x (TB)

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

Pracovní TB:

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

Tris buffered saline 10x (TBS) pufr

- Tris 24,2 g.l⁻¹
- NaCl 87,8 g.l⁻¹
- Doplnit MiliQ H₂O do 1 litru
- Upravit pH na 7,4 pomocí koncentrované HCL

TBST pufr

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

Running pufr (RB)

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

Pracovní RB:

- 100 ml RB
- 900 ml MiliQ H₂O

Ponceau S barvicí roztok

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

Extrakční pufr E (do 100 ml)

- 1,19 g 50mM HEPES, pH 7,5 (NaOH)
- 0,43 g NaCl
- 38 mg EGTA
- 100 μ 1M MgCl₂

- 4 mg NaF
- 10 ml 10% glycerolu
- Doplnit MiliQ H₂O do 100 ml
- Sterilizováno pomocí filtru s velikostí pórů 22 µm

Extrakční pufr

- Těsně před použitím přidány inhibitory proteas a fosfatas (na 1 ml extrakčního pufu E)
- 1 µl 1M DTT (1,54 g/10 µl)
- 20 µl Complete™
- 100 µl PhoStop™

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

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

1,5 M Tris HCl pH 8,8

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

3.1.4 Použité přístroje

Spektrofotometr Infinite M Nano (Tecan)

Dokumentační systém ChemiDoc™ MP (BioRad)

Aparatura na výrobu gelů (BioRad)

Aparatura na SDS-PAGE a Western blot (BioRad)

pH metr PC 2700 (Eutech Instruments)

Laboratorní S1502 (BEL Engineering)

Analytické váhy (XA 110/2X, RADWAG)

Laboratorní digestoř (M 1200, MERCI)

Box laminární Biohazard (Merci)

Termoblok Thermocell Cooling&Heating Block CHB-202 (Bioer)
Vortex Genie - 2 (Scientific Industries)
Chlazená centrifuga Allegra (Beckman Coulter)
Mikrocentrifuga s vortexem FVL-2400N (BioSan)
Třepačka Rocker Shaker MR - 12 (BioSan)
Napěťový a proudový zdroj BioRad Power Pac™ Basic (BioRad)
Fytotronová komora (Weiss Gallenkamp)
Výrobník deionizované vody Simplicity water purification system (Millipore)
Automatické pipety (Eppendorf)
ImageScanner™ III (GE Healthcare)
Mikrovlnná trouba MHE21 (HITACHI)
Elektromagnetická míchačka IKA Combimag REO (Drehzahl Electronic)
Laboratorní chladnička LIE LCV 4010 (Schoeller)
Mraznička LIE G 5216 513L (Comfort)
Hlubokomrazící box (Panasonic)
Centrifuga stolní chlazená ScanSpeed 1730 MR (LaboGene)
Fotoaparát Nikon 7000 (Nikon)

3.1.5 Software pro zpracování výsledků

ImageLab (BioRad)
i-control™ Microplate Reader Software (Tecan)
EPSON Scan software
Inkscape (0.92.3)

3.1.6 Rostlinný materiál

Medicago sativa L. divoký typ, kultivar Europe

Medicago sativa L. divoký typ, kultivar Regen SY

Medicago sativa L transgenní linie *SIMKK RNAi*, připravená stabilní transformací

listových explantátů z kontrolních dospělých rostlin kultivaru Regen SY pomocí *Agrobacterium tumefaciens* (Bekešová *et al.*, 2015). Transformované rostliny byly regenerovány procesem somatické embryogeneze. I kontrolní rostliny byly regenerovány procesem somatické embryogeneze s vynecháním kroku transformace. Na

solný experiment bylo vybráno 6 kontrolních 6 rostlin (označených arabskými číslicemi 1, 2, 3, 7, 8, 9) a 6 transgenních rostlin (označených arabskými číslicemi 4, 5, 6, 10, 11, 12). Rostliny byly pěstovány ve fytotronu při teplotě 21 °C přes den a 18 °C přes noc. Při fotoperiodě 16 hodin světlo, 8 hodin tma a relativní vlhkosti 60 % ve dne, 70 % v noci.

3.1.7 Bakteriální materiál

Kmen *Sinorhizobium meliloti* Sm2011 obsahující plazmid pHC60 (tetR), kódující mRFP (Boivin *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 2016). Kmen byl poskytnutý prof. Dr. Karstenem Niehausem, Univerzita Bielefeld, Německo.

3.2 Metody

3.2.1 Příprava MS média pro výsev semen a udržování rostlin v *in vitro* podmínkách

Do 600 ml destilované vody v litrové plastové kádince bylo přidáno navážené množství MS basal salt mix, dále sacharóza a nakonec 4,5 g.l⁻¹ Gellan gum. Objem byl doplněný do 1 litru MiliQ vodou a rozmíchán pomocí magnetického míchadla a nakonec bylo upraveno pH na 5,7 pomocí 1M KOH. Médium bylo rozdělené do čtyř 500 ml skleněných lahví po 250 ml a předáno k autoklávování. Po autoklávování bylo médium vloženo do inkubátoru, který jej udržel v tekutém stavu při 55,5°C. Popřípadě se nechalo ztuhnout pro pozdější použití. Pro opětovné rozpuštění bylo nutné zahřát médium v mikrovlnné troubě do jeho úplného zkapalnění, poté se nechalo ochladit na teplotu kolem 50°C. Nakonec bylo médium v jedné lahvi rozlito do pěti čtverhranných Petriho misek.

3.2.2 Povrchová sterilizace semen

Před samotnou sterilizací bylo třeba si připravit všechny potřebné chemikálie, vysterilizované nástroje v 96% etanolu a celý laminární box vysvítit 30 minut UV světlem, a poté ještě vystříkat pracovní plochu 2% Incidurem. Semena byla sterilizována v laminárním boxu v mikroskopkách Eppendorf. K semenům byl vždy sterilní špičkou přidán 70% etanol a po dobu 60 sekund v mikroskopce

protřepáván. Poté byl etanol odpipetovaný a přidán sterilizační roztok (směs 10% hypochloridu sodného, 70% etanolu, kapka TWEEN 20). V tomto roztoku byly semena sterilizované 4 minuty protřepáváním. Po samotné sterilizaci byla semena pětikrát promyta a protřepávána, vždy po dobu 2 minut ve sterilní MiliQ vodě. Po posledním promytí byla semena ponechána ve sterilní MiliQ vodě přes noc v chladničce při 4 °C, kvůli procesu stratifikace a imbibice.

3.2.3 Výsev a kultivace semenáčků tolíce vojtěšky (*Medicago sativa*)

Druhý den po sterilizaci byla semena vyseta do předem připravených čtverhranných Petriho misek s MS médiem ve vysterilizovaném laminárním boxu. Semena byla vyseta na povrch média do dvou řádků a Petriho misky byly zaizolovány parafilmem a chirurgickou lepicí páskou. Takto zavřené Petriho misky se uložily horizontálně do chladničky při 4 °C pro synchronizaci klíčení. Další den byly přemístěny do vertikální polohy do fytotronu. Po dvou dnech začaly semena klíčit. Poté byly ve sterilním laminárním boxu rostliny rozděleny a po čtyřech přeneseny na nové Petriho misky s MS médiem. Rostliny měly ve fytotronu zakrytou kořenovou soustavu pomocí černé fólie. Po 20 dnech byly semenáčky dostatečně vyvinuté, a tedy připravené na aplikaci solného stresu.

3.2.4 Aplikace stresu

Na rostliny tolíce vojtěšky (*Medicago sativa*) kultivar Regen SY, které rostly ve květináčích ve fytotronu, byl aplikován solný stres v podobě každodenní zálivky 200 ml 200 μ M roztokem NaCl po dobu 48 hodin. Rostliny byly před samotnou aplikací roztoku ponechány 3 dny bez zalévání. Kontrolní rostliny byly zalévány 200 ml vody z vodovodu. Na rostliny *M. sativa* kultivar Europe, pěstované *in vitro* v čtverhranných Petriho miskách, byl aplikován solný stres formou zalévání kořenového systému 30 ml 250 μ M roztoku NaCl v tekutém MS médiu po dobu 30 minut. Kontrolní *in vitro* rostliny byly zalévány pouze 30 ml tekutého MS média. Petriho misky byly v průběhu experimentu nakloněny pod mírným úhlem, vzhledem ke kořenové soustavě, na třepače na nejnižší rychlost, pro dobrou cirkulaci zálivky přes kořeny.

3.2.5 Odběr vzorků

Vzorky z rostlin z květináčů byly odebírány před aplikací stresu (0, suchá kontrola), a poté po 12., 24. a 48. hodinách od začátku působení solného roztoku. Z každé rostliny bylo odebíráno do dvou označených a v ledu vychlazených mikrozkušavek 10 - 20 listů v závislosti na jejich velikosti, neboť transgenní rostliny měly značně menší velikost listů. Listy a kořeny zvláště ze semenáčků *M. sativa* kultivar Europe, pěstovaných *in vitro* byly odebírány taktéž před aplikací stresu (suchá kontrola), a dále vždy po deseti minutách v průběhu třiceti minut. Mikrozkušavky s odebranými vzorky se ihned zmrazily v tekutém dusíku a uložily do mrazničky na -80 °C.

3.2.6 Homogenizace vzorků

Pomocí předem vychlazeného tloučku a třecí misky se rostlinný materiál rozdrtil na prášek, kvůli rozbití pletiv a buněk pro vyšší výnos extrakce proteinů. V průběhu homogenizace bylo třeba udržovat materiál zamrazený přidáváním tekutého dusíku do třecí misky po celou dobu drcení, a také vychlazováním tloučku. Nadrcený vzorek byl přenesen do popsané mikrozkušavky, která byla taktéž napřed vychlazená v tekutém dusíku. Po každém vzorku bylo třeba očistit použité nástroje v 96% etanolu.

3.2.7 Extrakce proteinů

Vzniklé zmražené homogenizované vzorky jsem vložil do připraveného boxu naplněného ledem. Do čerstvě připraveného extrakčního pufru E jsem přidal podle protokolu redukční činidlo DTT pro redukci a rozrušení disulfidických, které stabilizují terciární a kvartérní strukturu proteinů. Dále jsem do extrakčního pufru přidal dané množství inhibitoru proteas cOmpleteTM, aby v průběhu extrakce nedocházelo k rozkladu proteinů, a také inhibitoru fosfatas PhosSTOPTM, pro zabránění defosforylace fosforylovaných proteinů. Do 2 ml mikrozkušavky s odváženým vzorkem na analytických vahách jsem napipetoval množství čerstvého extrakčního pufru v poměru, kdy do 1 g homogenátu byl napipetován 1 ml extrakčního pufru. Vzniklou směs jsem promíchal na vortexu a nechal 15 minut extrahovat. V mezičase jsem zapnul centrifugu a spustil její předchlazení na 4°C. Po 15 minutách byly mikrozkušavky vloženy do centrifugy na 20 minut při 13 000 g a 4°C. Po centrifugování jsem vzniklý supernatant přenesl pipetou se sterilní špičkou do čisté a označené 2 ml mikrozkušavky.

Mikrozkumavky se supernatanty byly poté vloženy do mikrocentrifugy na 1 minutu při laboratorní teplotě. Supernatant byl přepipetován do popsané 0,6 ml mikrozkumavky a uložen do ledu.

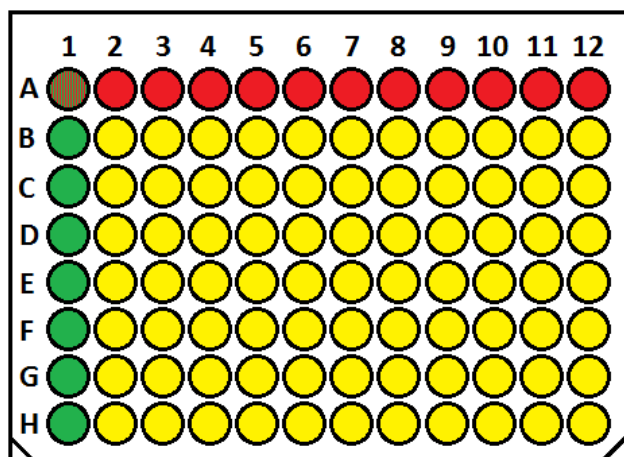
3.2.8 Měření koncentrace proteinů

Pro měření absorbance byl použit mikrodestičkový spektrofotometr. Nejdříve bylo potřeba připravit roztok hovězího sérového albuminu (BSA) pro vytvoření kalibrační křivky, kdy se do 1 ml extrakčního pufru přidalo 10 mg BSA. Do devíti v ledu uložených 0,6 ml mikrozkumavek se napipetoval roztok společně s vodou (Tab. 1)

Tab. 1 Příprava roztoku albuminu se zvyšující se koncentrací

Obsah proteinu (μg)	Blank (0 μg)	0,5 μg	1 μg	1,5 μg	2 μg	2,5 μg	3 μg	4 μg	5 μg
Roztok BSA (μl)	0	5	10	15	20	25	30	40	50
Extrakční pufr (μl)	100	95	90	85	80	75	70	60	50

Všechny jamky, ve kterých byla měřena absorbancí, a tedy koncentrace proteinů, byly naplněny pipetou směsí 239 μl MiliQ a 60 μl Protein Assay Reagent Concentrate 5x na jednu jamku. Jamky 1 - 12 A (červené) slouží pro napipetování vždy 1 μl z mikrozkumavek s BSA ve vzrůstající koncentraci, jamky 1 A - H (zelené) slouží jako pouze blank. Do jamek označených žlutě se pipetuje vždy 1 μl vzorku ve třech opakováních, viz obr. 5.



Obr. 5. Mikrotitrační destička pro měření koncentrace proteinů

Pipetou se sterilní špičkou byly postupně všechny jamky důkladně promíchány a ponechány při pokojové teplotě 10 minut reagovat. Mezitím byl zapnut na počítači

software i-controlTM a spektrofotometr. Měření vzorků na mikrodestičce proběhlo při 595 nm. Obsah proteinů byl vypočítán z rovnice lineární regrese kalibrační křivky.

3.2.9 Příprava vzorků pro nanesení na gel

Ze zjištěné koncentrace proteinů v extraktech bylo vypočítáno potřebné množství proteinu a MiliQ do 75 μ l vzorku, pro docílení stejné koncentrace proteinů ve všech vzorcích. K těmto 75 μ l vzorku bylo v digestoři napipetováno 20 μ l 4x Laemmli pufru a 5 μ l 2-merkptoethanolu. Vzniklá směs se zahřála v digestoři na 95°C po dobu 5 minut a buď byla rovnou aplikována na gel, nebo uložena do mrazničky na -20°C, avšak poté bylo nutné vzorek znovu zahřát.

3.2.10 Výroba gelů

Před samotnou elektroforézou bylo potřeba připravit akrylamidové gely. Ze všeho nejdříve se musely vyčistit spodní 1,0 mm a horní tenké skla destilovanou vodou a 70% etanolem, aby se na nich nezadržovaly nečistoty, které by mohly interferovat s výsledky. Skla byla vysušena pomocí plynného dusíku. Po sestavení aparatury pro výrobu gelů byly skla naplněny destilovanou vodou podobu přibližně 5 minut, pro zjištění těsnění aparatury. Nejdříve byl (pro 12% gel, Tab. 2) smíchán v digestoři v kyvetě 40% akrylamid, 1,5 M Tris pufr, SDS a MiliQ. TEMED a APS byl napipetován až nakonec, protože zahajují polymeraci gelu. Lehkým vířením byl obsah kyvety promíchán, aby nedocházelo inkorporaci vzduchu do roztoku, protože polymerace probíhá anaerobně. Pasteurovou pipetou byl nanesen roztok mezi skla asi 1,5 cm pod horní hranu kratšího skla. Povrch dělicího gelu byl poté překryt isopropanolem, pro izolaci gelu od vzduchu. Gel se nechal polymerizovat 45 minut. Po dokončení polymerizace byl pomocí filtračního papíru odsát všechn isopropanol a napipetován zaostřovací gel, do kterého byl vložen plastový hřeben. Zaostřovací gel se nechal polymerizovat 30 minut. Hotový gel byl buď ihned použit, nebo bylo možné jej zabalit do folie potřísněné dH₂O a uložit do lednice.

Tab. 2 Příprava 12% polyakrylamidového gelu

Separační gel (5 ml)		Zaostřovací gel (2 ml)	
12%	objem (ml)	4%	objem (ml)
40% Akrylamid	1,000	40% Akrylamid	0,200
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	1,250	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	0,504
10% SDS	0,050	10% SDS	0,020
MiliQ	2,675	MiliQ	1,272
TEMED	0,003	TEMED	0,002
APS 10% (4 mg/ 40 µl)	0,025	APS 10% (4 mg/ 40 µl)	0,010

3.2.11 Gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Nejdříve byly již připravené vzorky umístěny do ledu a připravena elektroforetická vana a aparatura. Dále byl připraven running pufr, gely vloženy do aparatury, naplněné running pufr. Z gelů byl opatrně vytáhnut hřeben a jamky byly naplněny RB. Do první jamky na gelu bylo napipetováno 5 µl proteinového standardu a do zbylých jamek vždy 23 µl vzorku. Jakmile byly všechny vzorky napipetovány, byl celý tank naplněn RB, připojen ke zdroji na 10 mA na jeden gel. Samotná gelová elektroforéza trvala přibližně 4 - 5 hodin, jelikož jsem hledal proteiny molekulové hmotnosti v rozmezí 36 - 50 kDa.

3.2.12 Přenos proteinů na membránu

Pro přenesení proteinů z gelu na PVDF membránu bylo potřeba sestavit aparaturu pro proteinový transfer, vyříznout membránu a označit ji odstřížením rohu a vyrobit transfer pufr. Nejdříve byl vypojen elektroforetický tank od zdroje napětí, rozložena elektroforetická aparatura a pomocí plastových nástrojů oddělena skla od sebe. Gel byl poté opatrně vložen do transfer pufru bez methanolu, kde se ekvilibroval po dobu 30 minut. Dále byly připraveny dvě plastové houby a čtyři silnější filtrační papíry, které byly ponechány ponořené v transfer pufru s methanolem po dobu 30 minut. Nastříhanou membránu bylo nutné aktivovat ponořením do 100% methanolu po dobu 30 sekund, a potom ji nechat 10 minut inkubovat v transfer pufru bez methanolu. Po ekvilibraci byl složen sendvič, skládající se z kazety, položené černou stranou dolů = negativní pól, zvlhčené plastové houby, dvou zvlhčených silnějších filtračních papírů. Na ně byl položen ekvilibrovaný gel, otočený horní stranou dolů, a na něj inkubovaná membrána, která byla několikrát převálcována plastovým válečkem pro odstranění bublin. Na

membránu byly položeny znovu dva zvlhčené papíry, a na ně byla položena plastová houba. Kazeta byla přiklopena druhou průhlednou stranou a zajištěna proti otevření. Celá kazeta byla vložena do komory v tanku, černou stranou k černé, určené pro přenos proteinů. Ke komoře do tanku byl vložen chladicí box, celý tank se naplnil transfer pufrem s methanolem, vložil do lednice a zapojil do zdroje napětí na 100 V na 10 minut, poté přes noc na 16 V a nakonec na 100 V 30 minut pro dokončení přenosu. Po přenosu byla membrána ponechána zcela uschnout, a poté byla ponořena do 100% methanolu pro zafixování proteinů na ní, kvůli pozdějšímu restripování membrány. Nakonec byla membrána obarvena 3% roztokem Ponceau S v 5% kyselině octové po dobu 1 minuty a promyta destilovanou vodou pro zjištění úspěšnosti přenosu. Odbarvení membrány se provedlo třepáním membrány na třepačce ve skleněné nádobě 1x10 minut v destilované vodě a potom 3x10 minut v TBS-T pufru.

3.2.13 Blokování nespecifických vazeb a aplikace protilátek

Na zablokování nespecifických vazeb proteinů na membráně byl většinou použit roztok 5% BSA a 5% mléka v 12 ml TBS-T. První protilátka, která byla použita, byla fosfospecifická protilátka, protože na zablokování nespecifických vazeb se využívá pouze roztok 6% BSA v 12 ml TBS-T, neboť tato protilátka se váže i na kasein obsažený v mléce. Blokace probíhala dvě hodiny na pomalé třepačce při laboratorní teplotě. Následovalo promývání 2x5 minut v TBS-T na rychlé třepačce a aplikace primární protilátky a její inkubace na pomalé třepačce. Fosfospecifická protilátka byla ředěna 1:1000 s 5% BSA v 12 ml TBS-T a inkubovala se v chladničce při 4°C přes noc. Protilátka proti MMK3 byla ředěna 1:5000 s 3% mlékem v 12 ml TBS-T a inkubovala se dvě hodiny při laboratorní teplotě. Protilátka proti MPK6 byla ředěna 1:15000 v 1% BSA v 12 ml TBS-T a inkubovala se dvě hodiny při laboratorní teplotě. Primární protilátky byly po použití zamrazeny pro další použití. Následovalo promývání 6x10 minut v TBS-T na rychlé třepačce a dále aplikace sekundární protilátky, konjugované s křenovou peroxidasou, při pomalém třepání. Sekundární protilátka byla ředěna 1:5000 v 1% BSA v 12 ml TBS-T hodinu a půl při laboratorní teplotě. Po odlití sekundární protilátky byly membrány promyty 6x10 minut v TBS-T.

3.2.14 Detekce proteinů

Pro detekci proteinů na membráně, bylo připraveno ECL činidlo podle pokynů výrobce. Detekční roztok vznikne smícháním luminolu s peroxidem. Hned po promíchání musí být roztok uchovávan zabaleny v alobalu, protože je velmi citlivy na UV záření a musí se tedy připravovat vždy čerstvý a těsně před detekcí. PVDF membrána byla položena na prázdnou Petriho misku a roztok ECL byl napipetován na celý povrch membrány a ponechán na ní jednu minutu. Přebytečný substrát byl poté odpipetován a membrána byla vložena na snímání do dokumentačního přístroje BioRad ChemiDocTM MP.

3.2.15 Odstranění navázaných protilátek z membrán

Membrány mohou být použity pro navázání dalších protilátek několikrát, stačí, když jsou z nich předešlé protilátky odstraněny a membrána je do další aplikace protilátek uchovávána v lednici při 4°C v TBS-T pufru. Odstranění protilátek spočívá v promývání membrán v 0,5M NaOH 2x15 minut, dále promývání membrány v MiliQ 3x10 minut a nakonec promývání v TBS-T 3x15 minut, přičemž se v čistém TBS-T uloží do lednice. Poté je možné opakovat imunodetekci s dalšími protilátkami.

3.2.16 Vyhodnocování

Snímání a dokumentace membrán proběhlo v dokumentačním přístroji BioRad ChemiDocTM MP a programu Image lab. Nejdříve na vysokou citlivost pro vyhodnocení western blottingu a poté pro kolorimetrické stanovení snímání membrány s vyznačeným markerem.

4. VÝSLEDKY

V experimentální části mé bakalářské práce jsem se zaměřil na studium reakcí experimentálních rostlin na solný stres. Rostliny tolíce vojtěšky (*Medicago sativa*) s umlčenou expresí SIMKK rostoucích *ex vitro* reagovaly na stres, způsobený zaléváním 200 μ M roztokem chloridu sodného po dobu 48 hodin. Abych mohl detekovat přítomnost a aktivaci MAPK proteinů, byla provedena imunoblotová analýza. Tato analýza spočívala v detekci intenzity exprese proteinu MsSIMK, který vykazuje vysokou homologii k AtMPK6. SIMKK, jejíž exprese je v této linii potlačena, je nadřazeným aktivátorem SIMK v rámci signálních MAPK drah. Dále byla sledována přítomnost proteinu MMK3, což je MAPK specifická pro *Medicago sativa* o velikosti 44 kDa. Pro potvrzení průběhu fosforylace proteinů byla použita fosfospecifická protilátka (pERK), která slouží k detekci rostlinných MAPKs s fosforylovaným TEY motivem. Rostliny byly vyfoceny před experimentem, poté byly vyfoceny rostliny celé a s detaily kořenů s hlízkami, a to bezprostředně po experimentu a nakonec tři měsíce po experimentu. Jako pozadí celého experimentu a pro účely porovnání byl solný stres (250 μ M roztok NaCl) aplikován i na rostliny *Medicago sativa* cv. Europe rostoucí *in vitro* po dobu 30 minut.

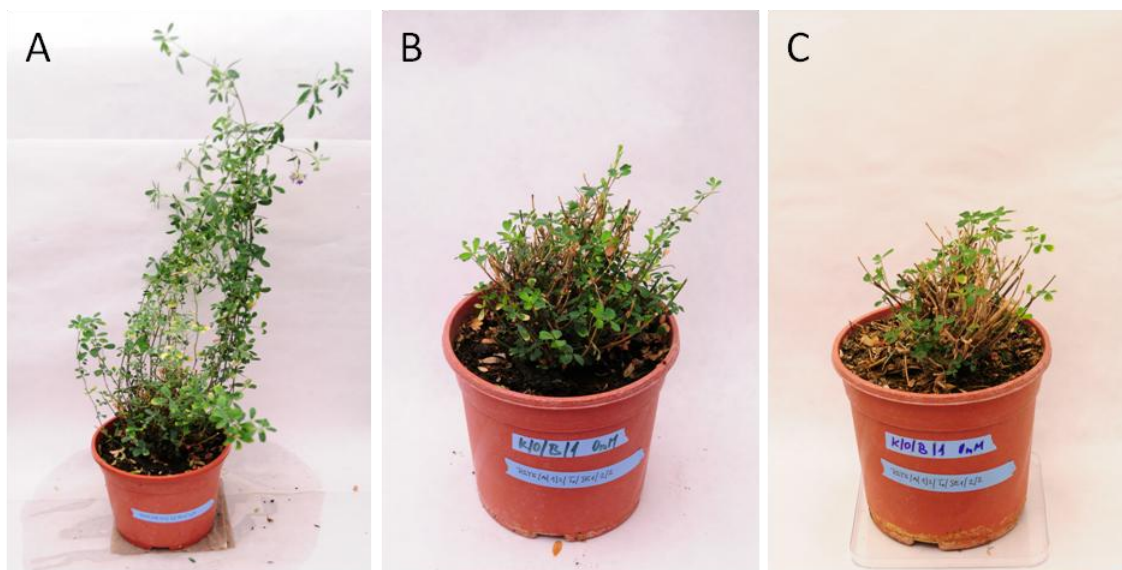
4.1 Pozorování fenotypu *in vitro* a *ex vitro* rostlin po aplikaci solného stresu

4.1.1 Pozorování fenotypu kontrolních a trangenních rostlin tolíce vojtěšky (*Medicago sativa*) kultivaru Regen SY

Pro fotografickou dokumentaci fenotypu nadzemních částí *ex vitro* kontrolních (Obr. 1, 2, 3 a 4) a trangenních rostlin (Obr. 5, 6, 7, 8, 9 a 10) tolíce vojtěšky (*Medicago sativa*) cv. Regen SY s potlačenou expresí SIMKK (*SIMKK RNAi*), na které byl aplikován solný stres ve formě 200 μ M roztoku chloridu sodného (Obr. 3, 4, 7, 8, 9, 10) nebo byly zalévány vodou z vodovodu po dobu 48 hodin (Obr. 1, 2, 5, 6), byl použit fotoaparát Nikon 7000. Rostliny byly foceny vždy před experimentem, poté ihned po experimentu

a nakonec měsíc po experimentu. Měsíc po aplikaci stresu byla kontrolována vitalita rostlin a přítomnost hlízek na kořenech. Polovina z vybraných rostlin byla cíleně kokultivována s půdními bakteriemi *Sinorhizobium meliloti*, jak se však později ukázalo, hlízky se nacházely na kořenech všech rostlin. Z největší pravděpodobností se rhizobakterie mezi ostatní rostlinami rozšířily skrz vodu, která se držela v jejich společné nádobě pod květináči po zalévání.

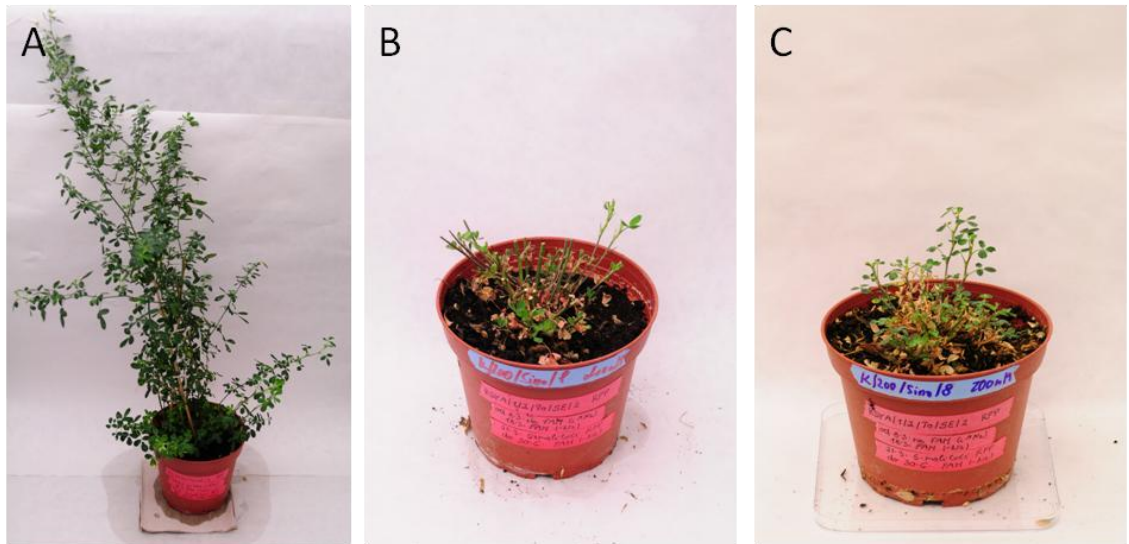
Rostliny se sníženou expresí signálního proteinu SIMKK (*SIMKK RNAi*) vykazovaly větší náchylnost k solnému stresu (Obr. 7 a 9) a zároveň u nich docházelo v mnohem menší míře k vytvoření symbiotických vztahů s půdními bakteriemi *Sinorhizobium meliloti* (Obr. 6, 8 a 10). Kontrolní rostliny byly vůči stresu způsobenému 200 μ M roztoku NaCl odolnější. Dvě rostliny *SIMKK RNAi* v důsledku stresu uhynuly. Při kontrole přítomnosti hlízek na kořenech těchto rostlin žádné nalezené nebyly (Obr. 8 a 10).



Obr. 1 Fenotyp nadzemní části kontrolní rostliny č. 1 *Medicago sativa* kultivar Regen SY, kokultivované s *Sinorhizobium meliloti* v půdě, zalévané vodou. Fotografie byly pořízeny před solným experimentem (A), bezprostředně po solném experimentu (B) a jeden měsíc po experimentu (C). Fotografie B a C byly pořízeny 10 dní po sestřihání rostlin.



Obr. 2 Fenotyp kořenové části a kontrola přítomnosti hlízek na kontrolní rostlině č. 1 *Medicago sativa* kultivar Regen SY, kokultivované s *Sinorhizobium meliloti* v půdě, zalévané vodou. Fotografie byly pořízeny bezprostředně po solném experimentu (vlevo) a jeden měsíc po experimentu (vpravo). Hlízky jsou označeny šipkami.



Obr. 3 Fenotyp nadzemní části kontrolní rostliny č. 8 *Medicago sativa* kultivar Regen SY, kokultivované s *Sinorhizobium meliloti* v půdě, zalévané 200 μ M roztokem NaCl. Fotografie byly pořízeny před solným experimentem (A), bezprostředně po solném experimentu (B) a jeden měsíc po experimentu (C). Fotografie B a C byly pořízeny 10 dní po sestřihání rostlin.



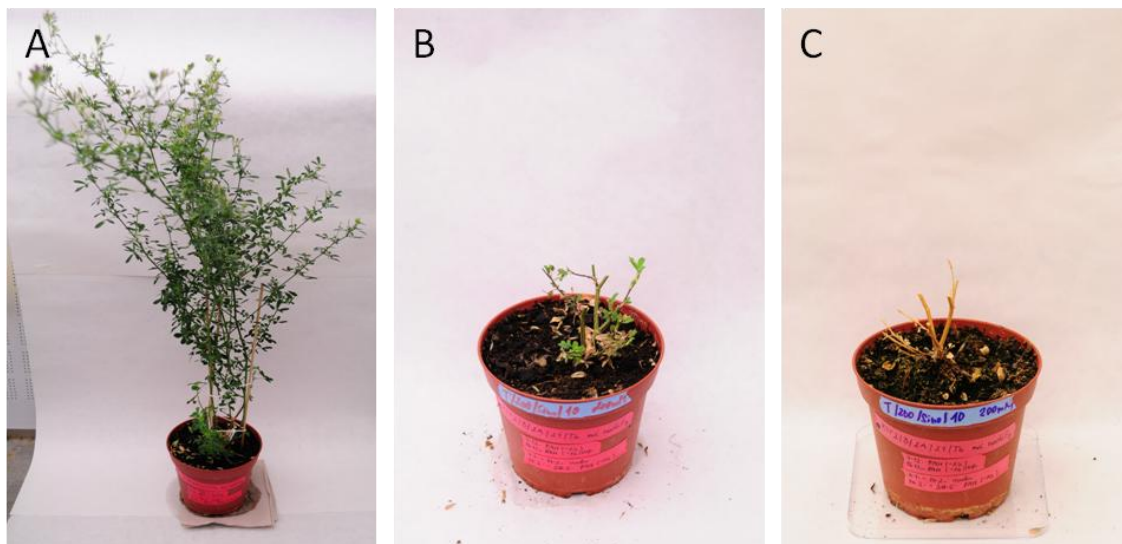
Obr. 4 Fenotyp kořenové části a kontrola přítomnosti hlízek na kontrolní rostlině č. 8 *Medicago sativa* kultivar Regen SY, kokultivované s *Sinorhizobium meliloti* v půdě, zalévané 200 μ M roztokem NaCl. Fotografie byly pořízeny bezprostředně po solném experimentu (vlevo) a jeden měsíc po experimentu (vpravo). Hlízky jsou označeny šipkami.



Obr. 5 Fenotyp nadzemní části rostliny č. 4 *Medicago sativa* kultivar Regen SY *SIMKK-RNAi*, kokultivované s *Sinorhizobium meliloti* v půdě, zalévané vodou. Fotografie byly pořízeny před solným experimentem (A), bezprostředně po solném experimentu (B) a jeden měsíc po experimentu (C). Fotografie B a C byly pořízeny 10 dní po sestřihání rostlin.



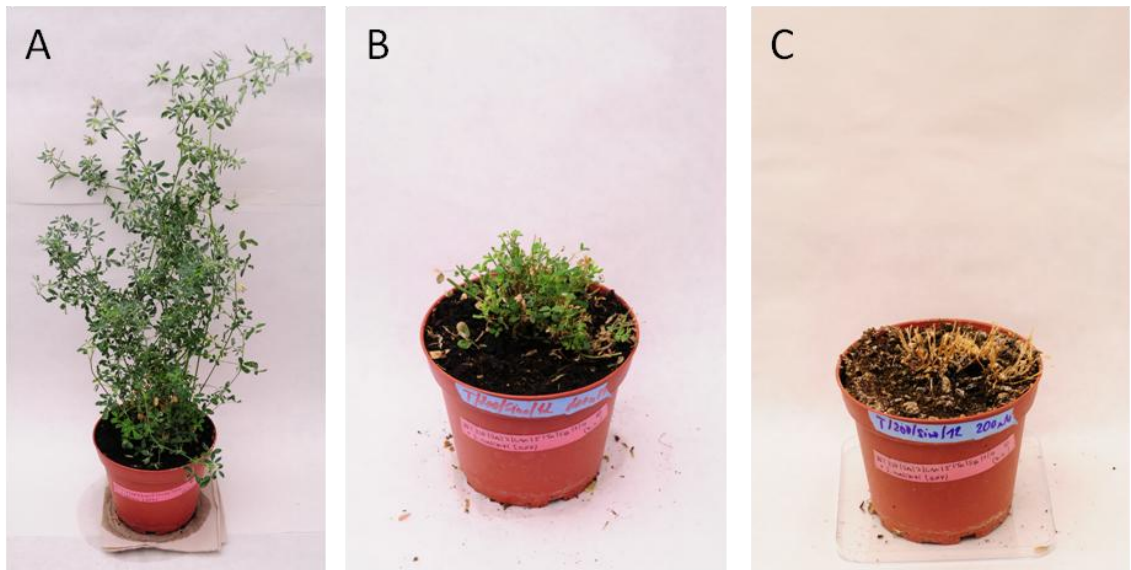
Obr. 6 Fenotyp kořenové části a kontrola přítomnosti hlízek na rostlině č. 4 *Medicago sativa* kultivar Regen SY *SIMKK-RNAi*, kokultivované s *Sinorhizobium meliloti* v půdě, zalévané vodou. Fotografie byly pořízeny bezprostředně po solném experimentu (vlevo) a jeden měsíc po experimentu (vpravo). Hlízky jsou označeny šipkami.



Obr. 7 Fenotyp nadzemní části rostliny č. 10 *Medicago sativa* kultivar Regen SY *SIMKK-RNAi*, kokultivované s *Sinorhizobium meliloti* v půdě, zalévané 200 μ M roztokem NaCl. Fotografie byly pořízeny před solným experimentem (A), bezprostředně po solném experimentu (B) a jeden měsíc po experimentu (C). Fotografie B a C byly pořízeny 10 dní po sestřihání rostlin.



Obr. 8 Fenotyp kořenové části a kontrola přítomnosti hlízek na rostlině č. 10 *Medicago sativa* kultivar Regen SY *SIMKK-RNAi*, kokultivované s *Sinorhizobium meliloti* v půdě, zalévané 200 μ M roztokem NaCl. Fotografie byly pořízeny bezprostředně po solném experimentu (vlevo) a jeden měsíc po experimentu (vpravo). Hlízky jsou označeny šipkami.



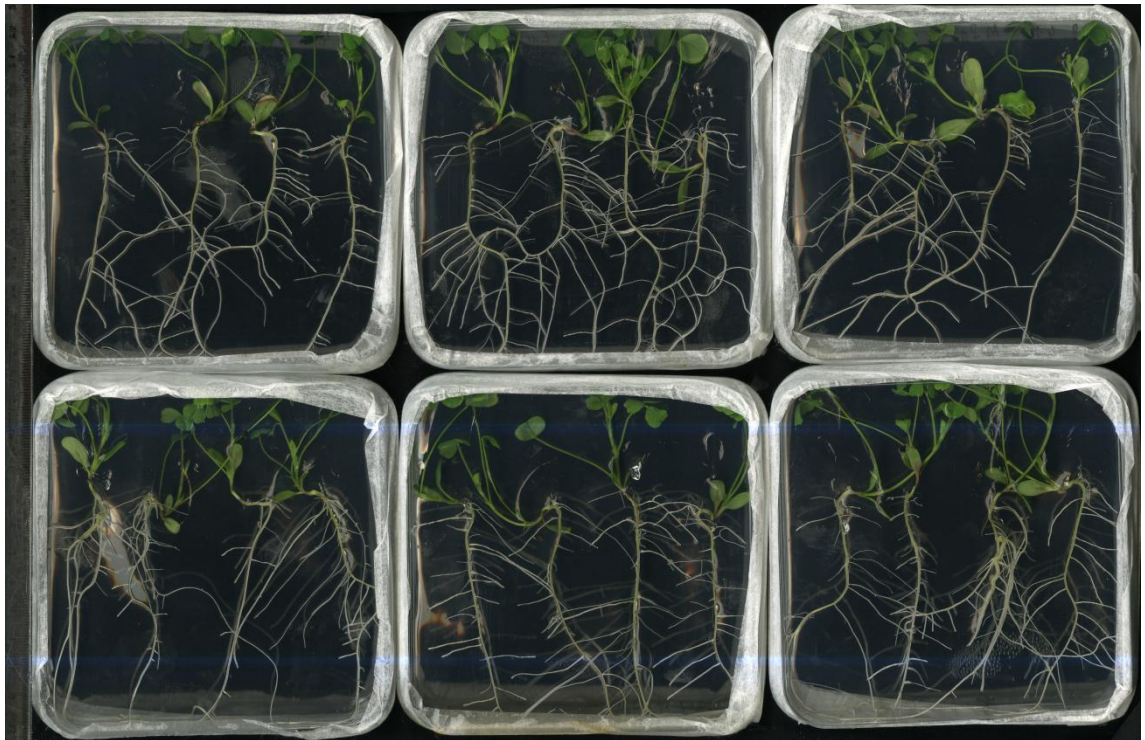
Obr. 9 Fenotyp nadzemní části rostliny č. 12 *Medicago sativa* kultivar Regen SY *SIMKK-RNAi*, kokultivovaný s *Sinorhizobium meliloti* v půdě, zalévané 200 μ M roztokem NaCl. Fotografie byly pořízeny před solným experimentem (A), bezprostředně po solném experimentu (B) a jeden měsíc po experimentu (C). Fotografie B a C byly pořízeny 10 dní po sestřihání rostlin.



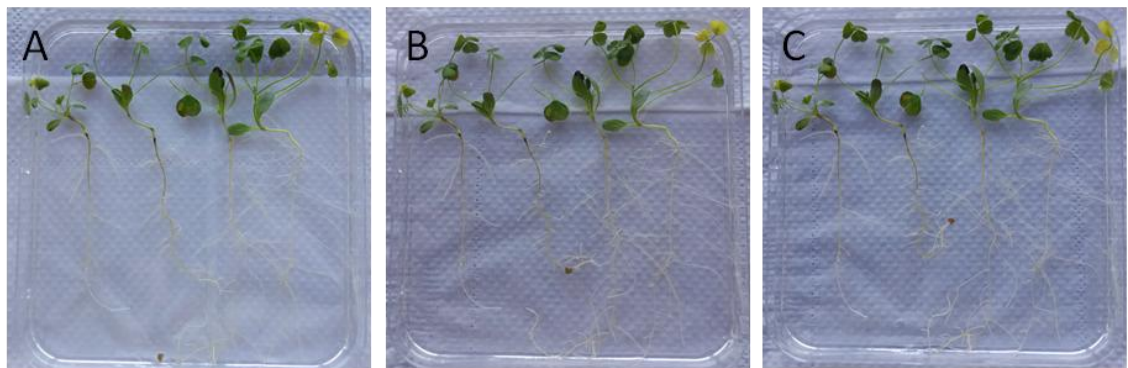
Obr. 10 Fenotyp kořenové části a kontrola přítomnosti hlízek na rostlině č. 12 *Medicago sativa* kultivar Regen SY *SIMKK-RNAi*, kokultivované s *Sinorhizobium meliloti* v půdě, zalévané 200 μ M roztokem NaCl. Fotografie byly pořízeny bezprostředně po solném experimentu (vlevo) a jeden měsíc po experimentu (vpravo). Hlízky jsou označeny šipkami.

4.1.2 Pozorování fenotypu rostlin tolíce vojtěšky (*Medicago sativa*) cv. Europe

Jako “kontrolní“ srovnávací pro experiment se solným stresem pro *ex vitro* rostliny byly použity rostliny divokého typu *Medicago sativa* kultivar Europe, které rostly *in vitro* na pevném MS médiu po dobu 20 dní. Pro pozorování fenotypu *in vitro* semenáčků rostlin tolíce vojtěšky (*Medicago sativa*) kultivar Europe, na které byl aplikován solný stres ve formě 250 μ M roztoku chloridu sodného v tekutém MS médiu po dobu 30 minut, byl použit fotoaparát Nikon 7000 a ImageScanner™ III. Semenáčky byly naskenovány před experimentem (Obr. 11), a poté foceny v průběhu experimentu, vždy po deseti minutách před odběrem vzorků. Pro kontrolu působení stresu byly kontrolní rostliny zalévány pouze tekutým MS médiem. Jak se později ukázalo, tekuté MS médium vyvolalo u rostlin mírný osmotický stres. Rostlinám, které byly zalévány roztokem soli v průběhu 30 minut, postupně poléhaly a uvadaly listy (Obr. 12).



Obr. 11 Semenáčky *Medicago sativa* kultivar Europe kultivované na pevném MS médiu, 20 dní po vyklíčení. Fotografie byly pořízeny před solným experimentem.

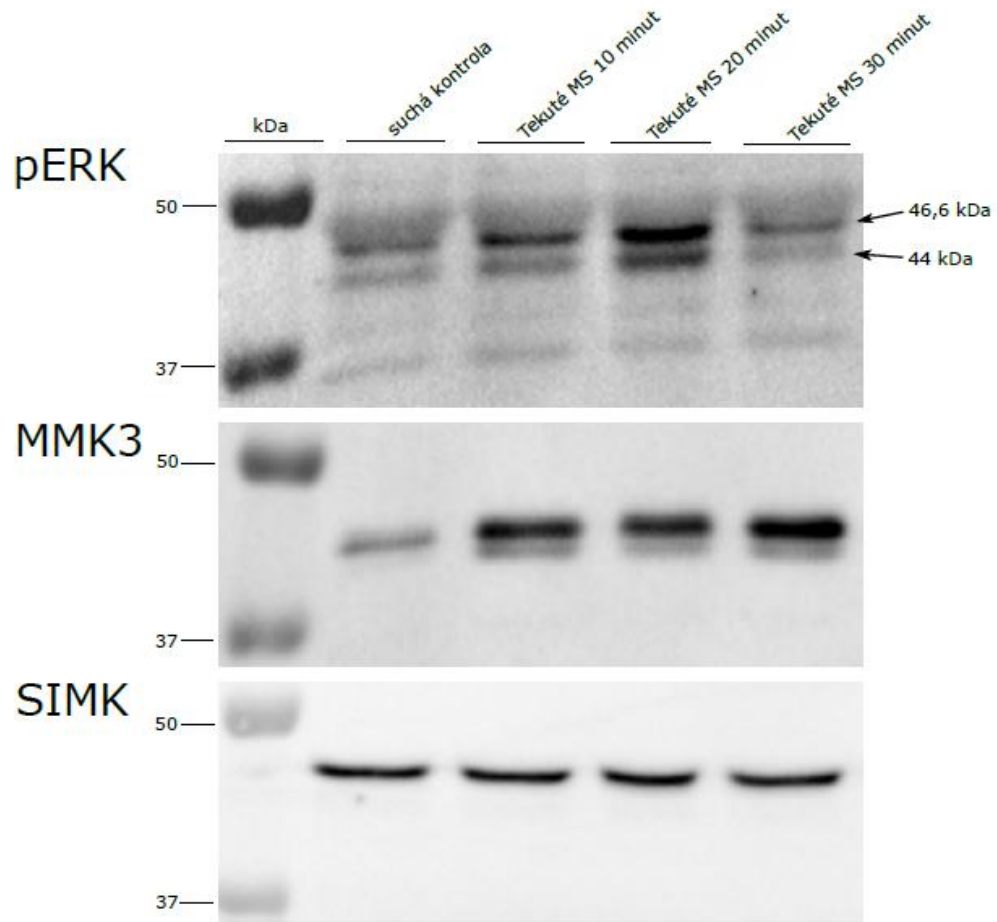


Obr. 12 Semenáčky *Medicago sativa* kultivar Europe kultivované na pevném MS médiu, na které byl aplikován solný stres 250 μ M roztokem NaCl, 20 dní po vyklíčení. Fotografie byly pořizovány v průběhu experimentu po 10 minutách (A), 20 minutách (B) a 30 minutách (C).

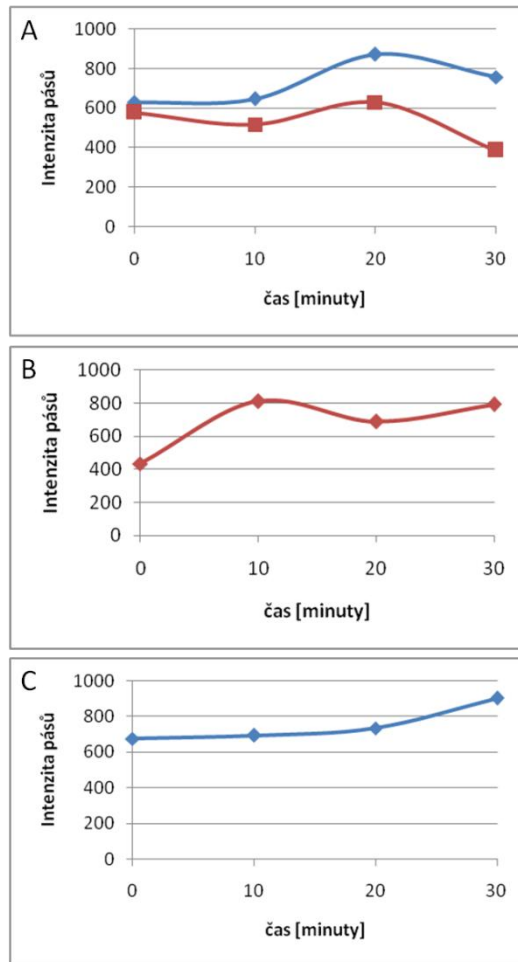
4.2 Detekce proteinů po aplikaci solného stresu

4.2.1 Detekce proteinů z rostlin pěstovaných *in vitro*

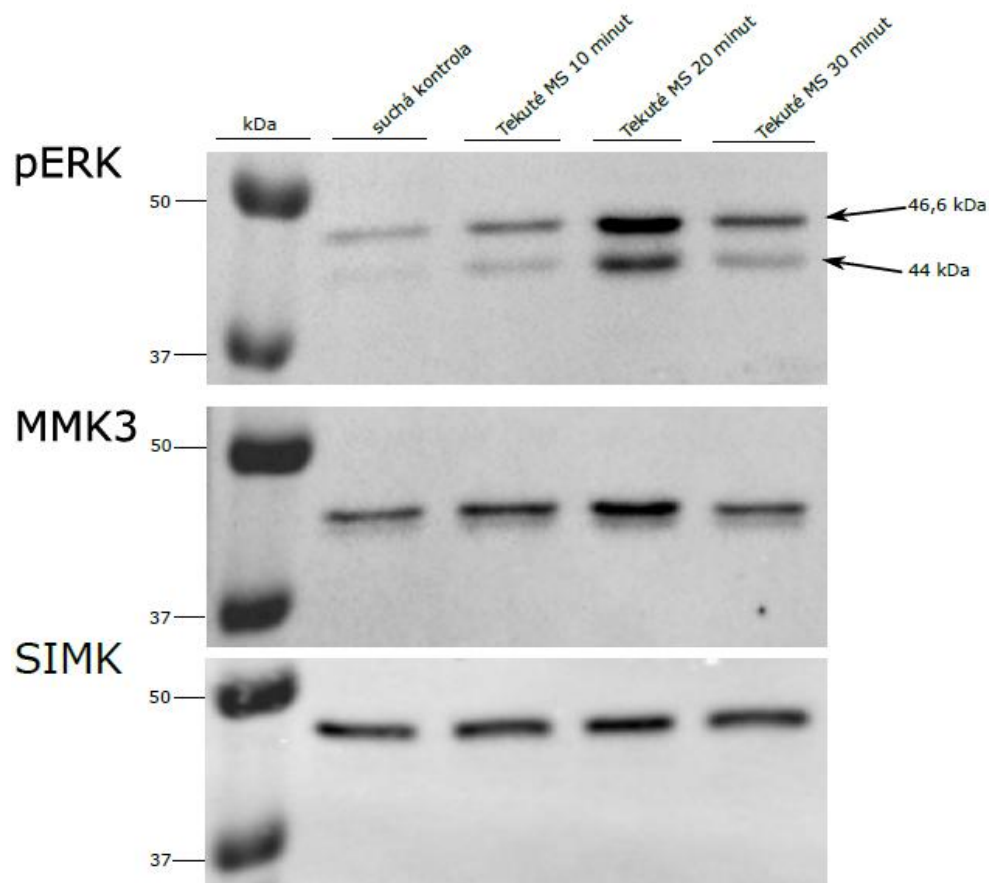
Jako porovnávací experiment k solnému stresu u *ex vitro* kultivovaných rostlin byl proveden stejný experiment s rostlinami tolíce vojtěšky (*Medicago sativa*) kultivaru Europe, divokého typu, pěstovaných *in vitro*. Pro detekci relativního množství proteinu SIMK, proteinu MMK3 (obě exprimované v *Medicago sativa*, jako součást signalizační kaskády spolu se SIMKK) a úrovně jejich fosforylace pomocí pERK protilátky, která specificky rozpoznává dvojitě fosforylovaný TEY motiv u MAP kinas, byla provedena imunoblotová analýza. Jako kontrolní varianta k působení solného stresu byly kontrolní rostliny zalévány pouze tekutým MS médiem. Ukázalo se, že tekuté MS médium vyvolalo u rostlin mírný osmotický stres, který vyvolával v listech největší míru fosforylace MAPK proteinů při 20 minutách (Obr. 13, 14). K nejvyšší míře exprese proteinu MMK3 docházelo při 10 a 30 minutách (Obr. 13 a 14) a nejvyšší expresi SIMK při 30 minutách (Obr. 13 a 14). Avšak v kořenech docházelo k nejvyšší expresi MMK3 i SIMK kolem 20. Minuty (Obr. 15 a 16). Rostliny, na které byl aplikován solný stres ve formě 250 μ M roztoku chloridu sodného v tekutém MS médiu po dobu 30 minut, vykazovaly v listech nejvyšší expresi proteinů MMK3 i SIMK mezi 10 až 20 minutou (Obr. 17 a 18). V kořenech těchto rostlin docházelo k nejvyšší expresi obou proteinu kolem 10. minuty (Obr. 19 a 20) a ke zvýšené fosforylaci docházelo kolem 10. a 30. minuty.



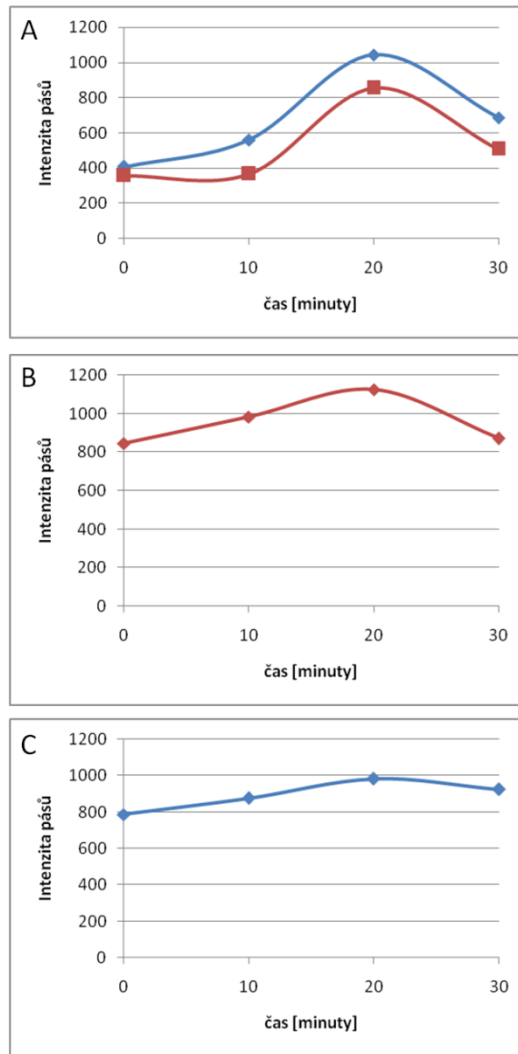
Obr. 13 Detekce fosforylovaných MAPK pomocí fosfospecifické protilátky, a obsahu proteinů MMK3 a SIMK ze vzorků z listů rostlin *M. sativa* cv. Europe, které byly zality tekutým MS médiem po dobu 30 minut. Na horním snímku jsou výsledky imunodetekce fosforylovaných MAPK pomocí anti-pTEpY protilátky (pERK). Jsou vidět dva pruhy, z nichž horní svou velikostí odpovídá SIMK a spodní MMK3. Prostřední snímek vyjadřuje výsledky detekce MMK3 proteinu a spodní snímek detekci SIMK proteinu.



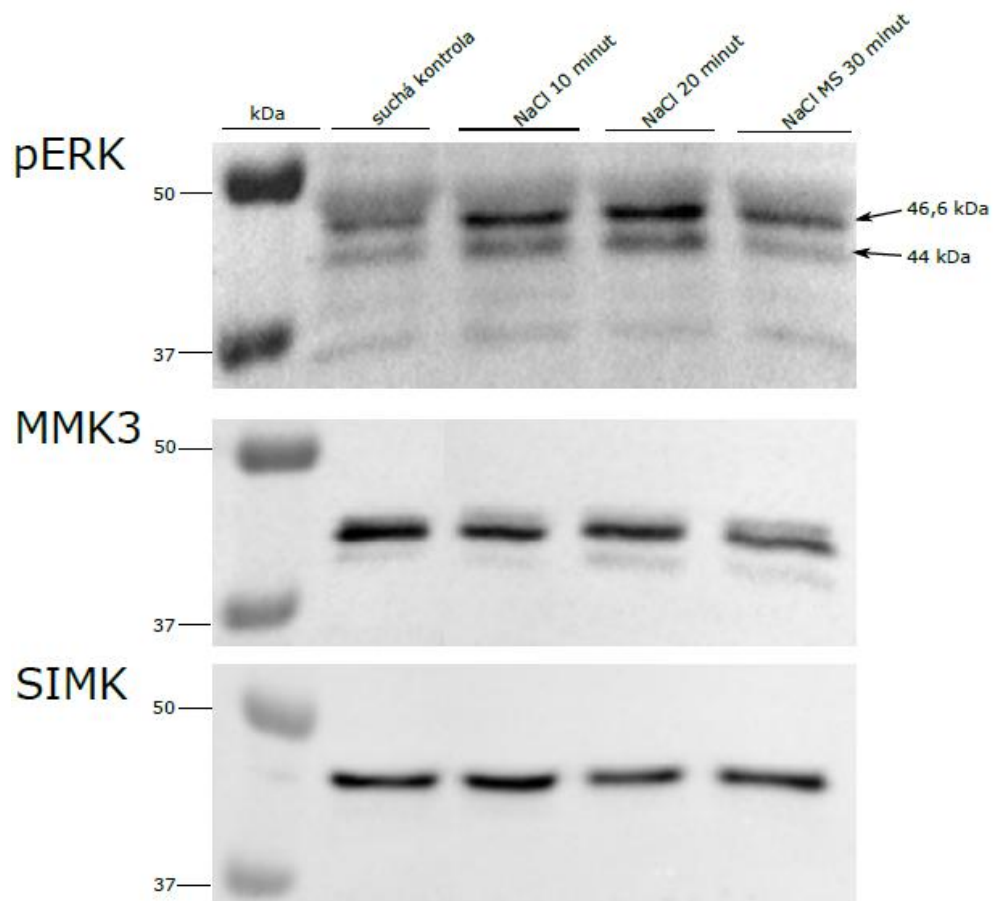
Obr. 14 Závislost intenzity pásů na čase. Semikvantitativní vyhodnocení detekce fosforylované SIMK (modrá) a MMK3 (červená) pomocí fosfospecifické protilátky (A), proteinu MMK3 (B) a proteinu SIMK (C) ze vzorků z listů rostlin *M. sativa* cv. Europe, které byly zality tekutým MS médiem po dobu 30 minut.



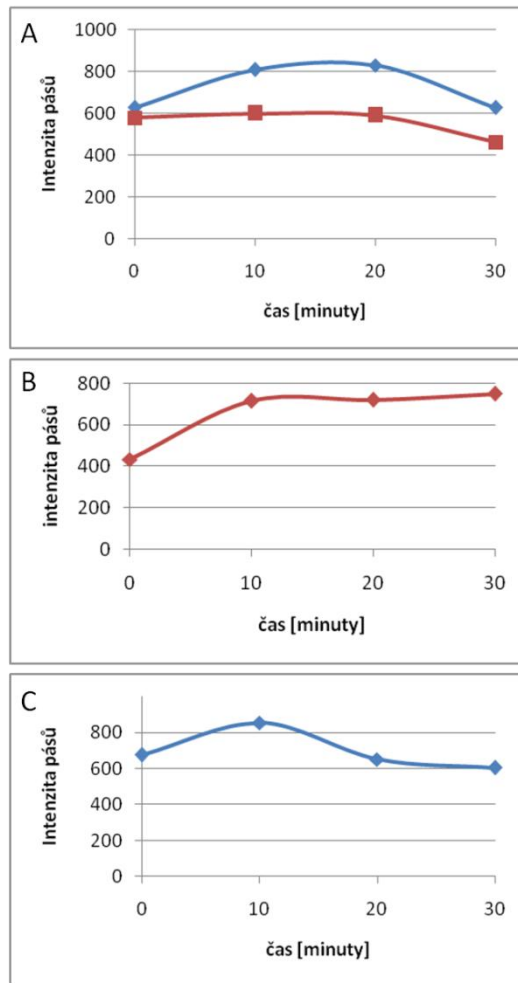
Obr. 15 Detekce fosforylovaných MAPK pomocí fosfospecifické protilátky, a obsahu proteinů MMK3 a SIMK ze vzorků z kořenů rostlin *M. sativa* cv. Europe, které byly zality tekutým MS médiem po dobu 30 minut. Na horním snímku jsou výsledky imunodetekce fosforylovaných MAPK pomocí anti-pTEpY protilátky (pERK). Jsou vidět dva pruhy, z nichž horní svou velikostí odpovídá SIMK a spodní MMK3. Prostřední snímek vyjadřuje výsledky detekce MMK3 proteinu a spodní snímek detekci SIMK proteinu.



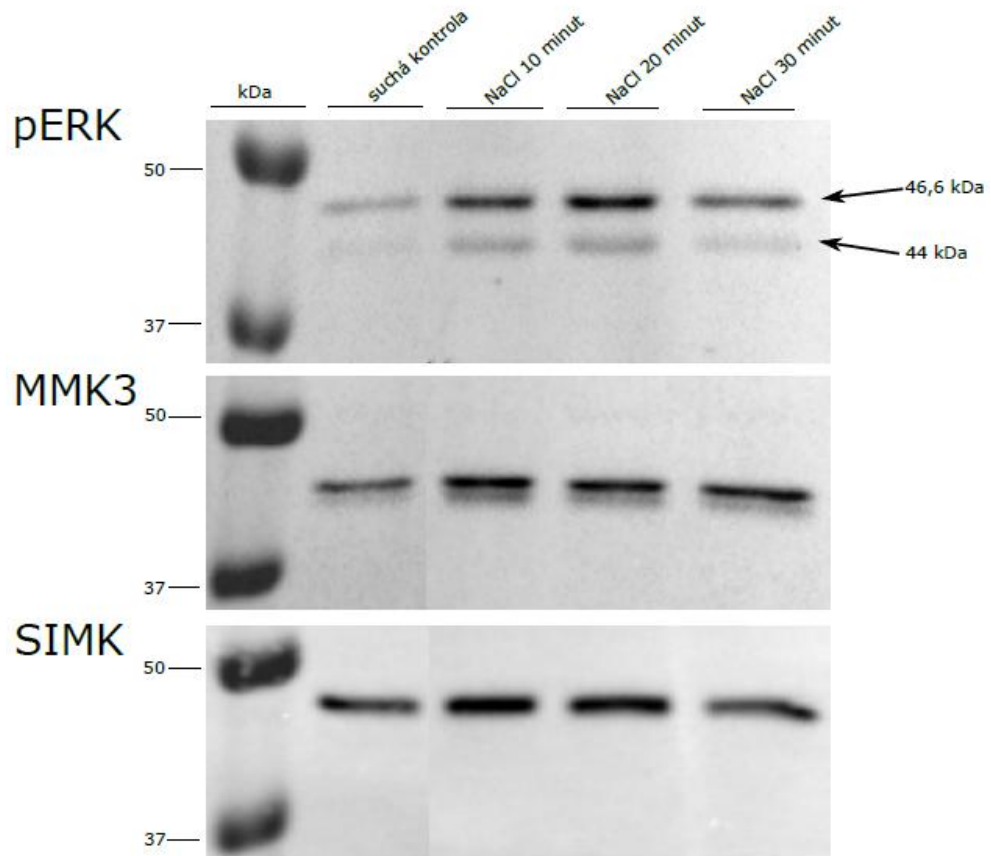
Obr. 16 Závislost intenzity pásů na čase. Semikvantitativní vyhodnocení detekce fosforylované SIMK (modrá) a MMK3 (červená) pomocí fosfospecifické protilátky (A), proteinu MMK3 (B) a proteinu SIMK (C) ze vzorků z kořenů rostlin *M. sativa* cv. Europe, které byly zality tekutým MS médiem po dobu 30 minut.



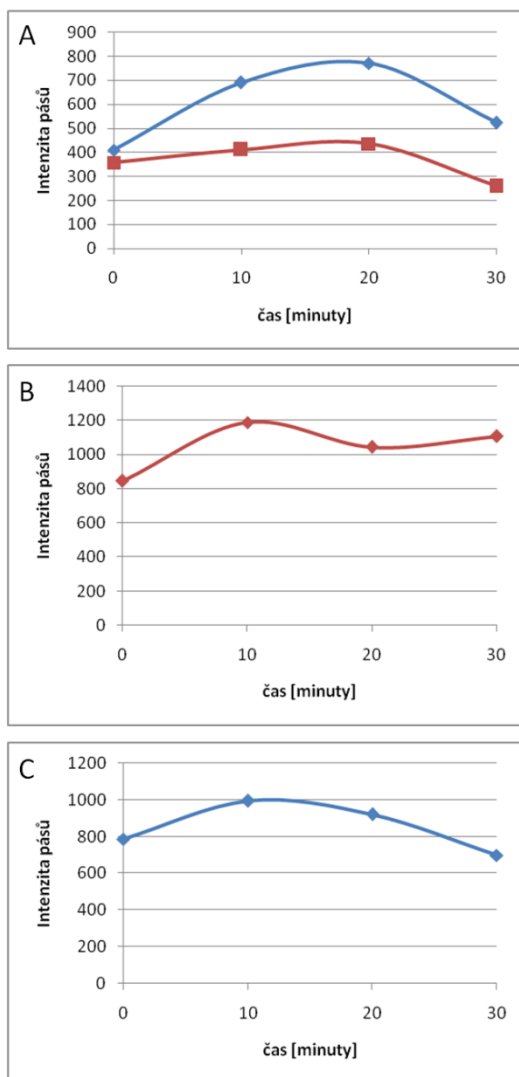
Obr. 17 Detekce fosforylovaných MAPK pomocí fosfospecifické protilátky, a obsahu proteinů MMK3 a SIMK ze vzorků z listů rostlin *M. sativa* cv. Europe, které byly zality 250 μ M roztokem NaCl po dobu 30 minut. Na horním snímku jsou výsledky imunodetekce fosforylovaných MAPK pomocí anti-pTEpY protilátky (pERK). Jsou vidět dva pruhy, z nichž horní svou velikostí odpovídá SIMK a spodní MMK3. Prostřední snímek vyjadřuje výsledky detekce MMK3 proteinu a spodní snímek detekci SIMK proteinu.



Obr. 18 Závislost intenzity pásů na čase. Semikvantitativní vyhodnocení detekce fosforylované SIMK (modrá) a MMK3 (červená) pomocí fosfospecifické protilátky (A), proteinu MMK3 (B) a proteinu SIMK (C) ze vzorků z listů rostlin *M. sativa* cv. Europe, které byly zality 250 μ l roztokem po dobu 30 minut.



Obr. 19 Detekce fosforylovaných MAPK pomocí fosfospecifické protilátky, a obsahu proteinů MMK3 a SIMK ze vzorků z kořenů rostlin *M. sativa* cv. Europe, které byly zality 250 μ M roztokem NaCl po dobu 30 minut. Na horním snímku jsou výsledky imunodetekce fosforylovaných MAPK pomocí anti-pTEpY protilátky (pERK). Jsou vidět dva pruhy, z nichž horní svou velikostí odpovídá SIMK a spodní MMK3. Prostřední snímek vyjadřuje výsledky detekce MMK3 proteinu a spodní snímek detekci SIMK proteinu.



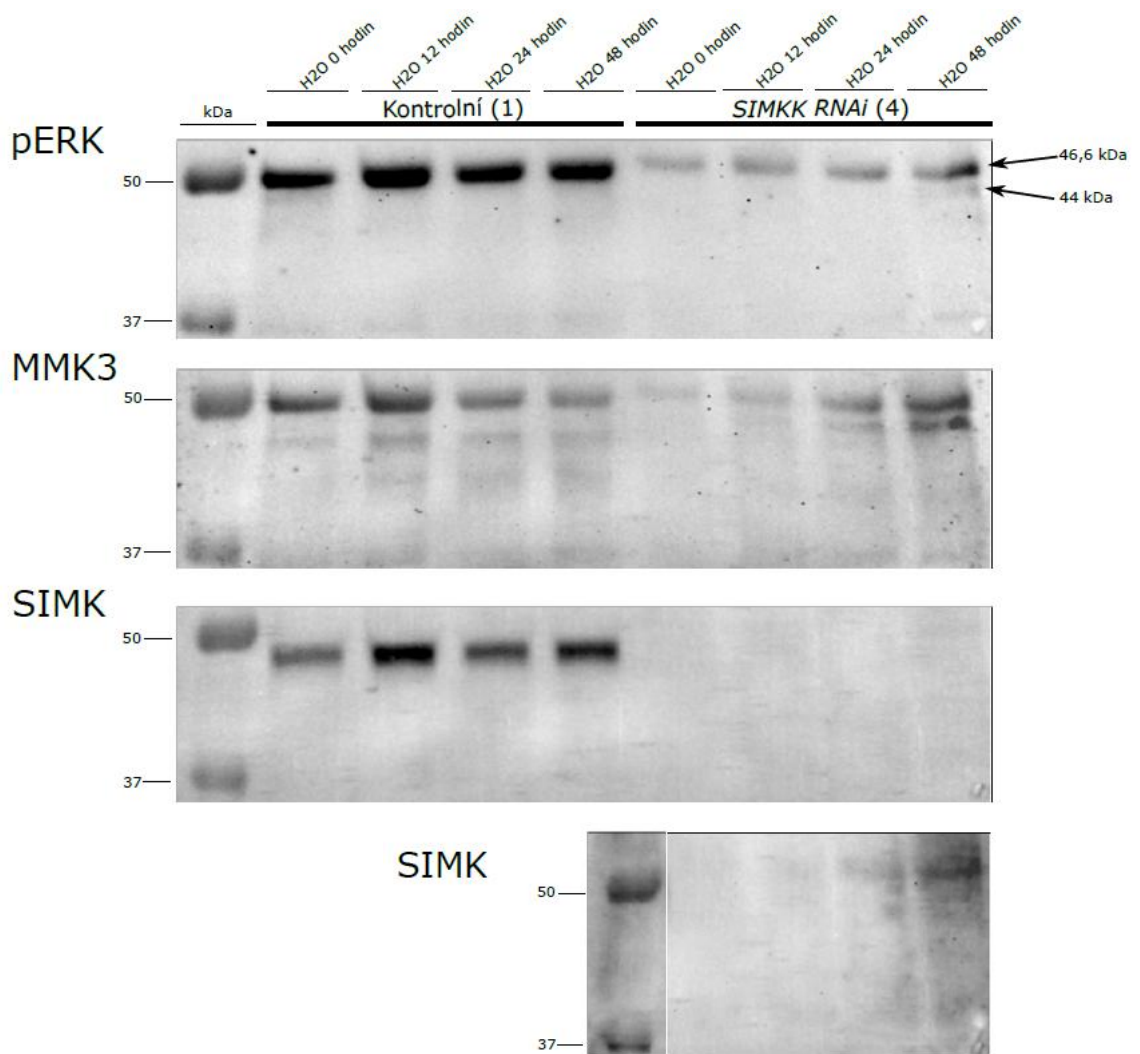
Obr. 20 Obr. 18 Závislost intenzity pásů na čase. Semikvantitativní vyhodnocení detekce fosforylované SIMK (modrá) a MMK3 (červená) pomocí fosfospecifické protilátky (A), proteinu MMK3 (B) a proteinu SIMK (C) ze vzorků z kořenů rostlin *M. sativa* cv. Europe, které byly zality 250 μ l roztokem po dobu 30 minut.

4.2.2 Detekce proteinů z rostlin, pěstovaných *ex vitro*

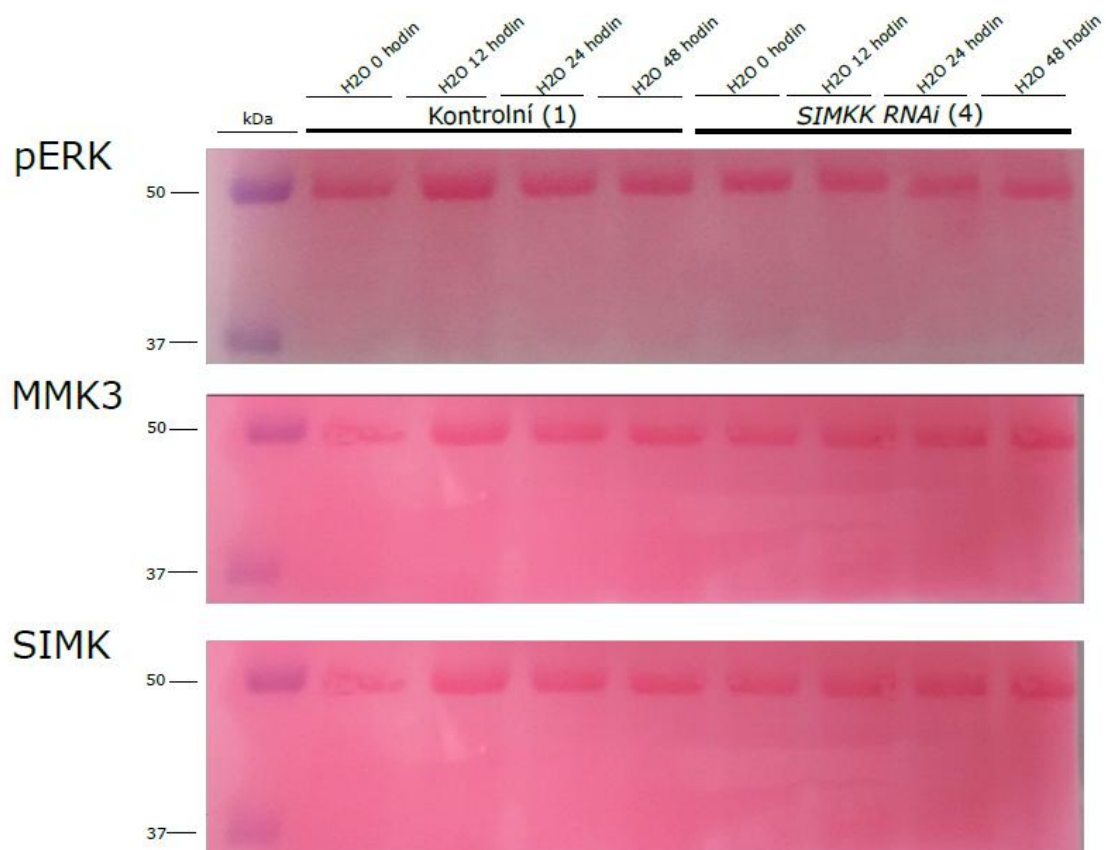
Hlavní částí celé bakalářské práce byla detekce proteinů SIMK a MMK3 (obě exprimované v *Medicago sativa*, jako součást signalizační kaskády spolu se SIMKK) u rostlin tolíce vojtešky (*Medicago sativa*) se sníženou expresí proteinu SIMKK metodou RNA interference. Jde o posttranskripční způsob potlačení exprese daného proteinu, při kterém se v buňce vytvářejí malé nekódujících RNA molekuly (siRNA a miRNA). Tyto molekuly prochází různými úpravami, než dosáhnou své konečné podoby. Ty se začleňují do ribonukleoproteinů, kde dojde k jejich úpravě a rozpletení, přičemž jedno vlákno zůstává v proteinu navázáno. Vzniklý komplex se naváže na cílovou sekvenci mRNA, která je komplementární k malé molekule RNA. Dochází k interferenci, která může vyústit buď v úplnou degradaci cílové mRNA (pokud dojde k dokonalému navázání na mRNA - siRNA) nebo k zabránění translace mRNA (pokud nedojde k dokonalému navázání na mRNA - miRNA), čímž je docíleno snížení exprese daného proteinu (Svoboda *et al.*, 2002; Carthew a Sontheimer, 2009; Voinnet, 2009; Farnham *et al.*, 2013). Pro studium reakcí těchto rostlin na solný stres byla provedena imunoblotová analýza pro detekci relativního množství proteinu SIMK, proteinu MMK3 pomocí protein-specifických protilátek a imunoblotová analýza pro detekci fosforylovaných (aktivovaných) proteinů MAPK proteinů pomocí pERK protilátky. Jednotlivé membrány byly ponechány ke snímání v dokumentačním zařízení po dobu 60 sekund.

Největší rozdíly mezi liniemi byly patrné při detekování přítomnosti proteinu SIMK. Ten se u *SIMKK RNAi* linií vyskytoval ve velmi malé míře (Obr. 21, 23, 25 a 27). Z tohoto důvodu byly membrány ponechány v dokumentačním přístroji po dobu 20 minut (Obr. 21, 25, 27 - spodní část). Dále byla zaznamenána zvýšená exprese proteinu MMK3 u *SIMKK RNAi* linií, zřejmě jako reakce rostlin na potlačení exprese proteinu SIMK, který se normálně účastní signální dráhy aktivované po solném stresu (Obr. 21, 25 a 27).

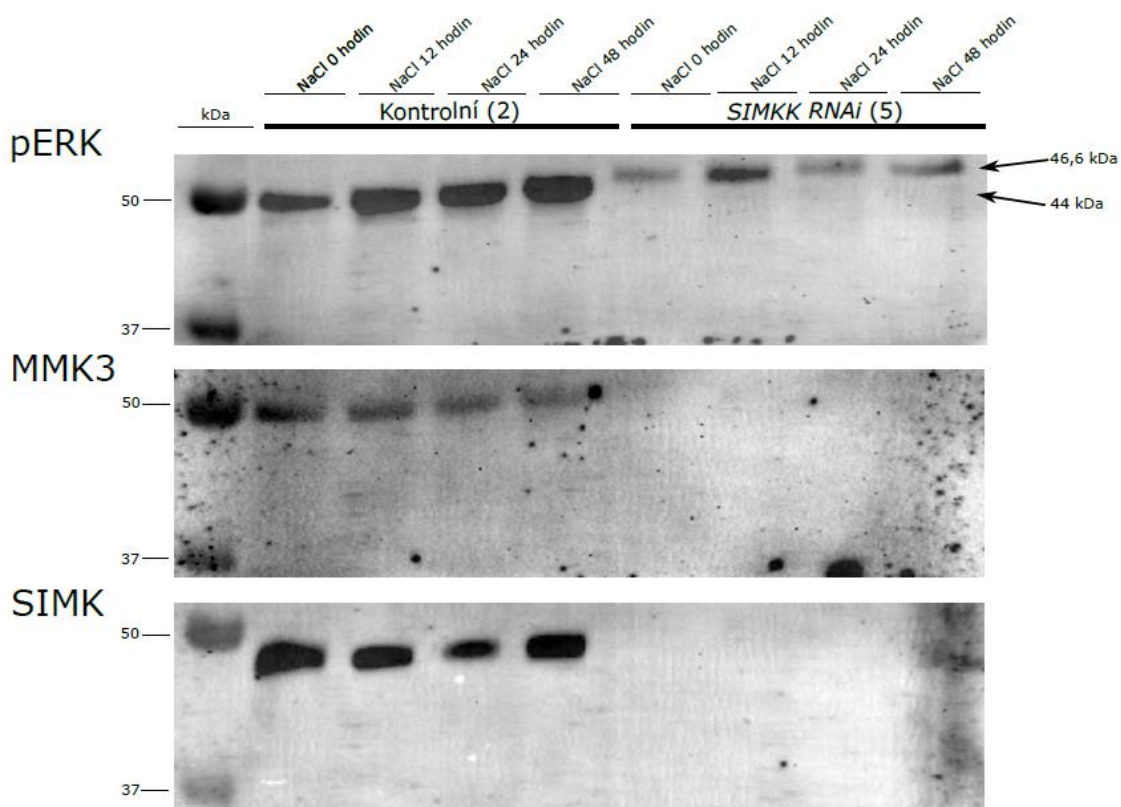
Přítomnost navázaných proteinů na PVDF membránu byla potvrzována po přenosu proteinů z gelu na membránu pomocí barviva Ponceau S v 5% kyselině octové (Obr. 22, 24, 26 a 28).



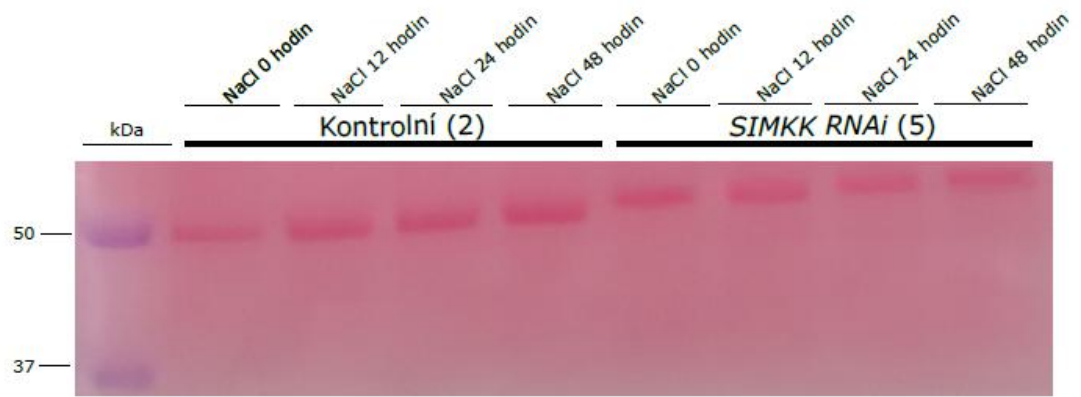
Obr. 21 Detekce fosforylovaných MAPK pomocí fosfospecifické protilátky, a obsahu proteinů MMK3 a SIMK ze vzorků z listů kontrolních (1) a *SIMKK RNAi* (4) rostlin *M. sativa* cv. *Regen SY* rostoucích v půdě v květináčích, které byly zalévány vodou po dobu 48 hodin. Na horním snímku jsou výsledky imunodetekce fosforylovaných MAPK pomocí anti-pTEpY protilátky (pERK). Membrány byly snímány po dobu jedné minuty. Spodní snímek je membrána, která byla snímána po dobu 20 minut a ukazuje detekci proteinu SIMK. K nejvyšší expresi obou proteinů a k jejich fosforylaci u kontrolních rostlin docházelo kolem 12. hodiny. U transgenních rostlin byla nejvyšší exprese MMK3 zaznamenána kolem 48. hodiny, protein SIMK se podařilo zaznamenat jen slabě při 48. hodině.



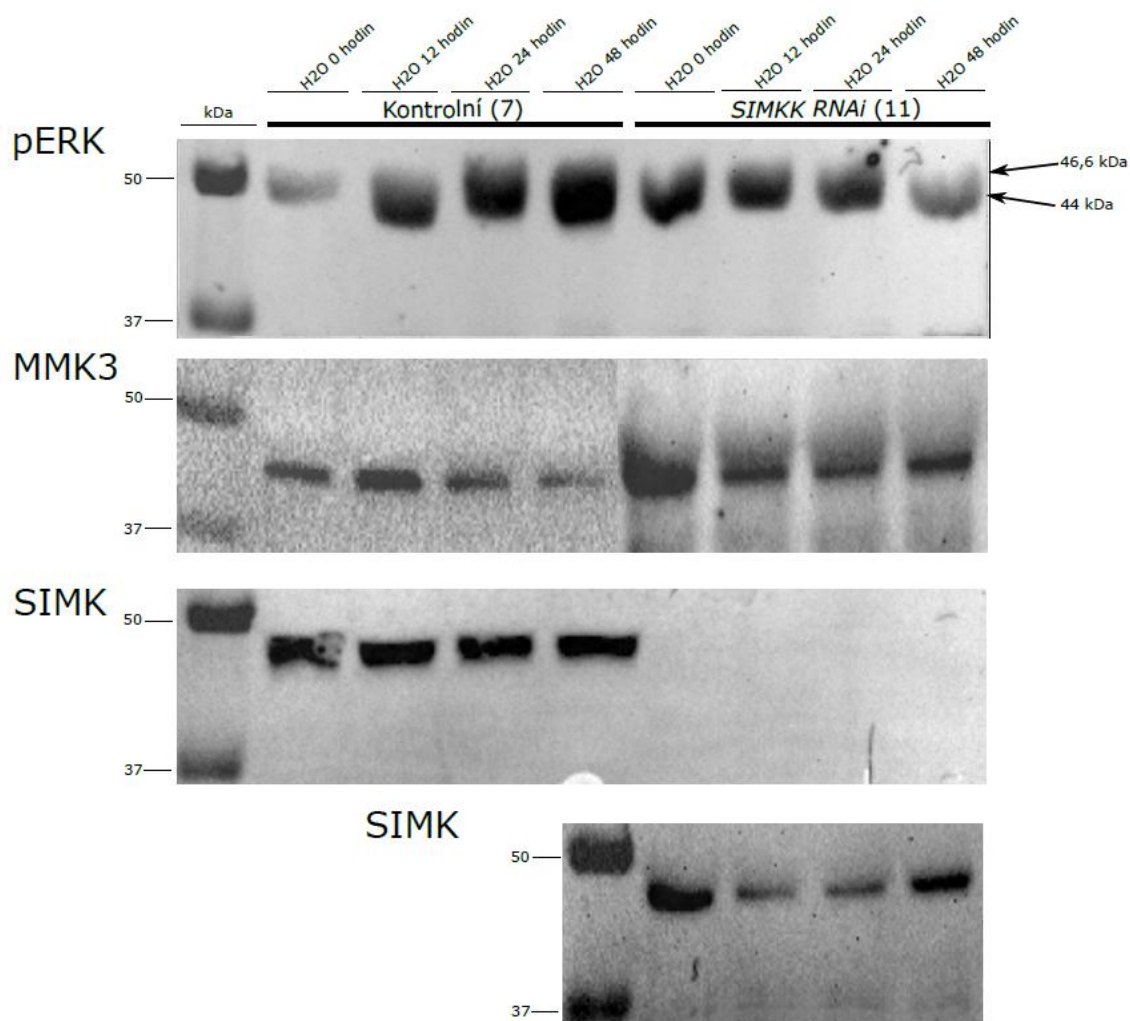
Obr. 22 PVDF membrány s proteiny obarvenými roztokem Ponceau S v 5% kyselině octové.



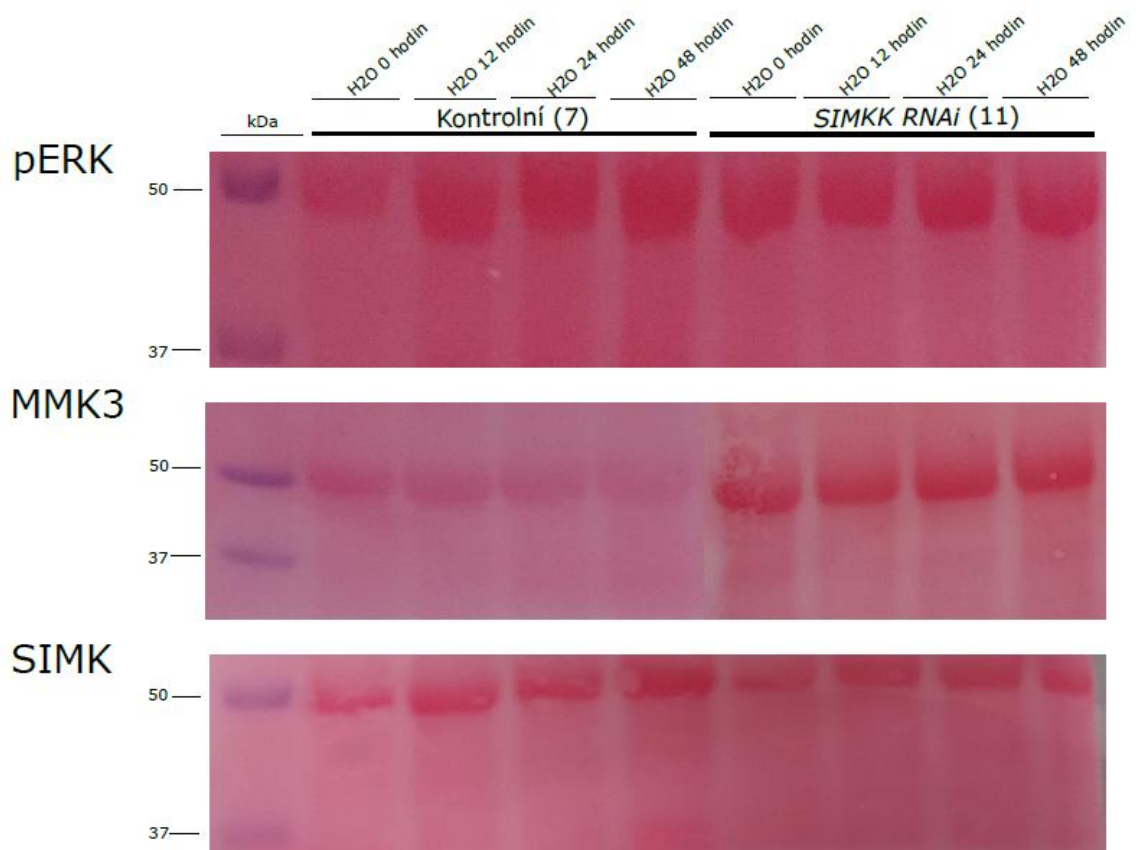
Obr. 23 Detekce fosforylovaných MAPK pomocí fosfospecifické protilátky, proteinů MMK3 a MPK6 ze vzorků z listů kontrolních (2) a *SIMKK RNAi* (5) rostlin *M. sativa* cv. **Regen SY** rostoucích v půdě v květináčích, které byly zalévány 200 μ M roztokem NaCl po dobu **48 hodin**. Na horním snímku jsou výsledky imunodetekce fosforylovaných MAPK pomocí anti-pTEpY protilátky (pERK). Membrány byly snímány po dobu jedné minuty. K nejvyšší expresi MMK3 u kontrolních rostlin docházelo od začátku experimentu po 12. hodinu, naproti tomu exprese SIMK byla zvýšená téměř vždy, s malým poklesem při 24 hodině. U transgenních rostlin byla zaznamenána nejvyšší míra fosforylace studovaných proteinů kolem 12. hodiny.



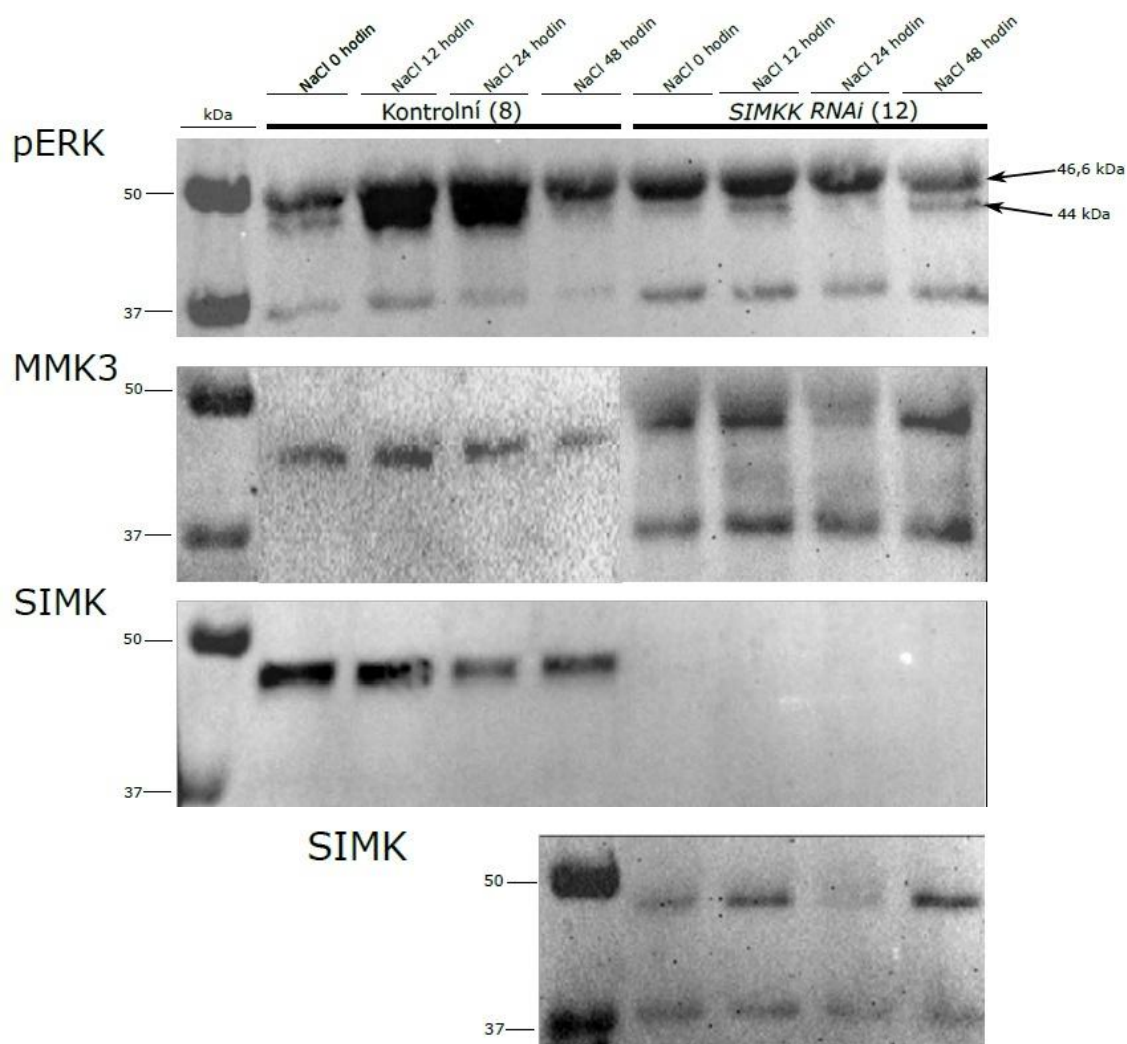
Obr. 24 PVDF membrány s proteiny obarvenými roztokem Ponceau S v 5% kyselině octové.



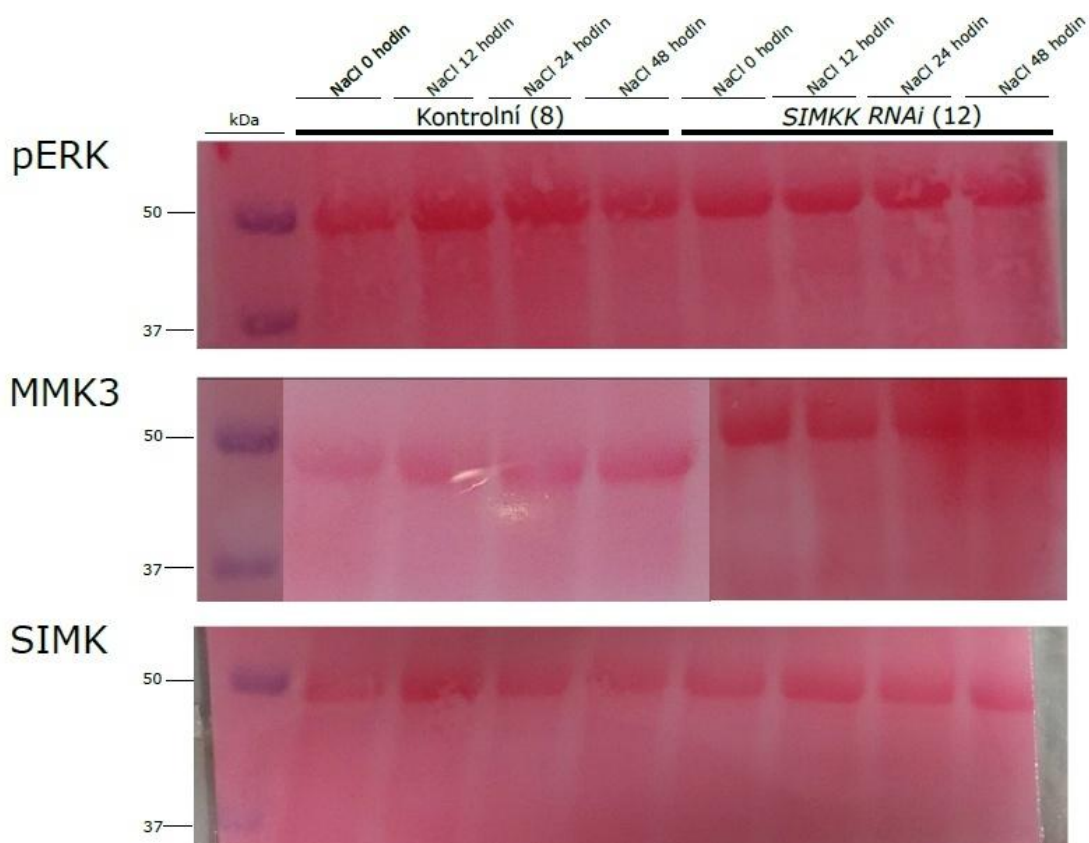
Obr. 25 Detekce fosforylovaných MAPK pomocí fosfospecifické protilátky, proteinů MMK3 a MPK6 ze vzorků z listů kontrolních (7) a *SIMKK RNAi* (11) rostlin *M. sativa* cv. Regen SY rostoucích v půdě v květináčích, které byly zalévány vodou po dobu 48 hodin. Na horním snímku jsou výsledky imunodetekce fosforylovaných MAPK pomocí anti-pTEpY protilátky (pERK). Membrány byly snímány po dobu jedné minuty. Spodní snímek je membrána, která byla snímána po dobu 20 minut a ukazuje detekci proteinu SIMK. K nejvyšší expresi obou proteinů u kontrolních rostlin docházelo kolem 12. hodiny, nejvyšší míra fosforylace proteinů byla zaznamenána v 48. hodině. U transgenních rostlin byla nejvyšší exprese obou proteinů zaznamenána mezi 0 a 12 hodinou.



Obr. 26 PVDF membrány s proteiny obarvenými roztokem Ponceau S v 5% kyselině octové.



Obr. 27 Detekce fosforylovaných MAPK pomocí fosfospecifické protilátky, proteinů MMK3 a MPK6 ze vzorků z listů kontrolních (8) a *SIMKK RNAi* (12) rostlin *M. sativa* cv. Regen SY rostoucích v půdě v květináčích, které byly zalévány 200 μ M roztokem NaCl po dobu 48 hodin. Na horním snímku jsou výsledky imunodetekce fosforylovaných MAPK pomocí anti-pTEpY protilátky (pERK). Membrány byly snímány po dobu jedné minuty. Spodní snímek je membrána, která byla snímána po dobu 20 minut a ukazuje detekci proteinu SIMK. K nejvyšší expresi obou proteinů u kontrolních rostlin docházelo kolem 12. hodiny, nejvyšší míra fosforylace proteinů byla zaznamenána mezi 12. a 24. hodinou. U transgenních rostlin byla nejvyšší exprese obou proteinů zaznamenána kolem 12 a 48. hodiny, k nejvyšší míře exprese proteinů docházelo kolem 12. hodiny.



Obr. 28 PVDF membrány s proteiny obarvenými roztokem Ponceau S v 5% kyselině octové.

5. DISKUZE

V této práci jsem sledoval vliv solného stresu na rostliny *Medicago sativa* rostoucí *ex vitro* s potlačenou expresí proteinu SIMKK pomocí RNA interference. V průběhu působení solného stresu nedocházelo u rostlin k viditelným fenotypovým změnám. Je třeba ovšem zdůraznit, že experiment to byl pouze krátkodobý, tudíž tento závěr není možné zobecnit. Po zdokumentování důsledků stresu měsíc po aplikaci solného roztoku, dvě rostliny *SIMKK RNAi* v důsledku solného stresu uhynuly, z čehož vyplývá, že potlačením signální dráhy, ve které hraje SIMKK nezbytnou roli v aktivaci SIMK, se můžou rostliny stát náchylnější a méně citlivá k vnějším podmínkám životního prostředí (Bekešová *et al.*, 2015). Dále byl při tomto experimentu sledován průběh procesu symbiocy se *Sinorhizobium meliloti* na *ex vitro* kontrolních a *SIMKK RNAi* rostlinách. Bakterie *Sinorhizobium meliloti* byly na rostliny aplikovány *in vitro* před jejich přesazením do půdy v květináčích, a tedy i před aplikováním solného stresu. Ovšem i tak na kořenech transgenních rostlin se nacházelo jen velmi málo hlízek, které rostlina při symbióze vytváří. Z důvodu dlouhodobého růstu rostlin v půdě v květináčích nebylo možné získat kvantitativní údaje o celkovém počtu hlízek u každé rostliny, ale i tak z těchto pozorování vyplývá, že SIMKK má důležitou úlohu při reakci rostliny na rhizobakterie v půdě, a je tedy pravděpodobně zapojena do interakcí rostliny s rhizobakteriemi při iniciaci a v průběhu symbiotického procesu. Jelikož je SIMKK součástí kaskády pro signalizaci abiotických stresových faktorů u *Medicago sativa*, snažil jsem se ověřit, jak bude ovlivněna vitalita těchto rostlin, které byly zároveň kokultivovány s rhizobakteriemi, v důsledku solného stresu.

V další části bakalářské práce bylo potvrzeno, že SIMKK slouží jako aktivátor pro SIMK v signální dráze při reakci rostlin *Medicago sativa* na stres vyvolaný zvýšenou koncentrací soli (Kiegerl *et al.*, 2000; Cardinale *et al.*, 2002). Pro potvrzení této situace při experimentu pro sledování hladiny proteinů u *ex vitro* kultivovaných rostlin, byl proveden experiment se solným stresem na rostlinách kultivovaných *in vitro*. K tomuto účelu byly použity rostliny *M. sativa* kultivaru Europe, kde byla kontrolována hladina exprese proteinu SIMK, její fosforylace (aktivace, Willmann *et al.*, 2014) a exprese

proteinu MMK3 po dobu 30 minut. Výsledky této části práce ukázaly, že k největšímu nárůstu množství proteinů SIMK a MMK3 docházelo mezi 10 a 20 minutou od počátku působení solného stresu. MsMMK3 vykazuje podobnost s AtMPK3, který je také aktivován solným stresem a jeho aktivace se jeví jako nezbytná pro toleranci rostlin *Arabidopsis thaliana* vůči soli (Ichimura *et al.*, 2000; Droillard *et al.*, 2002; Teige *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2010; Ovečka *et al.*, 2014). U *ex vitro* kultivovaných rostlin *M. sativa* docházelo k velmi proměnlivé fosforylaci proteinů v průběhu experimentu, a to jak u kontrolních, tak i transgenních rostlin, a projevovalo se v kontrolních, ale i ve stresových podmínkách. To mohlo být způsobeno genetickým podkladem experimentálních rostlin v důsledku somaklonální variability, protože rostliny byly množeny somatickou embryogenezí. Každá rostlina se tedy chová jako samostatná linie. Druhou možností je působení biotického stresu na tyto rostliny, protože v době aplikace solného stresu byly rostliny ve fytotronu napadány hmyzími škůdci, kteří způsobovali rostlinám stres z poranění. Z tohoto důvodu bude v budoucnosti vhodné a nutné optimalizovat a udržovat podmínky kultivace, které tyto sekundární vlivy omezí, nebo úplně odstraní. V ideálním případě by bylo dobré, při množení rostlin, vyhnout se procesu somatické embryogeneze, a použít k experimentům rostlinný materiál pocházející ze semen. K tomu bude nutné optimalizovat cílenou produkci semen transgenních rostlin tolerance vojtěšky, se striktní kontrolou procesu opylování, neboť semena vzniklá ze samoopylení jsou jen málo životaschopná (Graman, 1991; Chloupek, 2000). Následující studie by se zároveň mohla zabývat porovnáním rozdílů v expresi proteinu SIMKK u kontrolních a *SIMKK RNAi* transgenních rostlin, a to jak v podmínkách sterilních, tak i v podmínkách symbiózy s bakteriemi *S. meliloti*.

6. ZÁVĚR

V teoretické části této bakalářské práce byla vypracována literární rešerše, zaměřená na popis rostliny tolíce vojtěšky (*Medicago sativa*) a její využití v agrotechnologii. Další teoretická část práce byla zaměřena na negativní vliv stresu, způsobeného chloridem sodným na rostliny a popis MAP kinasových signálních drah a jejich úlohy při působení vnějšího abiotického stresu. Jelikož je *Medicago sativa* velmi užitečná rostlina, která vytváří symbiotické vztahy s půdními bakteriemi *Sinorhizobium meliloti*, byl v následující kapitole popsán mechanismus průběhu tohoto procesu. V poslední kapitole teoretického úvodu byla rozebrána metoda Western blotu, jako nástroje pro kvalitativní a semikvantitativní detekci proteinů.

V praktické části byl aplikován solný stres na rostliny kultivované *ex vitro* a *in vitro* a sledována míra rezistence mezi liniemi. Pro vyhodnocování míry rezistence vůči solnému stresu rostlin s potlačenou expresí SIMKK rostoucích *ex vitro* byla využita metoda stanovení obsahu a fosforylace vybraných MAPK pomocí imunoblottingu. Z výsledků vyplývá, že metoda potlačení exprese pomocí RNA interference je úspěšná. *SIMKK RNAi* linie měly sníženou expresi SIMK. Tyto rostliny tedy mohou být méně citlivé (či méně odolné) vůči vnějším abiotickým faktorům, jako je zvýšená koncentrace soli v půdě. Rostliny se sníženou expresí proteinu SIMK vykazovaly zvýšenou expresi proteinu MMK3, čímž si zřejmě kompenzují částečnou absenci SIMK. *SIMKK RNAi* rostliny měly také výrazně sníženou efektivitu procesu tvorby hlízek, což znamená, že signální dráha se SIMKK-SIMK může hrát velmi důležitou roli v procesu symbiózy mezi *Medicago sativa* a *Sinorhizobium meliloti*.

7. SEZNAM LITERATURY

- Aldridge G. M., Podrebarac D. M., Greenough W. T., Weiler I. J. (2008): The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *J Neurosci Methods* **172**, 250-254.
- Alegria-Schaffer A., Lodge A., Vatter K. (2009): Performing and optimizing Western blots with an emphasis on chemiluminescent detection. *Methods Enzymol* **463** (09), 573–599.
- Amor B. B., Shaw S. L., Oldroyd G. E., Maillet F., Penmetsa R. V., Cook D., Long S. R., Dénarié J., Gough C. (2003): The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J* **34**, 495 – 506.
- Antharavally B. S., Carter B., Bell P. A., Krishna Mallia A. (2004): A high-affinity reversible protein stain for Western blots. *Anal Biochem* **329** (2), 276–280.
- Aranjuelo I, Molero G, Erice G, Avice JC, Nogue's S (2011): Plant physiology and proteomics reveals the leaf response to drought in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* **62**(1), 111123
- Ardourel M., Demont N., Debelle F., Maillet F., de Billy F., Promé J. C., Dénarié J., Truchet G. (1994): *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant Cell* **6**, 1357 – 1374.
- Arrighi J. F., Barre A., Amor B., Bersoult A., Soriano L. C., Mirabella R., de Carvalho-Niebel F., Journet E., Ghérardi M., Huguet T., Geurts R., Dénarié J., Rougé P., Gough C. (2006): The *Medicago truncatula* lysine motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant Physiol* **142**, 265 – 279.
- Bardwell A. J., Flatauer L. J., Matsukuma K., Thorner J., Bardwell L. (2001): A conserved docking site in MEKs mediates high-affinity binding to MAP kinases and cooperates with a scaffold protein to enhance signal transmission. *J Biol Chem* **276**, 10374-86.
- Barker D. G., Bianchi S., Blondon F., Datteé Y., Duc G., Essad S., Flament P., Gallusci P., Génier G., Guy P., Muel X., Tourneur J., Dénarié J., Huguet T. (1990): *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter* **8**, 40-49.
- Bateman A., Bycroft M. (2000): The structure of LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). *J. Mol. Biol* **299**, 1113 – 1119
- Bass J. J., Wilkinson D. J., Rankin D., Phillips B. E., Szewczyk N. J., Smith K., Atherton P. J. (2017): An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **27**, 4–25.
- Bekešová S., Komis G., Křenek P., Vypřelová P., Ovečka M., Luptovčíak I., Šamaj J. (2015): Monitoring protein phosphorylation by acrylamide pendant Phos-Tag™ in various plants. *Frontiers in plant science* **6**, 336-336.
- Bekki A., Trinchant J. C., Rigaud J. (1987): Nitrogen fixation (C₂H₂ reduction) by *Medicago* nodules and bacteroids under sodium chloride stress. *Physiol Plant* **71**, 61–67.
- Bhardwaj, S. N. (1959): Physiological studies on salt-tolerance in crop plants. VI. Effect on NaCl and Na₂CO₃ on grain quality in wheat. *Proc. Nat. Acad. Sci. India Sect B* **29**, 169-173.
- Bio-Rad Laboratories (2011): Protein Blotting Guide, Interactive PDF. Review B, Bulletin 2895.
- Bjerrum Q. J., Schafer-Nielsen C. (1986): Buffer systems and transfer parameters for semidry electroblotting with a horizontal apparatus. In *Electrophoresis* **136**: Proceedings of the Fifth Meeting of the bite/national Electrophoresis Society. M. J. Dunn. ed., 315-327.

- Boivin C., Camut S., Malpica C. A., Truchet G., Rosenberg C. (1990): *Rhizobium meliloti* Genes Encoding Catabolism of Trigonelline Are Induced under Symbiotic Conditions. *Plant Cell* **2**, 1157–1170.
- Bouton J. H. (2012): Breeding lucerne for persistence. *Crop & Pasture Science* **63**, 95–106
- Brewin N. J. (1991): Development of legume root nodules. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**, 191–226.
- Bronstein I, Voyta J. C., Thorpe G. H., Kricka L. J., Armstrong G. (1989): Chemiluminescent assay of alkaline phosphatase applied in an ultrasensitive enzyme immunoassay of thyrotropin. *Clin Chem* **35** (7), 1441–1446.
- Burnette W. N. (1981): Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**, 195–203.
- Calderini O., Bovone T., Scotti C., Pupilli F., Piano E., Arcioni S. (2007): Delay of leaf senescence in *Medicago sativa* transformed with the *ipt* gene controlled by the senescence-specific promoter SAG12. *Plant Cell Rep* **26**, 611–615.
- Cardinale F., Meskiene I., Ouaked F., Hirt H. (2002): Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *Plant. Cell.* **14**,703–711.
- Carthew R. W., Sontheimer E. J. (2009): Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**:642-655.
- Catoira R., Galera C., de Billy F., Penmetsa R. V., Journet E. P., Maillet F., Rosenberg C., Cook D., Gough C., Denarie J. (2000): Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant. Cell.* **12**, 1647 — 1666.
- Cleland W. W. (1964): Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry* **3** (4), 480–482.
- Colella A. D., Chegenii N., Teaa M. N., Gibbins I. L., Williams K. A., Chataway T. Ch. (2012): Comparison of Stain-free gels with traditional immunoblot loading control methodology. *Anal Biochem* **430**, 108-110.
- Colcombet J., Hirt H. (2008): *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal* **413**, 217–26.
- Crossland H., Kazi A. A., Lang C. H., Timmons J. A., Pierre P., Wilkinson D. J., Smith K., Szewczyk N. J., Atherton P. J. (2013): Focal adhesion kinase is required for IGF-I-mediated growth of skeletal muscle cells via a TSC2/mTOR/S6K1-associated pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **305** (2), E183-E193.
- Day D. A., Poole P. S., Tyerman S. D., Rosendahl L. (2001): Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cell Mol Life Sci* **58**, 61–71.
- De Cecco L., Musella V., Veneroni S., Cappelletti V., Bongarzone I., Callari M., Valeri B., Pierotti M. A., Daidone M. G. (2009): Impact of biospecimens handling on biomarker research in breast cancer. *BMC Cancer* **9**, 409.
- Dénarié J., Debelle F., Promé J. C. (1996): *Rhizobium* lipochitoooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 503–535.
- Droillard M., Boudsocq M., Barbier-Brygoo H., Laurière C. (2002): Different protein kinase families are activated by osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* cell suspensions. Involvement of the MAP kinases AtMPK3 and AtMPK6. *FEBS Lett* **527**, 43-50.
- Droillard M., Boudsocq M., Barbier-Brygoo H., Lauriere C. (2004): Involvement of MPK4 in osmotic stress response pathways in cell suspensions and plantlets of *A. thaliana*: activation by hypoosmolarity and negative role in hyperosmolarity tolerance. *FEBS Lett* **574**, 42-8.
- Ehlig, C. F., and Bernstein, L. (1958): Salt tolerance of strawberries. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **72**, 198-206.

- Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kalo, P., Kiss, G. B. (2002): A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* **417**, 962–966.
- Farnham G., Strittmater M., Coelho S. M., Cock J. M., Brownlee C. (2013): Gene silencing in *Fucus* embryos: developmental consequences of RNAi-mediated cytoskeletal disruption. *J. Phycol.* **49**, 819–829.
- Felle H. H., Kondorosi E., Kondorosi A., Schultze M. (1999): Elevation of the cytosolic free Ca^{2+} is indispensable for the transduction of the nod factor signal in alfalfa. *Plant Physiology* **121**, 273–279.
- Fernandez-Pascual M., Lucas M. M., de Felipe M. R., Boscá L., Hirt H., Golvano, M. P. (2006): Involvement of mitogen-activated protein kinases in the symbiosis *Bradyrhizobium-Lupinus*. *J. Exp. Bot.* **57**, 2735–2742.
- Foucher F., Kondorosi E. (2000): Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Mol Biol* **43**, 773–786.
- Franchi M. V., Atherton P. J., Reeves N. D., Flück M., Williams J., Mitchell W. K., Selby A., Beltran Valls R. M., Narici M. V. (2014): Architectural, functional and molecular responses to concentric and eccentric loading in human skeletal muscle. *Acta Physiol* **210**(3), 642–654.
- Fulkerson R. S. (1981): Alfalfa. Ministry of Agriculture and Food. Department of Crop Science, Ontario Agricultural College, University of Guelph, 20s.
- Gordon J. (1982): Use of vanadate as proteinphosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods Enzymol* **201**, 477–482.
- Graman J. (1991): Šlechtění zemědělských plodin (šlechtění píce). Vysoká škola zemědělská, Praha. ISBN 80-213-0089-2, 84 stran.
- Grabski A. C. (2009): Advances in preparation of biological extracts for protein purification. *Methods Enzymol* **463**(09), 285–303.
- Gürtler A., Kunz N., Gomolka M., Hornhardt S., Friedl A. A., McDonald K., Kohn J. E., Posch A. (2013): Stain-free technology as a normalization tool in western blot analysis. *Anal Biochem* **433**, 105-111.
- Hagiwara M., Kobayashi K., Tadokoro T., Yamamoto Y. (2010): Application c4 SYPRO Ruby- and Flamingo-stained polyacrylamide gels to western blot analysis. *Anal Biochem* **397**, 262-264.
- Hásek K., Deyl M. *Naše květiny*. 3. Vydání. Academia: Praha, 2001. ISBN 80-200-0940-X, 716 stran.
- Hlávková P. (2011): *Porovnání suchovzdornosti a mrazuvzdornosti vybraných odrůd vojtěšky seté (Medicago sativa L.) z tuzemského a zahraničního šlechtění*. Diplomová práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Česká Republika.
- Hood, E. E., Howard, J. A. (2002): *Plants as factories for protein production*. Kluwer Academic Publishers, ISBN 1-4020-0843-0, 209 stran.
- Hrabě, F. a kol. (2004): *Trávy a jetelovino trávy v zemědělské praxi*. Nakladatelství Ing. Petr Baštan, Olomouc, ISBN 80-903275-1-6, 121s.
- Chang L, Karin M. (2001): Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* **410**, 37-40.
- Cheers G. *Botanika: Ilustrovaný abecední atlas 10 000 rostlin z celého světa s návodem, jak je pěstovat*. 1. Vydání: Slovart: Praha, 2007. ISBN 978-80-7209-936-8, 1020 stran.
- Chloupek, O. (2000): *Genetická diverzita, šlechtění a semenářství*. Academia, Praha, ISBN-80-200-0779-2, 311 stran.
- Choi H-K., Kim D., Uhm T., Limpens E., Lim H., Mun J-H., Kalo P., Penmetsa R. V., Seres A., Kulikova O., Roe B. A., Bisseling T., Kiss G. B., Cook D. R. (2004): A sequence based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M. sativa*. *Genetics* **166**, 1463–502.
- Ichimura K., Mizoguchi T., Irie K., Morris P., Giraudat J., Matsumoto K., Shinozaki K. (1998): Isolation of ATMEKK1 (a MAP Kinase kinase kinase)-interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun* **253**, 532-43.

- Ichimura K, Mizoguchi T, Yoshida R, Yuasa T, Shinozaki K. (2000): Various abiotic stresses apidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant J* **24**, 655-65.
- Ishihama N, Yoshioka H. (2012): Post-translational regulation of WRKY transcription factors in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* **15**, 431–7.
- Is.muni.cz:
https://is.muni.cz/el/1431/jaro2015/Bi7240/um/2015_Symbioticka_fixace_dusiku_Text.pdf
 (2. 5. 2018)
- Ivanov, S., Fedorova, E., and Bisseling, T. (2010): Intracellular plant microbe associations: secretory pathways and the formation of perimicrobial compartments. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**, 372–377.
- Jensen E. C. (2012): The basics of western blotting. *Anat Rec* **295**(3), 369–371.
- Jin H., Sun Y., Yang Q., Chao Y., Kang J., Jin H., Li Y., Gruber M. (2010): Screening of genes induced by salt stress from Alfalfa. *Mol Biol Rep* **37**, 745-753
- Jonak C., Okrész L., Bögre L., Hirt H. (2002): Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 415-24.
- Jones K. M., Kobayashi H., Davies B. W., Taga M. E., Walker, G. C. (2007): How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 619-633
- Kang Y, Han Y, Torres-Jerez I, Wang M, Tang Y, Monteros M, Udvardi M (2011): System responses to long-term drought and re-watering of two contrasting alfalfa varieties. *Plant Journal* **68**, 871889
- Kiegerl S., Cardinale F., Siligan Ch., Gross A., Baudouin E., Liwosz A., Eklof S., Till S., Bogre L., Hirt H., Meskiene I. (2000): SIMKK, a mitogen – activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress- induced MAPK, SIMK. *The Plant Cell* **12**, 2247-2258.
- Kim C. M. (1958): Effect og saline and alkaline salts on the growth and internal components of selected vegetable plants. *Physiol. Plant.* **11**, 441-450.
- Kim S. H., Woo D. H., Kim J. M., Lee S. Y., Chung W. S., Moon Y. H. (2011): *Arabidopsis* MKK4 mediates osmotic-stress response via its regulation of MPK3 activity. *Biochem Biophys Res Commun* **412**, 150–4.
- Klesnil A. (1978): *Pícninářství* (Díl I.). Vysoká škola zemědělská, Praha. 278 s.
- Kouchi H., Imaizumi-Anraku H., Hayashi M., Hakoyama T., Nakagawa T., Umehara Y., Suganuma N., Kawaguchi M. (2010): How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground. *Plant. Cell. Physiol.* **51**, 1381–1397.
- Kovalčíková Z. (2017): *Podíl mitogen-aktivovaných proteinkináz (MAPK) na signalizaci biotických interakcí u vojtěšky*. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká Republika.
- Kovalskaia E. M. (1958): Change in salt resistance of plants during ontogenesis. *Fiziol. Rast.* **5**, 437-446.
- Kricka L. J. (1991): Chemiluminescent and bioluminescent techniques. *Clin Chem* **37**(9), 1472–1481.
- Kubát K. (2002): *Klíč ke květeně České Republiky*. 1. Vydání: Academia: Praha. ISBN 80-200-0836-5, 927 stran.
- Kurien B. T., Scofield R. H. (2003): Protein blotting: a review. *J Immunol Methods* **274**, 1-15.
- Kurien B. T., Scofield, R. H. (2006): Western blotting. *Methods* **38**(4), 283–293.
- Kyhse-Andersen J. (1984): Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**, 203-209.
- Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.

- Lanoix D, St-Pierre J., Lacasse A. A., Viau M., Lafond J., Vaillancourt C. (2012): Stability of reference proteins in human placenta: General protein stains we the benchmark. *Placenta* **33**, 151-156.
- Levitt J. (1980): *Responses of plants to environmental stresses*. Volume II, Water, radiation, salt, and other stresses. New York, N.Y.: Academic Press. Physiological ecology: a series of monographs, texts, and treatises. ISBN 0-12-445502-6, 697 stran.
- Lichner S. a kol. (1983): *Krmovinárstvo*. Príroda, Bratislava. 550 s.
- Limpens E., Franken C., Smit P., Willemse J., Bisseling T., Geurts R. (2003): LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* **302**, 630 – 633.
- Lin J. C., Choi E. I., Pagano J. S. (1985): Qualitative and quantitative analyses of Epstein-Barr virus early antigen diffuse component by western blotting enzyme-linked immunosorbent assay with a monoclonal antibody. *Journal of Virology* **53**, 793.
- Lipman N. S., Jackson L. R., Trudel L. J., Weis-Garcia F. (2005): Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J* **46**(3), 258–268.
- Madsen E. B., Madsen L. H., Radutoiu S., Olbryt M., Rakwalska M., Szczyglowski K., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., Stougaard J. (2003): A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* **425**, 637 — 640
- Mahajan S, Tuteja N. (2005): Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch Biochem Biophys* **444**, 139–58.
- Mahmood T, Yang P-C. (2012): Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci* **4**(9), 429–434.
- Maianu A., Aksenova I., Albescu I. (1965): Tolerance to salinity of the main chloride plants on meadow soils with chloride salinization. *An. Inst. Cent. Cercet. Agr. Sect. Pedol.* **33**, 357-373.
- Mergaert P, Uchiumi T., Alunni B., Evanno G., Cheron A., Catrice O., Mausset A. E., Barloy-Hubler F., Galibert F., Kondorosi A., Kondorosi E. (2006): Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the Rhizobium- legume symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 5230–5235.
- Marré E., Servettaz O. (1959): On the mechanism of adaptation to extreme osmotic conditions in *Dunaliella salina*. II. Composition of the cell at different salt concentrations in the medium. *Rend. Accad. Naz. Lincei* **26** (Ser. 8), 272-278.
- Mikołajczyk M, Awotunde O. S., Muszynska G., Klessig D. F., Dobrowolska G. (2000): Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *Plant Cell* **12**, 165-78.
- Mishra N. S., Tuteja R., Tuteja N. (2006): Signaling through MAP kinase networks in plants. *Arch Biochem Biophys* **452**, 55-68.
- Mizoguchi, T. Irie K., Hirayama T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Matsumoto K., Shinozaki K. (1996): A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 765–769.
- Munnik T., Ligterink W., Meskiene I. I., Calderini O., Beyerly J., Musgrave A., Hirt H. (1999): Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signaling moderate and severe hyper-osmotic stress. *Plant J* **20**, 381-8.
- Munns R., Tester M. (2008): Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 651–81.
- Nairn A. C., Detre J. A., Casnellie J. E., Greengard P. (1982): Serum antibodies that distinguish between the phosphoand dephospho-forms of a phosphoprotein. *Nature* **299** (5885), 734–736.

- O'Leary J. W. (1970): The influence of ground water salinization on plant growth. *Arid Lands Res. Newsletter* **34**, 4-7.
- Ornstein L. (1964): Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann N Y Acad Sci* **121**(2): 321–349.
- Ott T., van Dongen J. T., Günther C., Krusell L., Desbrosses G., Vigeolas H., Bock V., Czechowski T., Geigenberger P., Udvardi M. K. (2005): Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr Biol* **15**:531–535.
- Ovečka M., Takáč T., Komis G., Vadovič P., Bekešová S., Doskočilová A., Šamajová V., Luptovčíak I., Šamajová O., Schweighofer A., Meskiene I., Jonak C., Křenek P., Lichtscheidl I., Škultéty L., Hirt H., Šamaj J. (2014): Salt-induced subcellular kinase relocation and seedling susceptibility caused by overexpression of *Medicago* SIMKK in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **65**(9), 2335-50.
- Paul P. K., Bhatnagar S., Mishra V., Srivastava S., Darnay B. G., Choi Y., Kumar A. (2012): The E3 ubiquitin ligase TRAF6 intercedes in starvation-induced skeletal muscle atrophy through multiple mechanisms. *Mol Cell Biol* **32**(7), 1248–1259.
- Pelikán J. (2012): *Atlas semen druhů čeledi bobovité (Fabaceae LINDL.)*. 1. Vydání. Petr Baštan: Olomouc. ISBN 978-80-905080-3-3, 190 stran.
- Péré-Brissaud A., Blanchet X., Delourme D., Pelissier P., Forestier L., Delavaud A., Duprat N., Picard B., Maftah A., Bremaud L. (2015): Expression of SERPINA3s in cattle: focus on bovSERPINA3-7 reveals specific involvement in skeletal muscle. *Open Biol* **5**(9), 150071.
- Perret X., Staehelin C., Broughton W. J. (2000): Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 180–201.
- Persak H., Pitzschke A. (2013): Tight interconnection and multi-level control of *Arabidopsis* MYB44 in MAPK cascade signalling. *PLoS One* **8**, e57547.
- Prell J., Poole P. (2006): Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol* **14**, 161–168.
- Radutoiu S., Madsen L. H., Madsen E. B., Felle H. H., Umehara Y., Gronlund M., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Sandal N., Stougaard J. (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* **425**, 585–592.
- Randuška D., Šomšák L., Háberová I. (1986): *Barevný atlas rostlin*. 3. Vydání (2. čes. opr. vyd.). Obzor: Bratislava. ISBN 65-010-86, 640 stran.
- Raymond S., Weintraub L. (1959): Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science* **130**(3377), 711.
- Regal V., Krajčovič V. (1963): *Pícninářství*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha. 466 s.
- Rodriguez M. C., Petersen M., Mundy J. (2010): Mitogenactivated protein kinase signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* **61**, 621-49.
- Romero-Calvo I., Ocón B., Martínez-Moya P., Suárez M. D., Zarzuelo A., Martínez-Augustin O., de Medina F. S. (2010): Reversible ponceau staining as a loading control alternative to actin in western blots. *Anal Biochem* **401**, 318-320.
- Rose, R. J. (2008): *Medicago truncatula* as a model for understanding plant interactions with other organisms, plant development and stress biology: past, present and future. *Funct. Plant Biol* **35**, 253–264
- Roudier F., Fedorova E., Györgyey J., Feher A., Brown S., Kondorosi A., Kondorosi E. (2000): Cell cycle function of a *Medicago sativa* A2-type cyclin interacting with a PSTAIRE-type cyclin-dependent kinase and a retinoblastoma protein. *Plant J* **23**, 73–83.
- Římovský K. (1989): *Pícninářství-Polní pícniny*. Vysoká škola zemědělská, Brno, ISBN 80-7157-038-9, 165 s.
- Samac D. A., Austin-Phillips S. (2006): *Medicago Sativa* Embryogenesis Protocol Ii :Alfalfa (*Medicago sativa* L.) In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 343: Agrobacterium Protocols, 2/e, volume 1, 301-311.

- Samac D. A., Tesfaye M., Dornbusch M., Saruul P., Temple S. J. (2004): A comparison of constitutive promoters for expression of transgenes in alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic Research* **13**, 349-361
- Scopes R. K. (1994): Protein purification. New York, NY: Springer New York.
- Sharma S. K., Carew T. J. (2002): Inclusion of phosphatase inhibitors during Western blotting enhances signal detection with phospho-specific antibodies. *Anal Biochem* **307**(1), 187–189.
- Schauer T. (2007): *Svět rostlin: 1150 květin, trav, travin, stromů a keřů střední Evropy*. 1. Vydání. Rebo: Čestlice, 2007. ISBN 978-80-7234-711-7, 496 stran.
- Simpson, R. J. (2010) "Homogenization of mammalian tissue," Cold Spring Harbor Protocols.
- Sinha A. K., Jaggi M., Raghuram B., Tuteja N. (2011): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 196-203.
- Smékalová V., Doskočilová A., Komis G., Šamaj J. (2014): Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology advances* **32**, 2-11.
- Smit P., Limpens E., Geurts R., Fedorova E., Dolgikh E., Gough C., Bisseling T. (2007): *Medicago* LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling. *Plant Physiol.* **145**, 183 – 191.
- Strogonov B. P. (1964): Physiological Basis of Salt Tolerance of Plants. *Acad. Sci. USSR.*, Davey and Co. New York.
- Strogonov B. P., Lapina L. P. (1964): A possible method for the separate study of toxic and osmotic action of salts on plants. *Fiziol. Rast.* **11**, 674-680.
- Structural Genomics Consortium, China Structural Genomics Consortium, Northeast Structural Genomics Consortium Gräslund S., Nordlund P., Weigelt J., Hallberg B. M., Bray J., Gileadi O., Knapp S., Oppermann U., Arrowsmith C., Hui R., Ming J., dhe-Paganon S, Park H. W., Savchenko A., Yee A., Edwards A., Vincentelli R., Cambillau C., Kim R., Kim S. H., Rao Z., Shi Y., Terwilliger T. C., Kim C. Y., Hung L. W., Waldo G. S., Peleg Y., Albeck S., Unger T., Dym O., Prilusky J., Sussman J. L., Stevens R. C., Lesley S. A., Wilson I. A., Joachimiak A., Collart F., Dementieva I., Donnelly M. I., Eschenfeldt W. H., Kim Y., Stols L., Wu R., Zhou M., Burley S. K., Emtage J. S., Sauder J. M., Thompson D., Bain K., Luz J., Gheyi T., Zhang F., Atwell S., Almo S. C., Bonanno J. B., Fiser A., Swaminathan S., Studier F. W., Chance M. R., Sali A., Acton T. B., Xiao R., Zhao L., Ma L. C., Hunt J. F., Tong L., Cunningham K., Inouye M., Anderson S., Janjua H., Shastry R., Ho C. K., Wang D., Wang H., Jiang M., Montelione G. T., Stuart D. I., Owens R. J., Daenke S., Schütz A., Heinemann U., Yokoyama S., Büssow K., Gunsalus K. C. (2008): Protein production and purification. *Nature Methods*, vol. 5, no. 2, pp. 135–146.
- Su S. H., Suarez-Rodriguez M. C., Krysan P. (2007): Genetic interaction and phenotypic analysis of the *Arabidopsis* MAP kinase pathway mutations mekk1 and mpk4 suggests signaling pathway complexity. *FEBS Lett* **581**, 3171–7.
- Suliaman S., Schulze J. (2010): The efficiency of nitrogen fixation of the model legume *Medicago truncatula* (Jemalong A17) is low compared to *Medicago sativa*. *Journal of Plant Physiology* **167**, 683–692.
- Svoboda P., Stein P., Hayashi H., Schultz R. M. 2002: Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA Interference. *Development* **127**:4147- 4156.
- Šamaj J., Ovecka M., Hlavacka A., Lecourieux F., Meskiene I., Lichtscheidl I., Lenart P., Salaj J., Volkmann D., Bögre L., Baluska F., Hirt H. (2002): Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *EMBO J* **21**, 3296–306.
- Šamajová O., Plíhal O., Al-Yousif M., Hirt H., Samaj J. (2013): Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. *Biotechnology Advances* **31**, 118-128.
- Šantrůček J. a kol. (2001): *Základy pěstování*. Česká zemědělská univerzita, Praha, ISBN 80-213-0764-1, 146 s.

- Šantrůček, J. a kol. (2007): *Encyklopedie pícninářství*. Česká zemědělská univerzita, Praha, ISBN 978-80-213-1650-8, 157 s
- Štráfelda J. (1962): *Příspěvek k poznání vlastností tvrdých semen jetelovin a ovlivnění jejich podílu v osivu*. Kandidátská dis. práce, Praha. 70 s.
- Švecová M. (2007): Uplatnění hrachoru lučního v různých typech travních porostů, dipl. práce, České Budějovice
- Takekawa M., Tatebayashi K., Saito H. (2005): Conserved docking site is essential for activation of mammalian MAP kinase kinases by specific MAP kinase kinase kinases. *Mol Cell* **18**, 295-306.
- Taylor S. C., Berkelman T., Yadav G., Hammond M. (2013): A defined methodology for reliable quantification of Western blot data. *Mol Biotechnol* **55**(3), 217–226.
- Teige M., Scheikl E., Eulgem T., Dóczi R., Ichimura K., Shinozaki K., Dangel J. L., Hirt H. (2004): The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Mol Cell* **15**, 141-52.
- Tena G., Asai T., Chiu W. L., Sheen J. (2001): Plant mitogenactivated protein kinase signaling cascades. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 392-400.
- Timmers A. C., Auriac M. C., Truchet G. (1999): Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* **126**, 3617–3628.
- Tovey E. R., Baldo B. A. (1987): Comparison of semi-dry and conventional tank-buffer electrotransfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose membranes. *Electrophoresis* **8**, 384-387.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 76, no. 9, pp. 4350–4354.
- Ulm R., Ichimura K., Mizoguchi T., Peck S. C., Zhu T., Wang X., Shinozaki K., Paszkowski J. (2002): Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1. *EMBO J* **21**, 6483-93.
- Van Spronsen P. C., Bakhuzian R., Van Brusel A. A. N., Kijne J. W. (1994): Cell wall degradation during infection thread formation by the root nodule bacterium *Rhizobium leguminosarum* is a two step process. *Eur. J. Cell. Biol.* **64**, 88 — 94
- Velich J. a kol. (1991): *Pícninářství*. Vysoká škola zemědělská, Praha, ISBN 80-213-0106-6, 204 s.
- Voelkel T., Andresen C., Unger A., Just S., Rottbauer W., Linke W. A. (2013): Lysine methyltransferase Smyd2 regulates Hsp90-mediated protection of the sarcomeric titin springs and cardiac function. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1833**(4): 812–822.
- Voinnet O. 2009: Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* **136**:669-687.
- Wais R. J., Wells D. H., Long S. R. (2002): Analysis of differences between *Sinorhizobium meliloti* 1021 and 2011 strains using the host calcium spiking response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**, 1245–1252.
- Walker J. M. (1994): Gradient SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. *Methods Mol Biol* **32**, 35–38.
- Wang Z., Su G., Li M., Ke Q., Kim S. Y., Li H., Huang J., Xu B., Deng X. P., Kwak S. S. (2016): Overexpressing *Arabidopsis* ABF3 increases tolerance to multiple abiotic stresses and reduces leaf size in alfalfa. *Plant Physiology and Biochemistry* **109**, 199-208
- Wang C., Yu H., Luo L., Duan L., Cai L., He X., Wen J., Mysore K. S., Li G., Xiao A. (2016): Nodules with activated defense1 is required for maintenance of rhizobial endosymbiosis in *Medicago truncatula*. *New Phytologist* **212**, 176–191.

- Welinder C., Ekblad L. (2012): Coomassie staining as loading control in western blot analysis. *J Proteome Res* **10**, 1416-1419.
- Whitmarsh A. J., Davis R. J. (1998): Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem Sci* **23**, 481-5.
- Willmann R., Haischer D. J., Gust A. A. (2014): Analysis of MAPK activities using MAPK - specific antibodies. *Methods Mol. Biol.* **1171**, 27-37.
- Yadav S., Irfan M., Ahmad A., Hayat S. (2011): Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: a review. *J Environ Biol* **32**, 667-85.
- Yang Q. C., Sun Y., Kang J. M. (2005): Research on the advancement of salt tolerant genes in alfalfa. *Acta Agrestia Sin* **13**(3), 253-256.
- Yu L., Nie J., Cao C, Jin Y., Yan M., Wang F., Liu J., Xiao Y., Liang Y., Zhang W. (2010): Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **188**, 762-73.

8. SEZNAM ZKRATEK

AP	alkalická fosfatasa
APS	persíran amonný
BSA	hovězí sérový albumin
CCaMK	z angl. Calcium and calcium/calmodulin-dependent protein kinase
CTR 1	MAP3 kináza (z angl. Constitutive triple response)
CycA2	cyklin A2
dH₂O	destilovaná voda
dsRNA	dvouřetězcová RNA (z angl. double-stranded RNA)
DTT	dithiotreitol
ECL	chemiluminiscenční substrát
EGTA	kyselina ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)tetraoctová
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperaziny] ethansulfonová kyselina
HKT	z angl. high-affinity potassium transporter
HRP	křenová peroxidáza (z angl. Horseradish peroxidase)
HTS	hmotnost tisíce semen
IgG	imunoglobulin třídy G
LRR	z angl. leucine rich repeats
LYK3	z angl. lysin motif receptor-like kinase 3
LysM doména	doména (z angl. lysine motif)
<i>M. sativa</i>	<i>Medicago sativa</i> L ssp.
MAP2K	MAP kinasa kinasa
MAP3K	MAP kinasa kinasa kinasa
MAPK	mitogenem-aktivované protein kinasa
MAPKK	MAP kinasa kinasa
MAPKKK	MAP kinasa kinasa kinasa
MEKK	mitogenem-aktivovaná protein kinasa kinasa kinasa
miRNA	micro RNA

MKK	mitogenem-aktivovaná protein kinasa kinasa
MKP	MAPK fosfatasa
MMK3	MAPK z <i>Medicago sativa</i>
MPK	mitogen-aktivovaná protein kinasa
mRFP	červený fluorescenční protein
mRNA	mediátorová RNA
MS-médium	Murashige and Skoog médium
MsSIMK	stresem indukovaná mitogenem aktivovaná protein kinasa v <i>Medicago sativa</i>
MsSIMKK	stresem indukovaná mitogenem aktivovaná protein kinasa kinasa v <i>Medicago sativa</i>
NFP	z angl. nod factor perception
NHX1	antiportér
Obr.	obrázek
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových kationů
PM	cytoplasmatická membrána
PVDC	Polyvinylidenchlorid
PVDF	polyvinylidendifluorid
RB	elektrodový pufr (z angl. running buffer)
RLK	z angl. receptor like kinase
RNA	ribolunkleová kyselina
RNAi	RNA interference
SDS	dodecylsulfát sodný
SIMK	stresem indukovaná mitogenem aktivovaná protein kinasa
SIMKK	stresem indukovaná mitogenem aktivovaná protein kinasa kinasa
siRNA	malá interferující RNA (z angl. small interfering RNA)
SOS1 antiportér	z angl. Salt Overly Sensitive 1
SYMRK	z angl. symbiosis receptor like kinase

TBS	Tris-HCl solný pufr
TBS-T	Tris-HCl solný pufr s přídavkem Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin