

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



Vliv snížené exprese mitogenem-aktivovaných protein kináz na cytoskelet vojtěšky (*Medicago sativa* L.)

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: **Bc. Valerie Kotulanová**

Studijní program: N0512A130007 Biotechnologie a genové
inženýrství

Specializace: Biotechnologie a genové inženýrství

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: **prof. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.**

Rok: 2023

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena 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

„Ráda bych poděkovala především vedoucímu své diplomové práce prof. Miroslavu Ovečkovi, Ph.D., za věnovaný čas, podporu, cenné rady, konzultace a celkovou pomoc při psaní této práce. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu katedry biotechnologií, zejména pak Mgr. Kateřině Hlaváčkové, za pomoc a rady při práci v laboratoři. V neposlední řadě bych ráda poděkovala i vedoucímu katedry prof. RNDr. Jozefu Šamajovi, DrSc., za umožnění práce a využívání vybavení v laboratoři. Práce byla podpořena granty IGA (projekty č. IGA_PrF_2022_014 a IGA_PrF_2023_015) ze Studentské grantové soutěže na Univerzitě Palackého v Olomouci.“

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Valerie Kotulanová
Název práce	Vliv snížené exprese mitogenem-aktivovaných protein kináz na cytoskelet vojtěšky (<i>Medicago sativa</i> L.)
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biotechnologií
Vedoucí práce	prof. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023

Abstrakt

Jedním z nejčastěji studovaných mechanismů signalizace u rostlin je kaskáda mitogenem-aktivovaných protein kináz (MAPK), přenášející signály prostřednictvím fosforylace a defosforylace proteinů. MAPK aktivují a regulují velké množství rozličných jaderných, cytosolických či cytoskeletálních substrátů a jsou zapojeny do vývojových a obranných reakcí. Mezi nejvýznamnější MAPK u *Medicago sativa* se řadí SIMK neboli stresem indukovaná MAPK, k jejíž aktivaci dochází přenosem signálu z nadřazené SIMKK. Cílem této diplomové práce byla produkce transgenních rostlin *M. sativa* se sníženou expesí *SIMKK* (*SIMKK-RNAi*) v expresní linii GFP-FABD2 k vizualizaci aktinového cytoskeletu a v expresní linii tagRFP-TUA6 k vizualizaci mikrotubulového cytoskeletu. Transformace byla provedena prostřednictvím bakterií *Agrobacterium tumefaciens* a celý proces včetně následné regenerace stabilních dvojítych transgenních linií byl zdokumentován. U dvojítych transgenních linií *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6} a *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} byla provedena imunoblotová analýza pro kvalitativní a semikvantitativní determinaci změn v úrovni produkce proteinu SIMK a mikroskopická analýza pro dokumentaci struktury, organizace a dynamiky mikrotubulového a aktinového cytoskeletu. Výsledky práce naznačují, že přítomnost SIMK a úroveň její exprese mohou mít regulační vliv na organizaci cytoskeletu v buňkách *M. sativa*.

Klíčová slova	<i>Medicago sativa</i> , MAPK, SIMKK, SIMK, cytoskelet, aktin, mikrotubuly, GFP-FABD2, tagRFP-TUA6
Počet stran	78
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Valerie Kotulanová
Title	The reaction of cytoskeleton to downregulation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.)
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biotechnology
Supervisor	Prof. Mgr. M. Ovečka, Ph.D.
The year of presentation	2023

Abstract

One of the most studied signaling mechanisms in plants is the cascade of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), transmitting signals through protein phosphorylation and dephosphorylation. MAPKs activate and regulate many different nuclear, cytosolic, or cytoskeletal substrates and are involved in developmental and defense reactions. Among the most important MAPKs in *Medicago sativa* is SIMK or stress-induced MAPK, which is activated by signal transmission from the upstream SIMKK. The aim of this thesis was the production of transgenic *M. sativa* plants with reduced expression of *SIMKK* (*SIMKK-RNAi*) in the GFP-FABD2 expression line to visualize the actin cytoskeleton and in the tagRFP-TUA6 expression line to visualize the microtubules. Transformation was done through *Agrobacterium tumefaciens* and the whole process including the subsequent regeneration of stable double transgenic lines was documented. In the double transgenic lines *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6} and *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}, immunoblot analysis was performed for qualitative and semiquantitative determination of changes in the level of SIMK protein production, and microscopic analysis was performed for documentation of structure, organization and dynamics of the microtubule and actin cytoskeleton. The results indicate that the presence and expression level of SIMK may have an important regulatory impact to cytoskeleton organization in cells of *M. sativa*.

Keywords	<i>Medicago sativa</i> , MAPK, SIMKK, SIMK, cytoskeleton, actin, microtubules, GFP-FABD2, tagRFP-TUA6
Number of pages	78
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1. Tolice vojtěška (<i>Medicago sativa</i> L.)	2
2.1.1 Charakteristika	2
2.1.2. Genom.....	2
2.2 Signalizace u rostlin.....	2
2.2.1 Mitogenem – aktivované protein kinázy (MAPK).....	3
2.2.1.1. Klasifikace MAPKs	4
2.2.2 Aktivace signálních drah MAPK ve vývojových procesech rostlin	5
2.2.2.1 Regulace buněčného dělení prostřednictvím MAPK	5
2.2.2.2 Regulace vývoje gametofytu a embryogeneze prostřednictvím MAPK	6
2.2.2.3 Regulace vegetativního růstu prostřednictvím MAPK	6
2.2.3 Aktivace signálních drah MAPK při odpovědi na biotické stresové faktory rostlin... 7	7
2.2.3.1 Vrozený imunitní systém rostlin	7
2.2.3.2 Regulace obrany prostřednictvím MAPK.....	8
2.2.4 Aktivace signálních drah MAPK při odpovědi na abiotické stresové faktory rostlin.. 9	9
2.2.4.1 Regulace odpovědi na solný stres	9
2.2.4.2. Regulace odpovědi na stres vyvolaný deficicientem vody	10
2.2.4.3. Regulace odpovědi na stres z vysokých teplot.....	10
2.2.4.4 Regulace odpovědi na stres z těžkých kovů.....	11
2.2.5 MAPK a MAPKK u <i>Medicago sativa</i>	11
2.3 Rostlinný cytoskelet.....	12
2.3.1 Aktinový cytoskelet	13
2.3.1.1 Aktin-vázající proteiny	13
2.3.2 Mikrotubulový cytoskelet	15
2.3.2.1 Mikrotubuly-vázající proteiny	16
2.4 Transformace rostlin	17
2.4.1 Transformace prostřednictvím bakterií <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	17
2.4.2 Transformace metodou „gene-gun“	19
2.4.3 Transformace metodou elektroporace	20
2.4.4. Transformace metodou mikroinjekce	21
2.4.5 Transformace prostřednictvím PEG/lipozomů	21
2.4.6 Transformace prostřednictvím vláken karbidu křemíku	22
2.4.7 Transformace <i>Medicago sativa</i>	22
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	24
3.1 Materiál	24
3.1.1 Použité chemikálie	24

3.1.2	Použité protilátky	26
3.1.3	Roztoky a média.....	26
3.1.4	Použité přístroje	31
3.1.5	Software pro zpracování výsledků	32
3.1.6	Rostlinný materiál	32
3.1.7	Bakteriální materiál	32
3.2	Metody	33
3.2.1	Příprava B5H média.....	33
3.2.2	Příprava B50 média.....	33
3.2.3	Příprava MMS média.....	34
3.2.4	Příprava MS média.....	34
3.2.5	Příprava bakterií <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	34
3.2.6	Povrchová sterilizace listů	35
3.2.6	Transformace listových explantátů <i>Medicago sativa</i>	35
3.2.7	Regenerace rostlin procesem somatické embryogeneze	36
3.2.8	Výsev semen <i>Arabidopsis thaliana pMAT</i>	36
3.2.9	Odběr a homogenizace vzorků.....	36
3.2.10	Extrakce proteinů	37
3.2.11	Měření koncentrace proteinů	37
3.2.12	Příprava vzorků pro nanesení na gel	37
3.2.13	Příprava Bio-Rad TGX Stain-Free™ FastCast™ gelů.....	38
3.2.14	Gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného	38
3.2.15	Přenos proteinů na membránu.....	39
3.2.16	Blokace nespecifických vazeb a aplikace protilátek	39
3.2.17	Detekce proteinů	40
3.2.18	Mikroskopická analýza struktury cytoskeletu.....	40
4.	VÝSLEDKY	41
4.1.	Transformace listových explantátů <i>Medicago sativa</i> ko-kultivací s <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	41
4.1.1	Kultivace <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	41
4.1.2	Transformace listových explantátů <i>Medicago sativa</i>	41
4.1.3	Regenerace rostlin procesem somatické embryogeneze	43
4.2	Kvalitativní a kvantitativní determinace změn produkce proteinu SIMK v transgenních rostlinách.....	47
4.2.1	Imunoblotová analýza transgenních rostlin <i>Medicago sativa SIMKK-RNAi</i> ^{tagRFP-TUA6}	47
4.2.2	Imunoblotová analýza transgenních rostlin <i>Medicago sativa SIMKK-RNAi</i> ^{GFP-FABD2}	52
4.3	Mikroskopická analýza cytoskeletu transgenních rostlin <i>Medicago sativa</i>	56
4.3.1	Mikroskopická analýza mikrotubulového cytoskeletu rostlin <i>M. sativa SIMKK-RNAi</i> ^{tagRFP-TUA6}	56
4.3.2	Mikroskopická analýza aktinového cytoskeletu rostlin <i>M. sativa SIMKK-RNAi</i> ^{GFP-}	

FABD2	58
5. DISKUSE.....	61
6. ZÁVĚR	64
7. SEZNAM LITERATURY.....	65
8. SEZNAM ZKRATEK	74

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

Vypracování literární rešerše zaměřené na téma:

- aktivace signálních drah ve vývojových procesech a při odpovědi na stresové faktory u rostlin
- význam MAPK signálních modulů při kompartmentalizaci přenosu signálů v buňce
- význam druhu *Medicago sativa* L., a dosud známých funkcí MAPK A MAPKK u vojtěšky
- aktinový a mikrotubulový cytoskelet rostlin
- metody stabilní transformace u rostlin se speciálním zaměřením na vojtěšku, metody vnášení nebo umlčování genů a selekce pozitivních transgenů pomocí genotypování transformovaných rostlin

Praktická část

Realizovat experimenty zaměřené na transformaci listových explantátů vojtěšky s cílem indukce somatické embryogeneze a regenerace stabilních transgenních linií se sníženou expresí vybraných mitogenem-aktivovaných protein kináz, a s expresí markerů aktinového cytoskeletu a mikrotubulů. Následná biochemická a strukturní charakterizace aktinového cytoskeletu a mikrotubulů ve stabilně transformovaných liniích. Konkrétní cíle jsou:

- kultivace a množení rostlin vojtěšky *in vitro* prostřednictvím somatické embryogeneze
- kultivace a selekce bakteriálních kultur
- praktická transformace rostlin s cílem indukce a regenerace stabilních transgenních linií
- biochemické a strukturní analýzy experimentálních rostlin

1. ÚVOD

Medicago sativa L., je fialově kvetoucí luskovina patřící do čeledi bobovitých (*Fabaceae*). Díky svým vlastnostem se řadí mezi jednu z celosvětově nejvýznamnějších a nejrozšířenějších pícnin, hrající důležitou roli v udržitelném hospodářství a ekologické produkci. Rostliny jsou ve svém vnějším prostředí neustále vystavovány okolním vlivům, v podobě abiotických i biotických stresů, které mají drastický vliv na jejich přežití a výnos. Proto, že se jedná o přisedlé organismy, vyvinuly si specifické mechanismy obrany v podobě aktivace receptorů a signálních drah, zahrnující, mimo jiné, kaskády mitogenem-aktivovaných protein kináz (MAPK), vedoucí ke změnám na fyziologické, biochemické a molekulární úrovni a následně vhodné odpovědi či adaptaci. Zlepšování agronomických vlastností a odolnosti prostřednictvím tradičních šlechtitelských metod je u *M. sativa* poměrně omezené a časově náročné. Proto představují moderní metody transformace a genového inženýrství atraktivnější a rychlejší alternativu zejména při vylepšování nutričních vlastností a zvyšování odolnosti vůči chorobám, biotickým či abiotickým stresům. Modifikované plodiny by však mohly být využívány také k produkci rekombinantních proteinů, enzymů a léčiv (Radović *et al.*, 2003; Šamajová *et al.*, 2013a; Liu *et al.*, 2018; Raza *et al.*, 2019). Mezi nejvýznamnější MAPK u *M. sativa* se řadí SIMK neboli stresem indukovaná MAPK, k jejíž aktivaci dochází přenosem signálu z nadřazené SIMKK. Její role se projevuje zejména při ovlivňování stavu a dynamiky aktinového cytoskeletu, prostřednictvím fosforylace a regulace některých aktin-vázajících proteinů a při růstu a vývoji kořenových vlásků (Šamaj *et al.*, 2002; Ovečka *et al.*, 2014; Hrbáčková *et al.*, 2021).

Předkládaná diplomová práce se věnuje produkci dvojitych transgenních rostlin *M. sativa* se sníženou expresí *SIMKK* (*SIMKK-RNAi*) v expresní linii GFP-FABD2 k vizualizaci aktinového cytoskeletu a v expresní linii tagRFP-TUA6 k vizualizaci mikrotubulového cytoskeletu. Součástí diplomové práce byl samotný proces transformace a následná dokumentace průběhu regenerace transgenních rostlin procesem somatické embryogeneze. Poté byla provedena kvalitativní a semikvantitativní determinace změn v úrovni produkce proteinu SIMK, čímž byly vyselektovány rostliny s nejnižší hladinou produkce SIMK. Nakonec byla zdokumentována struktura a uspořádání aktinového cytoskeletu u transgenních rostlin *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} a mikrotubulového cytoskeletu u transgenních rostlin *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6}.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1. Tolice vojtěška (*Medicago sativa* L.)

2.1.1 Charakteristika

Tolice vojtěška (latinsky *Medicago sativa* L., mezinárodně alfalfa) je fialově kvetoucí luskovina patřící do čeledi bobovitých (*Fabaceae*). Využívá se jako kvalitní a levné krmivo s vysokou nutriční hodnotou a stravitelností. Je schopna vytvářet symbiotický vztah s půdními bakteriemi rodu *Rhizobium*, fixujícími vzdušný dusík, a obohacovat tak půdu v okolí kořenů o dusíkaté látky. Pěstování vojtěšky na polích tak zvyšuje úrodnost půdy a výnosy následujících plodin. Její variabilní genetický původ ji navíc umožňuje adaptovat se na různé podmínky prostředí. Díky těmto svým vlastnostem představuje jednu z nejrozšířenějších pícnin s velkým významem pro ekosystém, udržitelné hospodářství a ekologickou produkci po celém světě (Radović *et al.*, 2003; Torricelli, 2006; Radović *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2019).

2.1.2. Genom

Vojtěška je autotetraploid, má tedy 4 sady chromozomů, se základním chromozomovým číslem (x) 8 ($2n = 4x = 32$). Velikost jejího genomu je 800–1000 Mb (Blondon *et al.*, 1994; Hawkins a Yu, 2018). Autotetraploidní genom a cizosprašný způsob rozmnožování (alogamie) zapříčiňují, že je výzkum vojtěšky poměrně náročný. Jako model pro studium jiných druhů luštěnin, včetně vojtěšky, lze využít diploidní druh *Medicago truncatula* s krátkým životním cyklem a malým genomem. Tento druh má však omezený agronomický význam (Blondon *et al.*, 1994; Jiang *et al.*, 2019; Tichá *et al.*, 2020).

2.2 Signalizace u rostlin

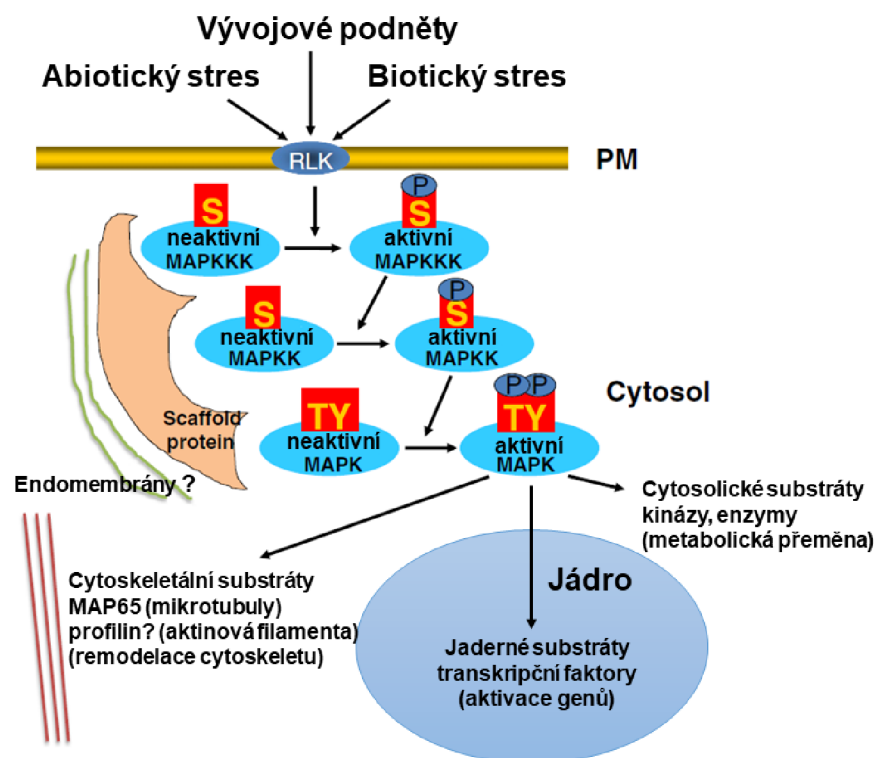
Rostliny jsou přisedlé organismy, neschopné pohybu, které jsou ve svém vnějším prostředí neustále vystavovány okolním vlivům v podobě biotických a abiotických stresů. Aby byly schopny těmto vlivům odolávat, vyvinuly si mechanismy pro rychlé rozpoznání signálů z měnícího se prostředí, pro jejich přenos a zpracování ve specifických adaptivních a obranných reakcích (Šamajová *et al.*, 2013a).

2.2.1 Mitogenem – aktivované protein kinázy (MAPK)

Proteinkinázy a fosfatázy hrají ústřední roli v přenosu signálů prostřednictvím fosforylace a defosforylace proteinů. To může následně vést nejen k aktivaci obranných reakcí vůči biotickému a abiotickému stresu, ale také k aktivaci vývojových procesů, mezi které řadíme například buněčný růst a diferenciaci. Jedním z nejčastěji studovaných mechanismů je kaskáda mitogenem-aktivovaných protein kináz (MAPK), převádějící zachycené a vnímané extracelulární signály na buněčnou odpověď. Ta může být časná, v podobě změn v buněčné organizaci, nebo pozdní v podobě transaktivace genové exprese, trvající několik minut až hodin (Taj *et al.*, 2010; Šamajová *et al.*, 2013a).

Signály z okolního prostředí jsou nejčastěji vnímány receptory na plazmatické membráně (např. RLKs, „receptor like-kinases“) a následně mohou být na moduly MAPK přeneseny buď přímou cestou, pomocí interakcí, anebo cestou nepřímou, pomocí sekundárních posílů (např. heterotrimerních GTPas). Přenos signálu přes MAP kinázovou kaskádu pak probíhá prostřednictvím reverzibilní fosforylace (Taj *et al.*, 2010; Šamajová *et al.*, 2013b; Komis *et al.*, 2018). MAPK kaskády jsou v signálních drahách sestaveny do třístupňového modulu zahrnující MAPK kinázu kinázu (MAP3K, MAPKKK či MEKK), MAPK kinázu (MAP2K, MAPKK či MEK) a MAPK. Kinázy navzájem, nebo i kinázy se substráty mohou být drženy pohromadě prostřednictvím tzv. „scaffold“ proteinů, postupně tak dochází k jejich aktivaci a transdukci signálu (Taj *et al.*, 2010; Šamajová *et al.*, 2013b). Ve srovnání s MAPK a MAPKK mají MAPKKK složitější a variabilnější primární struktury a složení domén. Průměrná molekulová hmotnost MAPK se pohybuje mezi 42–52 kDa (Taj *et al.*, 2010).

Z pohledu proteinové struktury, MAPKKK jsou serin/threonin kinázy aktivující MAPKK fosforylací dvou serin/threoninových zbytků v konzervovaném motivu S/T-X₃-S/T. Naproti tomu MAPKK jsou kinázy s duální specifitou aktivující MAPK fosforylací threoninových a tyrosinových zbytků v konzervovaném motivu T-X-Y. Aktivované MAPK se uvolňují z modulů, dochází k jejich relokalizaci (přemístění) v rámci buňky a následně fosforylují a tím regulují širokou škálu rozličných jaderných, cytosolických či cytoskeletálních substrátů, jako jsou enzymy, proteiny, jiné proteinové kinázy či transkripční faktory (Obr. 1; Jonak *et al.*, 2002; Rodriguez *et al.*, 2010; Šamajová *et al.*, 2013b). MAPK kaskády obecně vykazují vysokou substrátovou specifitu. Rozpoznání a navázání vhodného cílového substrátu závisí na rozdílné interakci dvou míst, tj. místa katalytického a dokovacího (Taj *et al.*, 2010).



Obrázek 1. Schéma zobrazující subcelulární organizaci modulů mitogenem-aktivovaných protein kináz (MAPK) a jejich cílů. PM = plazmatická membrána; S = serin; T = threonin; Y = Tyrosin. Upraveno podle Šamajová *et al.*, (2013b).

2.2.1.1. Klasifikace MAPKs

Rostlinné MAPK jsou klasifikovány do čtyř fylogenetických skupin (označovaných A–D) na základě struktury kinázové domény a sekvence aktivačního aminokyselinového motivu TXY. Motiv TEY (E = kyselina glutamová) se nachází u skupin A–C, a motiv TDY (D = kyselina asparagová) u vzdálenější skupiny D. Výjimku ze standardního motivu TXY tvoří MAPK4 z *Nicotiana tabacum*, která nese motiv MEY (Ichimura *et al.*, 2002; Yanagava *et al.*, 2016). Nedávná *in silico* studie (Mohanta *et al.*, 2016) ukázala u různých rostlinných druhů výskyt dalších jedinečných TXY nebo XXY motivů, čímž se potvrzuje divergence a rozmanitost rostlinných MAPK aktivačních modulů. Zdá se však, že proteinové motivy jako jsou TGY (G = Glycin) u savců a kvasinek nebo TPY (P = Prolin) u živočichů se v rostlinných MAPK nevyskytují (Komis *et al.*, 2018). MAPKK lze rozdělit opět do čtyř skupin (označovaných A–D) na základě porovnání proteinových sekvencí. Odlišné MAPKK řadí se do stejné skupiny mohou být aktivovány rozdílnými podněty (Xu *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2009; Taj *et al.*, 2010). MAPKKK, ve srovnání s MAPK a MAPKK, tvoří největší a nejkomplexnější rodinu kináz. Tu lze dále rozdělit

do tří menších skupin, tj. skupina MEKK, skupina „ZIK-like“ (podobná ZIK) a „Raf-like“ (podobná Raf; Shun-Wu a Ke-Xuan, 2004; Taj *et al.*, 2010).

2.2.2 Aktivace signálních drah MAPK ve vývojových procesech rostlin

Během růstu a vývoje může být anatomie, morfologie a fyziologie rostlin, v reakci na vnější podněty, modifikována, tak, aby se přizpůsobily podmínkám okolního prostředí. Jak samotná embryogeneze, tak i následný postembryonální vývoj rostlin jsou do určité míry řízeny signalizací MAPK. Ty jsou zapojeny do regulace buněčného dělení a diferenciaci, dále se podílí také na vývoji gametofytů a s tím spojené produkci gamet, specifikaci vývojového vzoru v průběhu embryogeneze a kontrole růstu vegetativních orgánů (Komis *et al.*, 2018).

2.2.2.1 Regulace buněčného dělení prostřednictvím MAPK

Specifická aktivace rostlinných MAPK je koordinována s konkrétními stádii během buněčného dělení. Nejlépe charakterizovanou dráhou zapojenou především do regulace cytokineze je kaskáda ANPs – MKK6 – MPK4 u *Arabidopsis thaliana* a její homolog NPK1 („NUCLEUS AND PHRAGMOPLAST LOCALIZED KINASE1“) – NQK1 – NRK1 u *Nicotiana tabacum*, k jejíž aktivaci dochází během pozdní M-fáze buněčného cyklu. Kináza MPK4/NRK1 fosforyluje protein asociovaný s mikrotubuly AtMAP65-1/NtMAP65-1a, který pozitivně reguluje expanzi fragmoplastu, čímž umožňuje vznik buněčné destičky. Tato kaskáda je aktivována KLP proteiny (proteiny podobné kinesinu) a její nesprávná regulace vede k zpoždění či přerušení cytokineze a tvorbě velkých mnohojaderných buněk (Calderini *et al.*, 2001; Nishihama *et al.*, 2001; Ishikawa *et al.*, 2002; Sasabe *et al.*, 2006; Beck *et al.*, 2011; Komis *et al.*, 2018).

Mezi další regulátory mitózy a cytokineze řadíme např. MPK6, jejíž role spočívá v řízení orientace roviny buněčného dělení. MPK6 fosforyluje a aktivuje proteiny asociované s mikrotubuly MAP65-1 a EB1c („END BINDING PROTEIN 1c“). *In vivo* lokalizační studie, pomocí „light-sheet“ fluorescenční mikroskopie, potvrdila v dělicích se buňkách kolokalizaci MPK6 s mikrotubulárními strukturami, jako jsou preprofázní svazek, mitotické vřeténko a expandující fragmoplast. Zapojení MPK6 do regulace orientace roviny buněčného dělení se však může uplatňovat i na jiných úrovních, např. prostřednictvím regulace transkripčních faktorů, jako jsou POK1 („PHRAGMOPLAST ORIENTING KINESIN 1“) a GCP4 („GAMMA TUBULIN COMPLEX PROTEIN 4“; Müller *et al.*, 2010; Smékalová *et al.*, 2014; Kohoutová *et al.*, 2015; Komis *et al.*, 2018).

2.2.2.2 Regulace vývoje gametofytu a embryogeneze prostřednictvím MAPK

Signalizace prostřednictvím MAPK kaskád má značný význam při vývoji samčích a samičích gamet, jejich splynutí během oplození a následného vývoje rostlinného embrya a semene. Lokalizační, proteomické a fosfoproteomické studie potvrdily přítomnost některých aktivovaných MAPK v reprodukčních pletivech rostlin, a tím i jejich zapojení do vývoje samčích gametofytů. Konkrétněji, MPK3 a MPK6 u rostlin *A. thaliana* zodpovídají za správný vývoj prašníku a růst pylové láčky, MPK4 je pak zapojena do signalizace během vývoje pylových zrn (Hord *et al.*, 2008; Zeng *et al.*, 2011a; Guan *et al.*, 2014). Po oplodnění, pro první asymetrické dělení zygoty a následný vývoj samotného embrya a suspenzoru, je nezbytná signalizace prostřednictvím kaskády zahrnující MKKK4 (též známá jako YODA), MPK3 a MPK6 u rostlin *A. thaliana* a MAPK5 a MAPK6 u *Oryza sativa*. Cílem této dráhy během regulace vývoje embrya je transkripční faktor WRKY2 (Lukowitz *et al.*, 2004; Bayer *et al.*, 2009; Yi *et al.*, 2016; Ueda *et al.*, 2017).

2.2.2.3 Regulace vegetativního růstu prostřednictvím MAPK

Vývoj, velikost a tvar vegetativních orgánů (tj. primární, boční a adventivní kořeny, hypokotyl, děložní a pravé listy) jsou ovlivněny aktivitou signálních drah MAPK, a to jak při optimálních podmínkách růstu, tak i při působení environmentálních stresů. Mezi nejdůležitější kinázy, zapojené do správného vývoje kořene, patří YODA. Ztráta její funkce vede k defektům suspenzoru během embryonálního vývoje, poruchám orientace buněčného dělení v kořenovém meristému a následným deformacím kořene. Za vytváření a růst bočních kořenů zodpovídají například kinázy MKK6, MKK7, MPK6, MPK13, anebo také MAP3K MEKK1, jejíž mutanti se vyznačují celkovým malým vzrůstem (nanismem), menším počtem bočních kořenů a kratšími kořenovými vlásky (Lukowitz *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2010; Beck *et al.*, 2011; Zeng *et al.*, 2011b; López-Bucio *et al.*, 2014).

Kompletní MAPK kaskády zapojené do vývoje listů jsou méně známé. Mezi jednotlivé kinázy zapojené do řízení morfologie listů a výhonků, lze zařadit MKK7, MPK3 a MPK6, fosforylující auxinový transportér PIN1. Dále MKK2 a MPK10 jejichž exprese souvisí se vzory žilnatosti listů, či MAP3 kinázu ILA1 („INCREASED LEAF ANGLE 1“) podílející se na tvorbě vaskulárních svazků (Ning *et al.*, 2011; Stanko *et al.*, 2014; Jia *et al.*, 2016). Mezi další aspekty vývoje listů regulované prostřednictvím MAPK

signálních drah patří jejich senescence. Ta může být vyvolána přirozeným procesem stárnutí, nebo v reakci na podmínky okolního prostředí. U rostlin *A. thaliana* je přirozený proces senescence řízen aktivitou MKK9 a MPK6. V případě, že je vyvolána v reakci na stres z nedostatku vody, dochází k expresi a aktivaci MKK4 a MKK5 (Zhou *et al.*, 2009; Patharkar a Walker, 2016; Komis *et al.*, 2018).

2.2.3 Aktivace signálních drah MAPK při odpovědi na biotické stresové faktory rostlin

2.2.3.1 Vrozený imunitní systém rostlin

Vrozený imunitní systém rostlin vůči mikrobiálním patogenům funguje na dvou obranných úrovních. První úroveň je založena na principu detekce konzervovaných molekulárních vzorů asociovaných s patogeny (PAMP; „pathogen-associated molecular patterns“) prostřednictvím transmembránových PRR receptorů („pattern recognition receptors“). Označuje se tedy jako PTI imunita („PAMP-triggered immunity“) a iniciuje obranné reakce v podobě přeprogramování exprese hostitelského genu, změn enzymatické aktivity a produkce antimikrobiálních látek, které vedou k zamezení úplné kolonizace rostliny patogenem. Receptory pro rozpoznávání PAMPs jsou buď receptorové kinázy (RLK) nebo receptorové proteiny (RLP) s extracelulární doménou. Mezi nejznámější příklady PAMP řadíme bakteriální elicitory, jako je flagellin (flg22) či harpin, nebo také houbové elicitory, jako např. chitin a ergosterol. Patogeny jsou však schopny dodávat do hostitelských buněk tzv. efektorové molekuly (faktory virulence) zvyšující mikrobiální „fitness“ a potlačující aktivitu signálních složek PTI. Díky této vlastnosti, jsou patogeny schopny první obrannou úroveň rostlin úspěšně překonat. Proto se u rostlin vyvinula druhá obranná úroveň označovaná jako ETI imunita („effector-triggered immunity“). Ta zahrnuje mechanismy detekce efektorových molekul pomocí imunitních NLR receptorů zvaných proteiny rezistence (R-proteiny). Tyto proteiny jsou kódovány R-geny a obsahují NB („nucleotide-binding“) doménu a oblasti bohaté na leucin (LRR; „leucine-rich repeat“). ETI je rychlejší a silnější forma obrany, která iniciuje hypersenzitivní reakce (HR) v podobě lokalizované buněčné smrti v místě infekce, vede k zabránění šíření patogenu hostitelským pletivem a k rezistenci vůči onemocnění. Na celkové odolnosti vůči patogenům se podílí rozsáhlá síť MAPK kaskád a jejich signální dráhy představují, na obou úrovních vrozené imunity rostlin, zásadní mechanismus obrany (Dangl a Jones, 2001; Jones a Dangl, 2006; Boller a Felix, 2009; Rodriguez *et al.*, 2010; Ramírez-Zavaleta *et al.*, 2022).

2.2.3.2 Regulace obrany prostřednictvím MAPK

Jednou z nejlépe charakterizovaných receptorových kináz (RLK) je FLS2 („FLAGELLIN SENSING 2“) rozpoznávající bakteriální flagelinový peptid flg22. FLS2 vytváří receptorový komplex s BAK1 („BRI1-ASSOCIATED KINASE“) a iniciuje fosforylaci/defosforylaci interagujících partnerů a spouští signální kaskády MAPK (Chinchilla *et al.*, 2007; Ramírez-Zavaleta *et al.*, 2022).

První takovou kaskádou je MEKK1 – MKK1/2 – MPK4. MPK4 interaguje a vytváří komplex se svým jaderným substrátem MKS1 („MAP KINASE SUBSTRATE 1“) a transkripčním faktorem WRKY33. Po aktivaci MPK4 dochází k fosforylaci MKS1, uvolnění komplexu MKS1/WRKY33 a regulaci exprese enzymu PAD3 („PHYTOALEXIN DEFICIENT 3“), který kóduje biosyntézu kamalexinu. Kamalexin je charakteristický fytoalexin *A. thaliana* vykazující cytotoxicitu proti eukaryotickým patogenům. MPK4 se v reakci na biotický stres podílí také na regulaci oxidativního vzplanutí a ukládání kalózy, jež slouží k posílení stěn hostitelských buněk (Rogers *et al.*, 1996; Ostergaard *et al.*, 2002; Ichimura *et al.*, 2006; Qiu *et al.*, 2008; Böttcher *et al.*, 2009; Hématy *et al.*, 2009; Rodriguez *et al.*, 2010).

Druhou signální kaskádou je dráha MEKK1 – MKK4, MKK5 – MPK3, MPK6. Jednou z funkcí kinázy MPK3 je aktivace transkripčního faktoru VIP1 („VirE1-interacting protein 1“), který po přemístění do jádra indukuje expresi obranných PR („pathogenesis related“) genů. Kináza MPK6 se účastní fosforylace a stabilizace enzymu ACS6 (ACC syntáza 6) podílejícího se na syntéze fytohormonu ethylenu. Obě aktivované kinázy, MPK3 i MPK6, fosforylují a aktivují také kinázu FRK1 („flg22-INDUCED RECEPTOR-LIKE KINASE 1“) a transkripční faktory WRKY22 a WRKY29. Rostliny exprimující geny *FRK1* a *WRKY29* se vyznačují zvýšenou rezistencí vůči bakteriálním i houbovým patogenům. U rostlin *A. thaliana* infikovaných houbovým patogenem *Botrytis cinerea* aktivují tyto kinázy navíc také WRKY33, nezbytný pro indukci biosyntézy kamalexinu. Proteinkinázy MPK3 i MPK6 však mohou být defosforylovány a deaktivovány jedinečnou fosfothreonin lyázovou aktivitou patogenního efektoru HopA11, čímž dochází k potlačení obranných reakcí rostlin na úrovni PTI. Určitá souhra v regulaci obranných reakcí prostřednictvím MPK3, MPK6 a MPK4 umožňuje rostlině přísně kontrolovat typ obranné reakce (Asai *et al.*, 2002; Liu a Zhang, 2004b; Djamei *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Joo *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2011; Šamajová *et al.*, 2013b).

Zapojení MAPK kaskád do signalizace a obrany při působení biotických stresů je prokázáno i u jiných rostlinných druhů. Např. v tabáku dochází při inokulaci virem

tabákové mozaiky (TMV) k aktivaci dvou drah. Signalizace prostřednictvím kaskády MEK2 – SIPK („SALICYLIC ACID-INDUCED PROTEIN KINASE“) a WIPK („WOUND INDUCED PROTEIN KINASE“) vede k hypersenzitivní reakci, v případě dráhy NPK1 – MEK1 – NTF6 dochází ke snížené rezistenci rostlin vůči TMV. Ortology kináz SIPK a WIPK se nachází také u rajčete (MPK1/2 a MPK3), u vojtěšky (SIMK a SAMK), u petržele (MPK6) a u rýže (MAPK5; Zhang a Klessig, 1998; Jonak *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004a; Ren *et al.*, 2006).

2.2.4 Aktivace signálních drah MAPK při odpovědi na abiotické stresové faktory rostlin

Změny životního prostředí, v podobě snížené dostupnosti vody a úrodnosti půdy v důsledku salinity a těžkých kovů, zvyšující se teploty a úrovně znečištění ovzduší, mají drastický vliv na přežití a výnosnost rostlin. Tyto abiotické faktory prostředí působí na rostliny často simultánně a vedou k podobnému fyziologickému efektu, např. deficit vody přichází s vysokými teplotami a společně zhoršují účinky solného a osmotického stresu. Rostliny jsou přisedlé organismy a pokud mají environmentální stresy vyvolané změnou klimatu přežít, musí být schopny se jim přizpůsobit. Pokud je rostlina vystavena některému z abiotických stresových faktorů, dochází u ní ke změnám na fyziologické, biochemické a molekulární úrovni. Koordinace všech těchto reakcí je dosaženo prostřednictvím víceúrovňových regulačních procesů, mezi které řadíme modifikaci chromatinu, transkripční regulaci, alternativní sestřih, fosforylaci, ubikvitinaci či sumoylaci proteinů. Fosforylace je důležitá posttranslační modifikace katalyzována enzymy proteinkinázami. Vede ke změně aktivity a stability proteinu, jeho lokalizaci v buňce a hraje zásadní roli v přenosu signálu v rostlinách (Danquah *et al.*, 2013; Friso a van Wijk, 2015; Haak *et al.*, 2017; Raza *et al.*, 2019).

2.2.4.1 Regulace odpovědi na solný stres

Solný stres je u rostlin zodpovědný za narušení jejich správného růstu, vývoje a iontové homeostázy. To následně vede k iontové toxicitě, poškození membrán, vodnímu deficitu a osmotickému stresu, což v konečném důsledku ovlivňuje uzavírání průduchů, sníženou asimilaci uhlíku a zvýšenou akumulaci škodlivých reaktivních forem kyslíku (ROS; Kumar *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2020). Mezi hlavní MAPK u rostlin *A. thaliana*, jejichž aktivita je indukována nejen solným stresem, ale také v reakci na sníženou teplotou, sucho či poranění, můžeme zařadit MPK3, MPK4 a MPK6. V reakci na solný stres však dochází k indukci pěti dalších MAPK (MPK9, MPK10, MPK11, MPK17 a MPK18),

dvou MAP2K (MKK7 a MKK9) a čtyř MAP3K (MEKK3, MEKK5, MEKK6 a MEKK7; Ichimura *et al.*, 2000; Moustafa *et al.*, 2008). Komplexní studie, zabývající se transdukcí signálu při reakci na solný stres, pomohly odhalit kompletní signální dráhu MEKK1 – MKK2 – MPK4/MPK6, kde MPK4 aktivuje neznámý transkripční faktor, zatímco MPK6 aktivuje transkripční regulátory ZAT6 a MYB41. Dále prokázaly, že kináza MPK3 fosforyluje a vytváří komplex s proteinem AZI1 (hybridní protein bohatý na prolin; HyPRP) a slouží jako jeho pozitivní regulátor. Nadměrná exprese MKK2 a AZI1 vede u rostlin *A. thaliana* k zvýšené toleranci až rezistenci vůči soli (Teige *et al.*, 2004; Pitzschke *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2020). Mezi další významné signální molekuly řadíme kyselinu fosfatidovou (PA), která specificky interaguje s MKK7 a MKK9 a spouští signalizační kaskádu MKK7/MKK9 – MPK6. MPK6 následně fosforyluje Na⁺/H⁺ antiportér SOS1 („salt overlay sensitive“) a další substráty, což u rostlin opět vede ke zvýšené toleranci vůči zasolení (Yu *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2019).

2.2.4.2. Regulace odpovědi na stres vyvolaný deficitem vody

Stres způsobený nedostatkem vody vyvolává u rostlin různé fyziologické a biochemické reakce, zahrnující uzavření průduchů, potlačení fotosyntézy, snížení buněčného růstu a zvýšení míry respirace. Rostliny reagují a přizpůsobují se deficitu vody jak na buněčné, tak na molekulární úrovni (Shinozaki a Yamaguch-Shinozaki, 2007). Během signalizace dochází k indukci pěti MAPK (MPK2, MPK3, MPK4, MPK5 a MPK12) tří MAP2K (MKK1, MKK3 a MKK4) a tří MAP3K (MEKK18, Raf43 a MEKK20). Nadprodukce těchto kináz, konkrétně MKK1, MKK4, MEKK18 a Raf 43 u rostlin *A. thaliana* významně zvyšuje jejich toleranci vůči suchu. Signální dráhy jsou vzájemně propojeny, k fosforylaci a aktivaci MPK4 dochází prostřednictvím MKK1, MEKK18 pak slouží jako pozitivní regulátor MPK3. Velká část jednotlivých komponentů signálních drah, včetně konkrétních cílů MAPK však stále není přesně známa (Matsuoka *et al.*, 2002; Moustafa *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012; Virk *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017).

2.2.4.3. Regulace odpovědi na stres z vysokých teplot

Při vystavení rostlin extrémním teplotám, přesahujícím jejich optimální úroveň, dochází ke změnám ve fyziologických a metabolických procesech. Teplotní stres vede ke zvýšení míry respirace a rychlosti fotosyntézy, což přispívá k vyšší produkci ROS, jež nepříznivě ovlivňují produktivitu rostlin. Hlavní strategií obranné reakce, na buněčné úrovni, se stává ochrana proteinů proti agregaci a degradaci. Pro udržení proteinové homeostázy jsou produkovány „heat shock“ proteiny a faktory (HSP/HSF; HSP100, HSP90, HSP70

a HSP60), které napomáhají a usnadňují renaturaci proteinů poškozených tepelným šokem. Aktivita HSF je regulována několika posttranslačními modifikacemi, jako je fosforylace, acetylace či sumoylace (Li *et al.*, 2011; Evrard *et al.*, 2013; Moustafa *et al.*, 2014; András *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020). U rostlin *A. thaliana* aktivuje stres, vyvolaný vysokou teplotou, MAP kinázy MPK3, MPK4 a MPK6, které následně fosforylují HSFA4A. Aktivovaný HSFA4A se váže na promotor cílových genů (HSP, WRKY a ZAT12) a indukuje jejich expresi. Tyto geny poskytují ochranu proti ROS, ochranu proteinových enzymů proti denaturaci při vysokých teplotách a další buněčnou obranu, což vede k celkové aklimatizaci rostlin (Sangwan *et al.*, 2002; András *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2020).

2.2.4.4 Regulace odpovědi na stres z těžkých kovů

Ve stopových množstvích jsou některé těžké kovy pro růst a vývoj rostlin nezbytné, v nadměrném množství však způsobují oxidativní stres, vážné poškození buněk a ve výsledku vedou k inhibici růstu a vývoje rostlin a k příznakům toxicity. Jako odpověď na stres z těžkých kovů syntetizují rostliny peptidy, jako jsou metalothioneiny a fytochelatiny, které mají schopnost daný kov vázat a ve formě komplexu ukládat do vakuoly (Hall, 2002; Jonak *et al.*, 2004). Při charakterizaci těchto signálních drah bylo zjištěno, že expozice rostlin vlivu mědi (Cu) a kadmia (Cd) vede k aktivaci kaskády zahrnující MEKK1 a zatím neznámou MEK aktivující MPK3 a MPK6 (Yeh *et al.*, 2007; dos Reis *et al.*, 2018; López-Bucio *et al.*, 2019).

2.2.5 MAPK a MAPKK u *Medicago sativa*

U *M. sativa* patří mezi nejznámější MAPK SIMK a její specifický aktivátor SIMKK, k jejichž aktivaci dochází při působení solného stresu a elicitorů. SIMKK je proteinkináza s duální specifitou, aktivující SIMK prostřednictvím fosforylace threoninových a tyrosinových zbytků aktivační smyčky. SIMK se v epidermálních buňkách kořene nachází především v jádrech. Během vytváření a vývoje kořenových vlásků ovšem dochází k její aktivaci a přesunu z jádra do cytoplazmy a do vrcholu rostoucích kořenových vlásků s hustou sítí aktinových filament. Depolymerizace aktinu (latrunkulinem B) má za následek přemístění SIMK zpět do jádra, zatímco stabilizace aktinu (jasplakinolidem) vede ke kolokalizaci SIMK s aktinovými filamenti v cytoplazmě (Šamaj *et al.*, 2002). Tyto látky ovlivňující aktinový cytoskelet mají tedy přímý vliv na intracelulární lokalizaci SIMK. SIMK fosforyluje a reguluje některé z proteinů vážících se na aktin, ovlivňuje stav a dynamiku aktinového cytoskeletu a hraje

klíčovou roli v růstu a vývoji kořenových vlásků (Baluška *et al.*, 2000; Bubb *et al.*, 2000; Cardinale *et al.*, 2000; Kiegerl *et al.*, 2000; Cardinale *et al.*, 2002; Šamaj *et al.*, 2002; Hrbáčková *et al.*, 2021). Signální dráhy MAPK se však účastní také dalších obranných reakcí. Během působení vysokých teplot dochází k aktivaci kinázy HAMK, a naopak vystavení rostlin chladu vede k aktivaci kinázy SAMK. Pokles i zvýšení teploty jsou vnímány prostřednictvím strukturálních změn na plazmatické membráně (PM), postupně dochází k přílivu vápenatých iontů (Ca^{2+}), aktivaci CDPKs („calcium-dependent protein kinases) a odlišných MAPK kaskád (Jonak *et al.*, 1996; Sangwan *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2019). Vystavení rostlin vojtěšky vysokým hladinám těžkých kovů, konkrétně vlivu Cu a Cd, vede k aktivaci čtyř odlišných MAPK (SIMK, MMK2, MMK3 a SAMK). Bylo zjištěno, že při působení CuCl_2 dochází nejprve k aktivaci MAPK kinázy SIMKK, která následně aktivuje SIMK a SAMK, nezprostředkovává však aktivaci MMK2 ani MMK3. Rostliny tak pravděpodobně reagují na stres vyvolaný těžkými kovy, indukcí několika odlišných MAPK drah (Jonak *et al.*, 2004). K aktivaci SIMK, MMK2, MMK3 a SAMK dochází také při působení různých houbových elicitorů. SIMK a MMK3 jsou v tomto případě aktivovány dvěma MAPK kinázami, konkrétně SIMKK nebo PRKK. PRKK navíc fosforyluje a aktivuje také SAMK (Cardinale *et al.*, 2000; Cardinale *et al.*, 2002; Jonak *et al.*, 2002).

2.3 Rostlinný cytoskelet

Aby mohly buňky správně fungovat, musí být fyzicky robustní, správně vnitřně strukturované a musí mechanicky interagovat jak mezi sebou, tak se svým prostředím. Všechny buňky musí být během růstu a dělení schopny přeskupit své vnitřní komponenty a přizpůsobit se měnícím se okolnostem. Veškeré tyto prostorové a mechanické funkce buňky jsou závislé na systému filament (vláken) zvaném cytoskelet (Bray, 2001; Alberts *et al.*, 2015). Rostlinný cytoskelet je složen z aktinových a mikrotubulových (MT) sítí. MT vznikají polymerizací heterodimerů α -tubulinu a β -tubulinu, aktinová vlákna (F-aktin) pak polymerizací globulárního aktinu (G-aktin). MT i F-aktin jsou vláknité struktury s podobnými vlastnostmi, jejich organizace, dynamika a role v buňkách se však liší (Wang a Mao, 2019). Aktinová vlákna se podílí na vytváření a udržování buněčné polarity, určují tvar buňky, jsou nezbytná pro pohyb buněčných organel a její cytokinezi. Mikrotubuly řídí tvar buněk, organizaci biosyntézy buněčné stěny a tvoří mitotické vřeténko, které odděluje chromozomy během buněčného dělení, a fragmoplast

k zabezpečení cytokineze. Cytoskeletální vlákna interagují se stovkami dalších proteinů (např. motorové proteiny), které je regulují a spojují s jinými buněčnými složkami i mezi sebou navzájem (Dröbak *et al.*, 2004; Alberts *et al.*, 2015).

2.3.1 Aktinový cytoskelet

Aktin je mimořádně dobře konzervovaný a jeho aminokyselinové sekvence jsou v rámci různých eukaryotických druhů obvykle z 90 % identické. Každá podjednotka aktinu (tzv. globulární nebo též G-aktin) je polypeptid o 375 aminokyselinách (AMK). Jednotlivé aktinové podjednotky se spojují formou „hlava-ocas“ („head-to-tail“) a vytváří strukturu v podobě těsné pravotočivé šroubovice o šířce cca 8 nm. Tato struktura se označuje jako aktinové mikrofilamentum, nebo též F-aktin, a je poměrně flexibilní. Aktinová filamenta jsou polární a mají strukturálně odlišné konce. Na plus (+) konci, označovaném také jako ostnatý („barbed end“), dochází k rychlejší polymerizaci. Na minus (–) konci, zvaném též špičatý („pointed end“) je růst aktinového vlákna pomalejší. Proces vytvoření nového aktinového vlákna se nazývá nukleace. Regulace tvorby aktinových filament je důležitý mechanismus, jehož prostřednictvím řídí buňka svůj tvar a pohyb. Každá podjednotka má uprostřed molekuly vazebné místo pro ATP (adenosintrifosfát) či ADP (adenosindifosfát). Aktin dokáže katalyzovat hydrolýzu ATP, u volných podjednotek aktinu probíhá tato hydrolýza velmi pomalu, avšak při začlenění podjednotek do vlákna dochází k jejímu urychlení. Krátce po hydrolýze ATP, se z každé podjednotky uvolní volná fosfátová skupina, ale ADP zůstává zachycen ve struktuře vlákna. Existují tedy dva různé typy vláknitých struktur, jeden s „T formou“ navázaného nukleotidu (ATP) a jeden s navázanou „D formou“ (ADP). Prostorová a časová dostupnost monomerů, proces nukleace, prodlužování či depolymerizace aktinových filament a jejich následná organizace a dynamika je řízena aktin-vázajícími proteiny (Dröbak *et al.*, 2004; Hussey *et al.*, 2006; Alberts *et al.*, 2015).

2.3.1.1 Aktin-vázající proteiny

Mezi jedny z hlavních aktin-vázajících proteinů (ABPs; „actin-binding proteins“) řadíme thymosin a profilin. Thymosin je malý protein zabraňující polymerizaci. Aktinové monomery s navázaným thymosinem jsou v tzv. „uzamčeném stavu“, což znamená, že nemohou asociovat s kladnými ani zápornými konci aktinových vláken a nedochází u nich k hydrolýze ani výměně navázaného nukleotidu. Profilin je protein plnící opačnou funkci. Váže se na povrch aktinového monomeru a zprostředkovává připojení komplexu profilin-aktin k volnému plus konci vlákna. Po jeho uvolnění z komplexu zůstává

aktinové vlákno o jednu podjednotku delší. Mezi profilinem a thymosinem dochází ke kompetici o vazbu na jednotlivé aktinové monomery. Další skupinu tvoří dva aktin-nukleační proteiny, konkrétně Arp2/3 a formin. Tyto proteiny spojují několik aktinových podjednotek dohromady a vytváří tzv. nukleační jádro. Komplex Arp2/3 se váže na minus konec aktinových podjednotek, tvoří nukleační jádra podél jiných vláken F-aktinu a indukuje jeho větvení do tzv. sítí. Formin je dimerní protein vážící se na plus konec aktinových podjednotek a vytvářející nová nukleační jádra pro růst paralelních nerozvětvených filament, která mohou být následně zesíťována do svazků (Mullins *et al.*, 1998; Drøbak *et al.*, 2004; Zigmond *et al.*, 2004; Hussey *et al.*, 2006; Alberts *et al.*, 2015).

Chování a vlastnosti aktinových filament jsou regulovány několika třídami vazebných proteinů, lišících se v místě navázání. Tropomyosin je protein vážící se podél aktinového vlákna, zajišťující tak jeho stabilizaci a zpevnění. Stabilizaci aktinového vlákna na plus konci zprostředkovává tzv. „capping“ protein, který po navázání učiní plus konec neaktivním a výrazně tak sníží rychlost jeho růstu a depolymerizace. Stejnou funkci vykonává po navázání na minus konec aktinového vlákna protein tropomodulin. Další důležitý mechanismus regulace aktinových vláken závisí na jejich štěpení na menší části. Jednou třídou aktin-oddělujících proteinů (ASPs; „actin-severing proteins“) je superrodina gelsolinů. Tyto proteiny jsou aktivovány vysokými hladinami cytosolických Ca^{2+} , dochází k jejich navázání na povrch vlákna a následnému naštěpení vlákna. Po rozdělení zůstává gelsolin připojen k novému plus konci aktinového filamentu. Druhým důležitým aktin-oddělujícím proteinem je kofilin, též známý jako aktin-depolymerizující faktor (ADF). U rostlin *A. thaliana* tvoří *ADF* velkou genovou rodinu, produkující nejméně devět členů (AtADF1 – AtADF9; Dong *et al.*, 2001a). ADF/kofilin se přednostně váže na starší aktinová vlákna obsahující ADP, způsobuje jejich destabilizaci a následnou depolymerizaci. Aktinová vlákna mohou být před ADF/kofilinem chráněna vazbou tropomyosinu. Organizace a dynamika aktinu v buňkách tedy závisí na rovnováze mezi aktin-vazebnými proteiny (Dong *et al.*, 2001b; Drøbak *et al.*, 2004; Zigmond *et al.*, 2004; Hussey *et al.*, 2006; Alberts *et al.*, 2015).

Samostatnou skupinu ABPs tvoří aktin-sítující proteiny („actin-bundling proteins“), sestavující aktinová vlákna do větších uspořádaných struktur. U rostlin zde řadíme viliny, elongační faktor-1 α (EF-1 α) a fimbriny. Fimbrin je tvořen doménou vázající vápník sestávající z páru „EF hand“ domén a dvěma aktin-vazebnými doménami (ABD 1 a 2), složenými z „calponin homology“ domén. Fúze aktin-vazebné domény 2 (ABD2) se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP) se využívá jako fluorescenční

molekulární marker k *in vivo* vizualizaci a dokumentaci aktinového cytoskeletu (Kovar *et al.*, 2000; Gungabissoon *et al.*, 2001; Kovar *et al.*, 2001; Sheahan *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005; Voigt *et al.*, 2005).

2.3.2 Mikrotubulový cytoskelet

Mikrotubuly jsou polymery proteinu tubulinu. Jsou strukturálně složitější než aktinová vlákna, vysoce dynamické a hrají v buňce srovnatelně různorodé a důležité role. Tubulin se nachází ve všech eukaryotických buňkách a existuje v mnoha izoformách. Každá tubulinová podjednotka je heterodimer tvořený dvěma příbuznými globulárními proteiny, α -tubulinem a β -tubulinem, z nichž každý obsahuje 445–450 aminokyselin pevně vázaných nekovalentními vazbami. Heterodimery tubulinu se spojují formou „hlava-ocas“ a tvoří protofilamentum. 13 paralelních protofilament následně vytvoří dutou válcovitou strukturu o šířce cca 25 nm. Tato struktura je poměrně pevná a nazývá se mikrotubul. Vytvoření nového mikrotubulu probíhá u živočichů a kvasinek nukleací ze specifického MTO („microtubule-organizing“) centra, u rostlin jsou však nukleační místa rozptýlena po celé cytoplazmě, a je závislé na komplexu obsahujícím γ -tubulin (γ -TuC). V tomto komplexu dochází k navázání pomocných proteinů na γ -tubulin a společně pak vytváří spirální kruh sloužící jako templát pro nové mikrotubuly. Všechny podjednotky každého protofilamenta v mikrotubulu směřují stejným směrem, přičemž α -tubuliny jsou exponovány na mínus (–) a β -tubuliny na plus (+) konci mikrotubulu. Dynamika mikrotubulů je, stejně jako u aktinu, silně ovlivněna vazbou a hydrolyzou nukleotidu. V případě mikrotubulů se však jedná o GTP (guanosintrifosfát). Každý α i β monomer má vazebné místo pro jednu molekulu GTP, přičemž na α -tubulinu je GTP zachycen na rozhraní dimeru a nikdy nedochází k jeho hydrolyze či výměně. Naproti tomu nukleotid navázaný na β -tubulinovou podjednotku může být hydrolyzován, dochází k uvolnění volné fosfátové skupiny a na β -tubulinu zůstává navázán GDP (guanosindifosfát). Stejně jako v případě aktinových vláken tedy mohou existovat dvě různé mikrotubulové struktury, jedna s „T formou“ navázaného nukleotidu (GTP) a druhá s navázanou „D formou“ (GDP). Za běžných fyziologických podmínek má GTP-tubulin tendenci k polymerizaci a GDP-tubulin naopak k depolymerizaci. Mikrotubuly jsou poměrně nestabilní struktury a může u nich docházet k velmi rychlému střídání fází růstu a smršťování. Rychlá změna z fáze růstu na fázi smršťování se nazývá katastrofa, opačná změna fází se pak označuje jako záchrana („rescue“). Na dynamice a organizaci mikrotubulů uvnitř buňky se navíc podílí řada dalších proteinů, vážících se jak na

tubulinové dimery, tak na samotné mikrotubuly (Mitchison a Kirschner, 1894; Goddard *et al.*, 1994; Mayer a Jürgens, 2002; Alberts *et al.*, 2015).

2.3.2.1 Mikrotubuly-vázající proteiny

Proteiny vázající se na mikrotubuly či jednotlivé tubulinové heterodimery se souhrnně označují jako MAPs („mikrotubule-associated proteins“) a jsou cílem několika specifických proteinkináz, které mohou prostřednictvím fosforylace řídit jejich aktivitu a lokalizaci uvnitř buněk. Významným zástupcem v živočišných buňkách je malý protein stathmin vázající se na dva tubulinové heterodimery a zabraňující tak jejich připojení k rostoucímu konci mikrotubulu. Stathmin snižuje koncentraci volných tubulinových podjednotek v buňkách a zvyšuje pravděpodobnost, že mikrotubuly přejdou z fáze růstu do fáze smršťování. Jeho fosforylací však dochází k inhibici vazby na tubulinové podjednotky, narušení jeho funkce, a tedy i potlačení dynamické nestability (Rubin a Atweh, 2004; Alberts *et al.*, 2015).

Proteiny vázící se na konce mikrotubulů mohou ovlivňovat rychlost a frekvenci událostí katastrof a záchrany. Do této skupiny patří proteiny příbuzné kinesinu-13, označované také jako katastrofické faktory, které po navázání indukují oddělování jednotlivých protofilamentů a následný rozpad mikrotubulu. U rostlin však tato funkce nebyla prokázána. Opačnou funkci má protein MAP215, který stabilizuje rostoucí konec mikrotubulu, na kterém dochází k připojování nových podjednotek tubulinu. Podporuje tak jeho polymerizaci a současně působí proti aktivitě katastrofických faktorů. Některé z MAPs se váží podél povrchu mikrotubulů a zajišťují tak jejich stabilizaci či destabilizaci. Mechanismem destabilizace je v tomto případě tzv. naštěpení a rozdělení mikrotubulu proteinem zvaným katanin, který je v současnosti jediným prokázaným mikrotubuly-depolymerizujícím proteinem u rostlin. Jiné MAPs pak mohou zprostředkovávat interakci MT s ostatními buněčnými složkami, případně sestavovat mikrotubuly do větších uspořádaných struktur, tzv. svazků a sítí. Do této skupiny řadíme u rostlin rodinu proteinů MAP65, v živočišných buňkách plní stejnou funkci např. proteiny tau či MAP 1, 2 a 4 (Howard *et al.*, 1989; Brouhard *et al.*, 2005; Hamada *et al.*, 2007; Galjart *et al.*, 2010; Sharp a Ross, 2012; Alberts *et al.*, 2015).

2.4 Transformace rostlin

Genetická transformace představuje řízený žádoucí přenos cizího genu, z jednoho organismu do druhého, a jeho následnou stabilní integraci a expresi v genomu. Přenesený gen se označuje jako transgen a organismy, které se po úspěšné transformaci z buněk vyvinou, se označují jako transgeni. Do agronomicky či jinak významných plodin mohou být přenášeny geny nejen z nepříbuzných druhů rostlin, ale i z organismů jako jsou bakterie, viry, houby či zvířata. Cílem těchto modifikací je zejména vylepšení nutričních vlastností plodin, zvýšení jejich odolnosti vůči chorobám a biotickým či abiotickým stresům. Modifikované plodiny by však mohly být také alternativou pro produkci rekombinantních proteinů a vakcín (Babaoglu *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 2004; Vain, 2007; Barampuram a Zhang, 2011; Keshavareddy *et al.*, 2018).

Metody genetické transformace, přesněji způsob přenosu cizí DNA do rostlinných buněk, lze rozdělit na dvě kategorie: nepřímé (též označovány jako biologické) a přímé (též nebiologické). Metoda nepřímé transformace je založena na principu zavádění genu zájmu do cílových buněk prostřednictvím mediátorů v podobě bakterií, např. *Agrobacterium tumefaciens* či *Agrobacterium rhizogenes*. Metody přímé transformace zahrnují např. genové dělo („gene-gun“), mikroinjekci, transformaci zprostředkovanou polyethylenglykolem (PEG), liposomy, karbidem křemíku či chloroplasty. Přenos genů zájmu je tedy mechanický, chemický či fyzikální. Transformace zprostředkovaná bakteriemi rodu *Agrobacterium* má oproti metodám přímého přenosu DNA určité výhody, řadíme mezi ně např. schopnost přenášet velké neporušené segmenty DNA, jednoduchou inzerci transgenů s nízkým počtem kopií, stabilní integraci, dědičnost a konzistentní expresi genu v následujících generacích. Právě proto stále zůstává nejběžnější a nejúčinnější metodou transformace rostlin (Sanford, 1990; Rakoczy-Trojanowska, 2002; Tzfira a Citovsky, 2006; Barampuram a Zhang, 2011; Keshavareddy *et al.*, 2018).

2.4.1 Transformace prostřednictvím bakterií *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens je gramnegativní fytopatogenní bakterie žijící v půdě, je schopna infikovat dvouděložné rostliny a indukovat v rostlinných pletivech vznik tumorů. Její přirozenou vlastností, je schopnost přenosu a integrace části velkého tumor-indukujícího plazmidu (Ti-plazmidu), T-DNA, do jaderného genomu hostitelské rostliny. Transferovaná DNA (T-DNA) obsahuje dva typy genů, tzv. onkogeny, kódující enzymy pro syntézu auxinů a cytokininů, které způsobují tvorbu nádorů a geny podílející se na

produkcí opinů sloužících jako energetický zdroj agrobakterií. Mimo oblast T-DNA se pak na Ti-plazmidu nachází geny virulence (*vir*). Tyto *vir* geny jsou organizovány do několika operonů (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF*, *virG* a *virH*) a jsou nezbytné pro přenos T-DNA do genomu hostitelské buňky. Kompletní mechanismus přenosu T-DNA z *A. tumefaciens* do hostitelských buněk je složen z několika kroků, které zahrnují bakteriální kolonizaci, indukci bakteriálních genů virulence, vytvoření komplexu pro přenos T-DNA a následně samotný transfer a integraci T-DNA do rostlinného genomu (Zupan *et al.*, 2000; Barampuram a Zhang, 2011; Keshavareddy *et al.*, 2018).

Kolonizace a proces přenosu T-DNA je zahájen po přijetí specifických signálů, v podobě fenolických látek vylučovaných poraněnou hostitelskou rostlinou. Receptorem pro rozpoznání fenolických látek je protein VirA, jehož autofosforylace následně vede k fosforylaci a aktivaci proteinu VirG. Takto aktivovaný VirG indukuje expresi všech *Vir* genů a produkci *Vir* proteinů. Proteiny VirD1 a VirD2 jsou endonukleázy vyštěpující jednovláknovou T-DNA z plazmidu, přičemž VirD2 zůstává navázán na 5'konci a obsahuje jádro-lokalizující sekvenci. Výsledná jednovláknová molekula T-DNA je spolu s několika dalšími virovými proteiny exportována do cytoplazmy hostitelské buňky sekrečním systémem typu 4 („SS4-channel“) tvořeným proteinovým komplexem VirD4 a VirB. V cytoplazmě hostitelské buňky se T-DNA pokryje proteiny VirE2, čímž se vytvoří tzv. T-komplex. VirE2 je jednovláknový protein, který funguje jako ochrana T-DNA před degradací endo- a exo-nukleázami, a obsahuje sekvenci pro jadernou lokalizaci. T-komplex je následně přenesen do jádra, kde dochází k odpojení *Vir* proteinů od T-DNA a ta se integruje do genomu hostitelské rostlinné buňky (Christie, 1997; Barampuram a Zhang, 2011).

Vzhledem k tomu, že Ti-plazmid se využívá jakožto biologický vektor pro genetickou transformaci rostlin, je charakterizace mechanismů řídících proces přenosu T-DNA velmi důležitá. Konstrukce transformačního vektoru je založena na původním Ti-plazmidu, z kterého jsou však odstraněny onkogeny a geny pro syntézu opinů. Mezi hraniční sekvence T-DNA je následně vložena cizí DNA, kterou chceme do rostlinného genomu integrovat. Pokrok v technikách molekulární biologie umožnil vývoj tzv. binárních a superbinárních vektorů, jejichž princip spočívá v rozdělení velkého Ti-plazmidu na dva menší. Klonovací plazmid obsahuje hraniční sekvence T-DNA, mezi nimi se nachází gen zájmu a selekční gen. Druhý plazmid, označovaný jako pomocný, pak nese *vir* geny potřebné pro zahájení infekce a přenos T-DNA. Tyto vektory byly využívány při transformaci jednoděložných rostlin, zejména pak agronomicky

významných obilovin. Jako cílový materiál pro transformaci zprostředkovanou *A. tumefaciens* lze použít různé explantáty, zahrnující embryonální kultury, zralá či nezralá zygotická embrya, meristémy, stonkové apexy, děložní i pravé listy, kořeny, segmenty stonků i kalusové suspenzní kultury. Po transformaci dochází k regeneraci celé rostliny prostřednictvím somatické embryogeneze či organogeneze v *in vitro* podmínkách (Hoekema *et al.*, 1983; Komari, 1990; Hiei *et al.*, 1994; Ishida *et al.*, 1996; Cheng *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 2004; Barampuram a Zhang, 2011).

2.4.2 Transformace metodou „gene-gun“

Transformace metodou „gene-gun“ (genové dělo), je někdy též označována jako biolostická, metoda bombardování částicemi či mikroprojektilový přenos DNA. Tato metoda byla vyvinuta v 80. letech minulého století, jakožto alternativa k transformaci zejména jednoděložných rostlin a rostlinných druhů odolných vůči *Agrobacterium* (Sanford *et al.*, 1987; 1990). Technika zahrnuje potažení mikronosičů, v podobě částic zlata, wolframu či platiny o průměru přibližně 0,6–3,0 μm , požadovanou DNA a jejich následné vystřelení vysokou rychlostí, tak aby pronikly do buňky v podstatě jakéhokoli organismu (Breitler *et al.*, 2002; Barampuram a Zhang, 2011; Rivera *et al.*, 2012).

Genové dělo je složeno z vysokotlaké a nízkotlaké vakuové komory, na jejichž rozhraní se nachází průtržný disk. Mikronosiče pokryté DNA jsou rovnoměrně rozprostřeny na makronosič, v podobě kruhové plastové fólie, a celá jednotka je pak umístěna pod průtržným diskem. Pod makronosičem se nachází stopovací síto, navržené tak, aby zadrželo makronosič a zároveň umožnilo mikronosičům projít do cílového pletiva. Postupným zvyšováním tlaku helia dochází k jeho hromadění za průtržným diskem, ten však při specifickém tlaku (od 450 do 2 200 psi) praskne a dojde k uvolnění rázové vlny helia, která tlačí makronosič, pokrytý mikronosiči dolů, směrem k stopovacímu sítu. Nárazem dochází k uvolnění mikročástic z plastové fólie, jejich průniku do cílového pletiva, uvolnění transgenů a jeho začlenění do chromozomální DNA hostitelské buňky. Celý proces musí být prováděn za sterilních podmínek, aby se zabránilo kontaminaci cílového pletiva během následné *in vitro* kultivace a regenerace. Typ a velikost mikronosičů ovlivňují hloubku průniku a stupeň poškození cílových buněk. Nejčastěji využívané jsou komerčně dostupné částice zlata, které jsou biologicky inertní. Požadovaný stupeň penetrace pak závisí na typu transformovaného pletiva, tloušťce buněčné stěny a hloubce vrstev cílových buněk. Všechny tyto parametry jsou

kontrolovány a musí být optimalizovány pro dané cílové pletivo (Taylor a Fauquet, 2002; Barampuram a Zhang, 2011; Rivera *et al.*, 2012).

Nejčastěji se pro produkci geneticky transformovaných rostlin využívají embryogenní buněčné kultury, embryogenní kalusy a meristematická pletiva. V případě transformace apikálních meristémů je však třeba vzít v úvahu fyziologický stav a stáří matečné rostliny. Existují také určité strategie pro zvýšení frekvence úspěšné transformace v podobě osmotického ošetření či částečného vysušení cílových buněk, před samotnou transformací. Metoda „gene-gun“ byla v tomto směru využita k produkci širokého spektra transgenních agronomicky významných plodin, včetně luštěnin a všech hlavních obilovin (Li *et al.*, 1993; Christou, 1995; Campbell *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2008; Kikkert *et al.*, 2004).

2.4.3 Transformace metodou elektroporace

Technika elektroporace byla původně vyvinuta pro transformaci protoplastů, lze ji však použít i pro intaktní rostlinné buňky a pletiva. Rostlinné buňky i DNA, která má být do buněk začleněna, jsou součástí roztoku vodného elektrolytu. Metoda elektroporace využívá silných pulzů elektrického pole, v jejichž důsledku dochází ke změně polaritě plazmatické membrány cílových buněk. Změna polaritě vyvolává zvýšenou tvorbu pórů a membrána se tak pro volnou DNA stává vysoce permeabilní. Nejčastěji se aplikuje jeden nebo více elektrických impulzů trvajících 10^{-6} až 10^{-2} s a napětí mezi 1,6–2,0 kV. Následně dochází k obnově buněčných membrán a izolaci transformovaných buněk (Weaver a Chizmadzhev, 1996; Rakoczy-Trojanowska, 2002; Barampuram a Zhang, 2011; Rivera *et al.*, 2012).

Elektroporace byla navržena jakožto levnější a jednodušší alternativa k metodě „gene-gun“. Její účinnost je však ovlivněna řadou faktorů, jako je tolerance buněk vůči membránové permeaci, forma a koncentrace DNA ale také typ, síla, délka a trvání samotného pulzu. Hlavní nevýhodu při stabilní transformaci rostlinných pletiv prostřednictvím elektroporace představuje buněčná stěna tvořící účinnou fyzickou bariéru. Při využití protoplastů, tedy buněk zbavených buněčné stěny, je transformace účinnější, problémem je však následná obtížná regenerace transformovaných protoplastů v celistvou rostlinu. Tato technika tak byla úspěšně použita pouze u několika rostlinných druhů (Shimamoto *et al.*, 1989; Kubinieć *et al.*, 1990; Salmenkallio-Marttila *et al.*, 1995; Weaver a Chizmadzhev, 1996; Rakoczy-Trojanowska, 2002; Barampuram a Zhang, 2011; Rivera *et al.*, 2012).

2.4.4. Transformace metodou mikroinjekce

Mikroinjekce je metoda transformace spočívající v přímém mechanickém zavedení DNA do jádra nebo cytoplazmy cílových buněk. Tato technika vyžaduje relativně drahé technické vybavení. Nejprve jsou buňky imobilizovány v agaru prostřednictvím pomocné přidržovací pipety a následně je do nich skleněnou mikrokapilární injekční pipetou aplikováno malé množství roztoku DNA. Celý proces je velmi přesný, probíhá pod mikroskopickou kontrolou a je tedy i velmi časově náročný. Injektované buňky nebo shluky buněk jsou následně kultivovány a regenerovány *in vitro*. Tato metoda je neúčinnější pro genetickou transformaci živočišných buněk, byla však úspěšně použita také u některých druhů rostlin, např. u tabáku, řepky, sóji či ječmene. Konečná transformační účinnost je však asi 10x nižší než u metody „gene-gun“ (Crossway *et al.*, 1986; Jones-Villeneuve *et al.*, 1995; Holm *et al.*, 2000; Barampuram a Zhang, 2011; Rivera *et al.*, 2012).

2.4.5 Transformace prostřednictvím PEG/lipozomů

Transformace prostřednictvím polyethylenglykolu (PEG) je metoda využívaná k transformaci protoplastů. Princip je podobný jako u metody elektroporace. Protoplasty a DNA, která má být do buněk začleněna jsou smíchány a permeace membrány je následně, namísto elektrickým pulzem, vyvolána přidavkem PEG. Tato metoda je jednoduchá a nevyžaduje žádné specializované zařízení. Její účinnost je však velice nízká a u transformovaných rostlin často dochází k somaklonálním variacím. I přes její značné nevýhody byla využita pro transformaci např. kukuřice, ječmene či bavlny (Sawahel, 2001; Daveya *et al.*, 2005; Barampuram a Zhang, 2011).

S transformací zprostředkovanou PEG úzce souvisí technika transformace zprostředkovaná lipozomy. Lipozomy jsou mikroskopické sférické vezikuly, tvořené lipidovou dvojvrstvou. Jsou kladně nabitě a mají tak přirozenou tendenci přitahovat záporně nabitou DNA a buněčnou membránu. DNA uzavřená v lipozomu, jakožto transportním systémem, vstupuje do protoplastů endocytózou. Obecně tento proces zahrnuje tři kroky: adhezi (přilnutí) lipozomu k povrchu protoplastu, fúzi (splnutí) lipozomu s membránou protoplastu a uvolnění DNA do cytosolu buňky. Uvolněná DNA se pak může volně integrovat do hostitelského genomu. Tato metoda je však velmi pracná a má velmi nízkou frekvenci účinnosti (Gad *et al.*, 1990; Wordragen *et al.*, 1997).

2.4.6 Transformace prostřednictvím vláken karbidu křemíku

Transformaci pomocí vláken karbidu křemíku (SCMT; „silicon carbide-mediated transformation“) poprvé představili Kaeppler *et al.* (1990) a jedná se o jednu z nejméně komplikovaných metod. Princip této metody spočívá ve smíchání malých vláken karbidu křemíku s rostlinnými buňkami a požadovanou DNA. Směs se následně vortexuje, přičemž vlákna propichují buňky a umožňují tak vstup DNA. Nejčastěji se využívají vlákna o průměru 0,6 mm a délce 10-80 mm vykazující vysokou odolnost vůči rozpínavosti. Tato metoda transformace je jednoduchá, časově nenáročná a levná. Její účinnost je ovlivněna řadou faktorů v podobě velikosti použitých vláken a typu rostlinného materiálu, tvaru vortexovací nádoby i samotného procesu vortexování. Technika SCMT je aplikovatelná na různé typy buněk, u rostlin byla použita k transformaci např. rýže, pšenice, kukuřice či tabáku. Vlákna karbidu křemíku lze využít také v kombinaci s transformací prostřednictvím *A. tumefaciens*, ke zvýšení její účinnosti. SCMT má však i řadu nevýhod. Mezi hlavní problémy řadíme nízkou efektivitu transformace, poškození buněk, a tedy i snížení jejich následné regenerační schopnosti. Pokud není metoda prováděna správně, může docházet k vdechování vláken a její využití tak představuje vážné zdravotní riziko (Vaughan *et al.*, 1991; Kaeppler *et al.*, 1992; Frame *et al.*, 1994; Nagatani *et al.*, 1997; Singh a Chawla, 1999; Barampuram a Zhang, 2011).

2.4.7 Transformace *Medicago sativa*

Zlepšení výnosu vojtěšky pouze prostřednictvím tradičních šlechtitelských metod je poměrně omezené. Produkce biomasy je u vojtěšky vysoká, je však ovlivňována řadou faktorů, jako je prostředí, vegetační období či genetik rostlin. I proto mají technologie transformace rostlin vysoký potenciál, jak při zlepšování agronomických vlastností, jako je výnos a kvalita píce či odolnost vůči biotickým a abiotickým stresům, tak i při možném využití vojtěšky k produkci rekombinantních proteinů. Pro transformaci *M. sativa* se v některých případech využívá technika „gene-gun“ či elektroporace. Nejúčinnější metodou pro získání stabilních transgenních rostlin *M. sativa* však zůstává transformace zprostředkovaná bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* (Volenc *et al.*, 2002; Lamb *et al.*, 2006; Stefanova *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2018; Tichá *et al.*, 2020).

Transformaci *M. sativa* pomocí *A. tumefaciens* bylo např. prokázáno, že zvýšená exprese genu *MsmiR156* (MicroRNA156) u *M. sativa* zpomaluje kvetení, zvyšuje frekvenci větvení výhonků a produkci biomasy a zároveň vede k významnému snížení

ligninu a zvýšení obsahu celulózy. Obdobný vliv na zvýšení biomasy u *M. sativa* má také nadexprese genu *LjmiR156* (prekurzor miR156 z *Lotus japonicus*). Tyto transgenní rostliny *M. sativa* pak vykazují zvýšený obsah škrobu, flavonoidů a fenolů a jsou tak agronomicky významnější (Aung *et al.*, 2015a, 2015b, 2017).

Podstatný vliv na správný vývoj a zlepšení nejen agronomických vlastností, mají také změny vyvolané regulací některých vybraných MAPK. Cílenou regulací úrovně exprese proteinu SIMKK a s ním spojeného SIMK bylo prokázáno, že u rostlin se sníženou produkcí těchto proteinů dochází k zpomalení růstu, a tedy i k nižší produkci biomasy, transgenní rostliny se vyznačují také kratšími kořenovými vlásky, čímž je snížena kapacita pro vytváření infekčních vláken a kořenových hlízek (proces nodulace) při infekci půdními bakteriemi *Sinorhizobium meliloti*. Naproti tomu, nadexprese proteinu SIMK vede u rostlin k opačnému fenotypovému projevu, tedy k podpoře růstu nadzemní části a zvýšení biomasy, podpoře růstu kořenových vlásků, procesu tvorby infekčních vláken a nodulace (Hrbáčková *et al.*, 2021; Ovečka *et al.*, 2022).

Snaha o využití *M. sativa* k produkci rekombinantních proteinů, enzymů a léčiv je ovlivněna řadou faktorů, z nichž nejvíce limitujícím je jejich nízká úroveň akumulace. Rekombinantní proteiny jsou ve vojtěšce obvykle exprimovány v orgánech vykazujících vysokou biomasu, jako jsou listy a stonky. Vegetativní orgány a pletiva však nejsou přirozenými rezervoáry pro akumulaci proteinů, a nové proteiny tak často podléhají degradaci rostlinnými regulačními enzymy. Přirozeným místem akumulace proteinů jsou semena, avšak koncentrace a obsah proteinů v semenech *M. sativa* je přirozeně už tak velmi vysoký. Navíc, vzhledem k cizosprašnosti, potřebuje vojtěška k produkci semen speciální opylovače, jako např. včely či čmeláky, jejich využití však není vždy možné (Arcalis *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

P 0.45 PVDF Blotting Membrane Amersham™ Hybond™ (GE Healthcare Life science), bakteriologický filtr s póry o velikosti 0,22 μm, filtrační papír, chirurgická páska, oboustranná lepicí páska, Parafilm, kádinky, odměrné válce, magnetická míchadla, mikrotitrační destičky, pinzety, skalpel, nůžky, Pasteurovy pipety, automatické pipety, sterilní špičky, sterilní párátko, zkumavky typu Falcon, mikrozukumavky typu Eppendorf, sterilní Petriho misky, plastové boxy, hliníková fólie, PVDC fólie, skla na přípravu gelů

3.1.1 Použité chemikálie

1000x Gamborg's vitamin (Duchefa Biochemie)

1000x Nitsch and Nitsch vitamin solution (Duchefa Biochemie)

100x Schenk and Hildebrandt vitamin solution (Duchefa Biochemie)

2,2',2'',2'''-(ethan-1,2-diylidinitrilo)tetraoctová kyselina pH 8 (EDTA, PanReac AppliChem)

2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin]ethansulfonová kyselina (HEPES, Duchefa Biochemie)

2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina (Duchefa Biochemie)

2-Merkaptoethanol (Sigma-Aldrich)

4x Laemmli vzorkovací pufr (Bio-Rad)

Adenin (Sigma-Aldrich)

BSA (hovězí sérový albumin; Sigma-Aldrich)

Clarity™ Western ECL Substrate: Peroxide reagent a Luminol/enhancer reagent (Bio-Rad)

cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)

Destilovaná voda

Dihydrát hydrogenfosforečnanu disodného (Sigma-Aldrich)

Dihydrát molybdenanu sodného (Sigma-Aldrich)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich)

Dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich)

Dodecylsírán sodný (SDS, Sigma-Aldrich)

Dusičnan draselný (Sigma-Aldrich)

Ethanol denaturovaný (96%, PENTA)
Ethylenglykol-bis (2-aminoethylether) – N, N, N', N' tetraoctová kyselina (EGTA, Sigma-Aldrich)
Fluorid sodný (Sigma-Aldrich)
Gamborg's B5 basal salt mixture (Duchefa Biochemie)
Gellan gum powder (Alfa Aesar)
Glycerol (Sigma-Aldrich)
Glycin (Sigma-Aldrich)
Heptahydrát síranu hořečnatého (Sigma-Aldrich)
Hydroxid draselný (Sigma-Aldrich)
Hydroxid sodný (Sigma-Aldrich)
Chlorid hořečnatý (Sigma-Aldrich)
Chlornan sodný (Sigma-Aldrich)
Incidur (Ecolab)
Kinetin (Duchefa Biochemie)
Kyselina 2,4-dichlorofenoxyoctová (2,4-D) (Duchefa Biochemie)
Kyselina chlorovodíková (37%, Sigma-Aldrich)
LB broth (MO BIO laboratories)
Ledová kyselina octová (34%, Sigma-Aldrich)
L-Glutamin (Duchefa Biochemie)
L-glutathion (Sigma-Aldrich)
L-Prolin (Sigma-Aldrich)
L-Serin (Sigma-Aldrich)
MES (Duchefa Biochemie)
Methanol (Sigma-Aldrich)
Monosulfát kanamycinu (Duchefa Biochemie)
Murashige and Skoog basal salt mixture (Duchefa Biochemie)
Myoinositol (Duchefa Biochemie)
MilliQ voda
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED, Sigma-Aldrich)
Phyto agar (Duchefa Biochemie)
Pentahydrát dihydrochlorid spectinomycinu (Duchefa Biochemie)
Pentahydrát síranu měďnatého (Duchefa Biochemie)
Peroxodisíran amonný (APS, Sigma-Aldrich)

PhosSTOP (Roche)
Phyto agar (Duchefa Biochemie)
Ponceau S (Sigma-Aldrich)
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-Rad)
Protein Assay Dye Reagent Concentrate 5x (Bio-Rad)
Rifampicin (Duchefa Biochemie)
Sacharosa (Sigma-Aldrich)
Schenk and Hildebrant basal salt mixture (Duchefa Biochemie)
Sušené mléko (Carl-Roth)
TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Solutions (Bio-Rad)
Tikarcilin (Duchefa Biochemie)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich)
Tween ® 20 (Sigma-Aldrich)
Vodovodní voda

3.1.2 Použité protilátky

Primární afinitně izolovaná králičí polyklonální protilátka anti-AtMPK6 (Sigma-Aldrich)
Primární králičí monoklonální protilátka anti-tagRFP (Evrogen)
Primární králičí monoklonální protilátka anti-tubulin α (Agrisera)
Primární myší monoklonální protilátka anti-actin (Sigma-Aldrich)
Primární myší monoklonální protilátka anti-GFP (Sigma-Aldrich)
Sekundární kozí anti-myší protilátka s navázanou křenovou peroxidasou (Horseradish peroxidase-linked IgG, Invitrogen)
Sekundární kozí anti-králičí protilátka s navázanou křenovou peroxidasou (Horseradish peroxidase-linked IgG, Invitrogen)

3.1.3 Roztoky a média

Sterilizační roztok na sterilizaci listů *M. sativa*:

- 70% ethanol
- 10 μ l Tween + 10 ml MilliQ H₂O
- 5 μ l Tween + 1 ml chlornan sodný + 9 ml MilliQ H₂O
- Sterilizace bakteriologickým filtrem s póry o velikosti 0,22 μ m

B5H médium

- 3,1 g·l⁻¹ Gamborg's B5 basal salt mixture
- 0,5 g·l⁻¹ prolin

- 0,5 g·l⁻¹ KNO₃
- 0,25 g·l⁻¹ MgSO₄·7H₂O
- 30 g·l⁻¹ sacharosa
- 4,5 g·l⁻¹ Gellan gum/10 g·l⁻¹ phyto agar
- Doplnění MilliQ H₂O
- Úprava pH na 5,7 (1M KOH)
- Sterilizace autoklávkem
- Po autoklávkování – vychladnutí na přibližně 55 °C a následné přidání:
 - 30 ml·l⁻¹ směsi aminokyselin
 - 1 ml·l⁻¹ 2,4-D (1,0 mg·l⁻¹)
 - 1 ml·l⁻¹ kinetin (0,1 mg·l⁻¹)
 - 1 ml·l⁻¹ 1000X Gamborg's vitamin (0,112 g/1 ml MilliQ H₂O)

Směs aminokyselin:

- 6,65 g glutamin
- 0,83 g serin
- 0,004 g adenin
- 0,083 g L-glutathion
- Doplnění MilliQ H₂O do 250 ml
- Sterilizace bakteriologickým filtrem s póry o velikosti 0,22 μm
- Uchování při 4 °C

Roztok 2,4-D (1,0 mg·ml⁻¹):

- Rozpuštění 50 mg 2,4-D v 5 ml 1M NaOH
- Doplnění do 50 ml MilliQ H₂O
- Sterilizace bakteriologickým filtrem s póry o velikosti 0,22 μm
- Uchování při -20 °C

Roztok kinetinu (0,1 mg·ml⁻¹):

- Rozpuštění 10 mg kinetinu v 0,1 ml 0,1M NaOH
- Doplnění do 10 ml MilliQ H₂O
- Sterilizace bakteriologickým filtrem s póry o velikosti 0,22 μm
- Uchování při -20 °C

B50 médium

- 3,1 g·l⁻¹ Gamborg's B5 basal salt mixture
- 0,5 g·l⁻¹ prolin
- 0,5 g·l⁻¹ KNO₃

- 0,25 g·l⁻¹ MgSO₄·7H₂O
- 30 g·l⁻¹ sacharosa
- 4,5 g·l⁻¹ Gellan gum/10 g·l⁻¹ phyto agar
- Doplnění MilliQ H₂O
- Úprava pH na 5,7 (1M KOH)
- Sterilizace autoklávem
- Po autoklávování – vychladnutí na přibližně 55 °C a následné přidání:
 - 30 ml·l⁻¹ směsi aminokyselin
 - 1 ml·l⁻¹ 1000X Gamborg's vitamin

MMS médium

- 4,3 g·l⁻¹ Murashige and Skoog médium-Basal salt mixture
- 0,1 g·l⁻¹ myoinositol
- 30 g·l⁻¹ sacharosa
- 4,5 g·l⁻¹ Gellan gum/10 g·l⁻¹ phyto agar
- Doplnění MilliQ H₂O
- Úprava pH na 5,7 (1M KOH)
- Sterilizace autoklávem
- Po autoklávování – vychladnutí na přibližně 55 °C a následné přidání:
 - 1 ml·l⁻¹ 1000x Nitsch and Nitsch vitamin solution (0,109 g/1 ml MilliQ H₂O)

Pevné MS médium

- 4,3 g·l⁻¹ Murashige and Skoog médium-Basal salt mixture
- 30 g·l⁻¹ sacharosa
- 4,5 g·l⁻¹ Gellan gum/10 g·l⁻¹ phyto agar
- Doplnění MilliQ H₂O
- Úprava pH na 5,7 (1M KOH)
- Sterilizace autoklávem

Tekuté MS médium

- 4,3 g·l⁻¹ Murashige and Skoog médium-Basal salt mixture
- 30 g·l⁻¹ sacharosa
- Doplnění MilliQ H₂O
- Úprava pH na 5,7 (1M KOH)
- Sterilizace autoklávem

Pevné ½ MS médium

- 2,15 g·l⁻¹ Murashige and Skoog médium-Basal salt mixture
- 1 g MES
- 10 g·l⁻¹ sacharosa
- 4,5 g·l⁻¹ Gellan gum
- Doplnění MilliQ H₂O
- Úprava pH na 5,7 (1M KOH)
- Sterilizace autoklávem

LB médium

- 25 g·l⁻¹ LB broth
- Úprava pH na 7,2 (1M KOH)
- Sterilizace autoklávem

SH médium

- 3,2 g·l⁻¹ Schenk and Hildebrant basal salt mixture
- 0,5 g·l⁻¹ MES
- 30 g·l⁻¹ sacharosa
- Úprava pH na 5,7 (1M KOH)
- Sterilizace autoklávem
- Po autoklárování – vychladnutí na přibližně 55 °C a následné přidání:
 - 10 ml·l⁻¹ 100X Schenk and Hildebrant vitamin solution (1 g/10 ml MiliQ H₂O)

Extrakční pufr E (100 ml)

- 1,19 g HEPES, úprava pH na 7,5 (NaOH)
- 0,43 g NaCl
- 38 mg EGTA
- 100 µl 1M MgCl₂
- 4 mg NaF
- 10 ml 10% glycerol
- Doplnění MiliQ H₂O
- Sterilizace bakteriologickým filtrem s póry o velikosti 0,22 µm
- Uchování při -20 °C

Kompletní extrakční pufr (EB), těsně před použitím přidání (na 1ml E):

- 1 μl 1M DTT ($0,154 \text{ g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)
- 20 μl Complete™
- 100 μl PhoStop™

Running pufr (RB)

- 30 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris
- 144 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Glycin
- 10 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ SDS
- Doplnění MilliQ H₂O

Pracovní RB

- 100 ml RB
- 900 ml MilliQ H₂O

Transfer pufr 10x (TB)

- 30 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris
- 144 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Glycin
- Doplnění MilliQ H₂O

Pracovní TB

- 100 ml 10x TB
- 100 ml 100% methanol
- 800 ml MilliQ H₂O

Tris buffered saline 10x (TBS)

- 24,2 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris
- 87,8 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl
- Doplnění MilliQ H₂O
- Úprava pH na 7,4 (koncentrovaná HCl)

Pracovní TBS-T pufr

- 100 ml TBS
- 1 ml Tween 20
- 900 ml MilliQ H₂O

Ponceau S barvicí roztok

- 1 g Ponceau S
- 50 ml kyselina octová
- 950 ml MilliQ H₂O

3.1.4 Použité přístroje

Analytické váhy (XA 110/2X, RADWAG)

Aparatura na výrobu gelů (Bio-Rad)

Aparatura na SDS-PAGE (Bio-Rad)

Aparatura na Western blot (Bio-Rad)

Autokláv – parní sterilizátor (Stervap, MMM Group)

Box laminární Biohazard (Merci)

Centrifuga stolní chlazená ScanSpeed 1730 MR (LaboGene)

Dokumentační systém ChemiDoc™ MP (Bio-Rad)

Elektromagnetická míchačka IKA Combimag REO (Drehzahl Electronic)

Fytotronová komora (Weiss Gallenkamp)

Chlazená centrifuga Allegra (Beckman Coulter)

Inkubátor s nastavitelnou teplotou (Mettler)

Laboratorní digestoř (M 1200, MERCI)

Laboratorní chladnička LIE LCV 4010 (Schoeller)

Laboratorní váhy S1502 (BEL Engineering)

Mikrocentrifuga s vortexem FVL-2400N (BioSan)

Mikrovlnná trouba MHE21 (HITACHI)

Mraznička LIE G 5216 513L (Comfort)

Napěťový a proudový zdroj Bio-Rad Power Pac™ Basic (Bio-Rad)

pH metr PC 2700 (Eutech Instruments)

Skener (Image Scanner III)

Spektrofotometer (Smart Spec™ plus, Bio-Rad)

Termoblok ThermoStat C (Eppendorf)

Třepačka s inkubací ES-20 (Biosan)

Vortex Genie - 2 (Scientific Industries)

Výrobník deionizované vody Simplicity water purification system (Millipore)

Fluorescenční stereomikroskop (Axio Zoom.V16, Carl Zeiss)

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

3.1.5 Software pro zpracování výsledků

Excel 365 (Microsoft Office)

i-control 2.0TM Microplate Reader Software (Tecan)

ImageJ (NIH)

ImageLab (Bio-Rad)

PowerPoint 365 (Microsoft Office)

Zen Blue 2014 ver. 3.2 (Carl Zeiss)

Zen Black 2.3 PS1

3.1.6 Rostlinný materiál

Medicago sativa L. divoký typ, kultivar Regen SY

Medicago sativa L. transgenní linie:

- *SIMKK-RNAi* (Bekešová *et al.*, 2015; Hrbáčková *et al.*, 2021)
- GFP-FABD2 (Ovečka *et al.*, 2022)
- tagRFP-TUA6 (poskytla Mgr. Michaela Tichá, Ph.D.)

Medicago sativa L. dvojité transgenní linie:

- *SIMKK-RNAi* v tagRFP-TUA6 (v práci uváděna jako *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6})
- *SIMKK-RNAi* v GFP-FABD2 (v práci uváděna jako *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2})

Arabidopsis thaliana L. transgenní linie *pMAT*, stabilně produkující protein GFP (*35S::sGFP*)

Nové dvojité transgenní linie byly připraveny stabilní transformací listových explantátů odebraných z rostlin *M. sativa* transgenních linií tagRFP-TUA6 a GFP-FABD2 prostřednictvím bakterií *A. tumefaciens* (Bekešová *et al.*, 2015). Rostliny sloužící jako kontrola (kultivar Regen-SY, transgenní linie tagRFP-TUA6, GFP-FABD2 a *SIMKK-RNAi*) i rostliny po transformaci byly regenerovány procesem somatické embryogeneze a dále kultivovány ve fytotronu při teplotě 24 °C, intenzitě světla 60–80 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, relativní vlhkosti 70 % a fotoperiodě 16 hodin světlo, 8 hodin tma.

3.1.7 Bakteriální materiál

Agrobacterium tumefaciens kmen GV3101 nesoucí konstrukt pHellsgate12 SIMKKi

3.2 Metody

3.2.1 Příprava B5H média

B5H médium je kultivační médium s obsahem přidaných rostlinných hormonů, které slouží k vyvolání kalogeneze. Jednotlivé explantáty se na tomto médiu kultivují po dobu asi tří týdnů.

V jedné laboratorní kádince s MilliQ vodou byla smíchána směs Gamborg's B5 basal salt mixture spolu s prolinem, následně byl přidán KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, sacharosa a nakonec Gellan gum, jakožto ztužovací složka. Směs byla přelita do odměrného válce a objem byl MilliQ vodou doplněn na 1 l. Za stálého míchání na elektromagnetické míchače bylo pomocí 1M KOH upraveno pH na 5,7. Médium bylo po 500 ml rozlito do dvou uzavíratelných skleněných lahví o objemu 1 l a sterilizováno v autoklávu. Po sterilizaci a vychladnutí média na asi 55 °C byla v sterilním laminárním boxu přidána do objemu 500 ml směs aminokyselin, hormony (kinetin a 2,4-D) a vitamíny (1000X Gamborg's vitamin). Médium bylo následně rovnoměrně rozlito do 33 kulatých Petriho misek a volně ochlazeno na laboratorní teplotu. Veškeré roztoky přidávané do média po autoklávování byly předem sterilizovány přes sterilní membránové filtry.

3.2.2 Příprava B50 média

B50 médium je kultivační médium bez obsahu přidaných rostlinných hormonů, které slouží k indukci embryogenního kalusu a následné tvorbě somatických embryí. Ta nastává po asi 2–3 týdnech kultivace.

Do jedné laboratorní kádinky s MilliQ vodou byla přidána směs Gamborg's B5 basal salt mixture spolu s prolinem, dále byl přidán KNO_3 a $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, sacharosa a nakonec Gellan gum, jakožto ztužovací složka. Připravená směs byla přelita do odměrného válce a objem byl doplněn MilliQ vodou na 1 l. Za stálého míchání na elektromagnetické míchače bylo pomocí 1M KOH upraveno pH na 5,7. Médium bylo po 500 ml rozlito do dvou uzavíratelných skleněných lahví o objemu 1 l a sterilizováno v autoklávu. Po sterilizaci a vychladnutí média na asi 55 °C byla v sterilním laminárním boxu přidána do objemu 500 ml směs aminokyselin a vitamíny (1000X Gamborg's vitamin). Hotové médium bylo rovnoměrně rozlito do 33 kulatých Petriho misek a volně ochlazeno na laboratorní teplotu. Veškeré roztoky přidávané do média po autoklávování byly předem sterilizovány přes sterilní membránové filtry.

3.2.3 Příprava MMS média

MMS médium je kultivační médium potřebné k správnému vývoji somatických embryí, a k vývoji kořenů a výhonků vzniklých rostlin. Somatická embrya se na MMS médiu kultivují opět po dobu asi 3 týdnů.

V jedné laboratorní kádince s MilliQ vodou byla smíchána směs MS basal salt mixture, myoinositol, sacharosa a poté byly přidán Gellan gum, jakožto ztužovací složka. Následně byla směs přelita do odměrného válce a objem byl doplněn MilliQ vodou na 1 l. Za stálého míchání na elektromagnetické míchače bylo pomocí 1M KOH upraveno pH na 5,7. Takto připravené médium bylo po 500 ml rozlito do dvou uzavíratelných skleněných lahví o objemu 1 l a sterilizováno v autoklávu. Po sterilizaci a vychladnutí média na asi 55 °C byla v sterilním laminárním boxu přidána do objemu 500 ml směs vitamínů (1000x Nitsch and Nitsch vitamin solution), předem vysterilizována přes sterilní membránový filtr. Médium bylo následně rovnoměrně rozlito do 14 hranatých Petriho misek a volně ochlazen na laboratorní teplotu.

3.2.4 Příprava MS média

MS médium je kultivační médium, které slouží k dokončení správného vývoje mladých rostlin a k jejich udržování v *in vitro* podmínkách.

Do jedné kádinky s MilliQ vodou byla postupně přidána směs MS basal salt mixture, sacharosa a nakonec Gellan gum. Směs byla přelita do odměrného válce a objem doplněn MilliQ vodou na 1 l. Za stálého míchání na elektromagnetické míchače bylo pomocí 1M KOH upraveno pH na 5,7. Médium bylo po 500 ml rozlito do dvou uzavíratelných skleněných lahví o objemu 1 l a sterilizováno v autoklávu. Po sterilizaci a vychladnutí připraveného média na asi 55 °C bylo ve sterilním laminárním boxu rovnoměrně rozlito do 14 hranatých Petriho misek nebo 6 plastových krabiček a volně ochlazen na laboratorní teplotu.

3.2.5 Příprava bakterií *Agrobacterium tumefaciens*

Bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, kmen GV3101 nesoucí konstrukt pHellsgate12 SIMKKi, byly v objemu 30 μ l odebrány ze zmrzlého glycerolového roztoku a přeneseny do 10 ml LB média se selekčními antibiotiky (spectinomycin – 100 μ g·ml⁻¹, rifampicin – 100 μ g·ml⁻¹) v 50 ml zkumavce typu Falcon. Suspenze byla ponechána v inkubátoru ve tmě, přibližně 24 hodin při 180 otáčkách za minutu a teplotě 28 °C, do dosažení optické hustoty (OD₆₀₀) mezi 0,6–0,8. Optická hustota byla pravidelně kontrolována na spektrofotometru. Jako kontrolní vzorek (blank) bylo použito sterilní LB

médium se selekčními antibiotiky. Následně byly buňky od média separovány centrifugací po dobu 10 minut, při 3000 g a 21 °C. Supernatant byl odlit do odpadu a bakteriální buňky byly resuspendovány v čistém LB médiu pro dosažení optické hustoty $OD_{600} = 0,7$.

3.2.6 Povrchová sterilizace listů

Zdravé zelené a nepoškozené listy byly odebrány přibližně ze střední části rostliny *M. sativa*, kultivaru Regen-SY a transgenních linií *SIMKK-RNAi*, GFP-FABD2 a tagRFP-TUA6. Jednotlivé listy byly vloženy do 50ml zkumavky typu Falcon naplněné vodou z vodovodního řádu o laboratorní teplotě a přeneseny do laminárního boxu. Zde následovala sterilizace listů 70% ethanolem po dobu 10 vteřin, následně se listy přenesly do 0,1% roztoku Tween v MilliQ vodě a byly protřepávány po dobu 10 min. V třetím kroku sterilizace byly listy vloženy do 50 ml zkumavky typu Falcon obsahující sterilní MilliQ vodu, 1% chlornan sodný a 0,05% Tween a protřepávány 1,5 minuty. Nakonec byly listy 3x promyty sterilní MilliQ vodou, přeneseny na sterilní filtrační papír a sterilním skalpelem v půlce rozříznuty a lehce poškozeny. Listy transgenních linií tagRFP-TUA6 a GFP-FABD2 určené k transformaci byly ihned vloženy do 12 ml SH média. Jednotlivé části listů rostlin, sloužících jako kontrola (kultivar Regen-SY a transgenní linie *SIMKK-RNAi*, tagRFP-TUA6 a GFP-FABD2) byly přeneseny na B5H médium v kulatých Petriho miskách a dále regenerovány procesem somatické embryogeneze, vždy na médiích bez přídavku selekčních antibiotik.

3.2.6 Transformace listových explantátů *Medicago sativa*

K listovým explantátům v 50 ml zkumavce typu Falcon s SH médiem byly přidány 3 ml kultury *Agrobacterium tumefaciens*. Explantáty spolu s bakteriální kulturou byly promíchány jemným kývavým pohybem a ponechány 30 min v klidu ve tmě. Poté byly inokulované listové explantáty přeneseny na sterilní filtrační papír, osušeny od zbytku média a umístěny na B5H médium. Kulaté Petriho misky s explantáty a bakteriemi byly překryty filtračním papírem, pro snížení intenzity světla na cca $30 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ a kultivovány ve fytotronu při teplotě 24 °C, relativní vlhkosti 70 % a fotoperiodě 16 hodin světlo, 8 hodin tma. Po sedmi dnech od inokulace byly explantáty odděleny od bakteriální kultury volným protažením skrz médium a následně 5x promyty sterilní MilliQ vodou. Explantáty z každé jedné Petriho misky byly promývány zvlášť, aby se zabránilo rozšíření případné kontaminace.

3.2.7 Regenerace rostlin procesem somatické embryogeneze

Promyté listové explantáty byly po osušení na sterilním filtračním papíře přeneseny na B5H médium s přidanými selekčními antibiotiky (ticarcilin – 500 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, kanamycin – 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Jednotlivé Petriho misky byly označeny a kultivovány ve fytotronu při teplotě 24 °C, relativní vlhkosti 70 %, intenzitě světla 60–80 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a fotoperiodě 16 hodin světlo, 8 hodin tma po dobu tří až čtyř týdnů pro indukci kalusu (kalogeneze). Jednotlivé správně vyvinuté kalusy byly následně přeneseny na B50 médium se selekčními antibiotiky a kultivovány po dobu dalších tří týdnů pro indukci embryogenního kalusu a tvorbu somatických embryí. Plně vyvinutá somatická embrya byla přenesena a 3 týdny kultivována na MMS médiu se selekčními antibiotiky k správnému formování a vývoji výhonků a kořenů. Nakonec byly jednotlivé mladé rostlinky vyvinuté ze somatických embryí číselně označeny, přeneseny a udržovány na MS médiu v podmínkách *in vitro*. Jednotlivá stádia procesu transformace a somatické embryogeneze byla postupně snímána na kulatých Petriho miskách pomocí Zoom stereomikroskopu a takto získané snímky byly dále zpracovány v programu Zen Blue 3.2 a Microsoft Power Point 365. Rostliny na hranatých Petriho miskách byly snímány pomocí skeneru Image Scanner III.

3.2.8 Výsev semen *Arabidopsis thaliana pMAT*

Sterilní semena *A. thaliana pMAT* byla ve sterilním laminárním boxu přenesena pomocí sterilního párátko na povrch ½ MS média v hranatých Petriho miskách. Přes noc byly misky uloženy při 4 °C v lednici v horizontální poloze, pro synchronizaci klíčení semen a překonání dormace, a na druhý den přeneseny do fytotronu a uloženy vertikálně. Rostliny byly kultivovány při teplotě 24 °C, intenzitě světla 60–80 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, relativní vlhkosti 70 % a fotoperiodě 16 hodin světlo, 8 hodin tma po dobu 2 týdnů.

3.2.9 Odběr a homogenizace vzorků

Z každé označené rostliny po transformaci a všech rostlin sloužících jako kontroly bylo ve sterilním laminárním boxu odebráno 6–9 listů a vloženo do třecí misky. Pomocí tloučku a tekutého dusíku byly listy rozdrceny na jemný prášek, a ten byl následně přenesen do předem vychlazené a označené 2ml mikrozkušavky typu Eppendorf. Z transgenních rostlin *A. thaliana pMAT* byly zvlášť odebrány kořeny a nadzemní část. Mikrozkušavky s odebranými vzorky byly ihned zmrazeny v tekutém dusíku a uloženy na -80 °C. Po homogenizaci každého vzorku byly veškeré použité nástroje očištěny 96% ethanolem.

3.2.10 Extrakce proteinů

Vzorky po homogenizaci byly extrahovány v kompletním extrakčním pufru (EB). Těsně před použitím, bylo do předem připraveného extrakčního pufru (E), přidáno činidlo DTT, pro redukci a rozrušení disulfidických vazeb, inhibitor proteas cOmplete™ a inhibitor fosfatas PhosSTOP™. Homogenizované vzorky v označených mikrozkuvkách byly předem zváženy na analytických vahách a následně vloženy do ledu. Ke každému vzorku bylo přidáno příslušné množství kompletního EB, v poměru 200 μ l EB na 100 mg vzorku. Mikrozkuvky obsahující vzniklou směs byly vortexovány, uloženy do ledu a ponechány 30 min extrahovat. Během extrakce byla směs vždy 3x protřepána. V mezičase byla centrifuga předchlazena na 4 °C a následně byly vzorky v mikrozkuvkách centrifugovány při 13 000 g po dobu 20 minut. Poté byl vzniklý supernatant přenesen pipetou se sterilní špičkou do čisté a předem označené 2ml mikrozkuvky typu Eppendorf. Mikrozkuvky se supernatanty byly opět vloženy do centrifugy na 10 min při 13 000 g a 4 °C. Výsledný supernatant byl poté přepipetován do předem popsáných 0,6ml mikrozkuvek a uložen do ledu. V případě přítomnosti uvolněných pevných částic byl krok centrifugace zopakován.

3.2.11 Měření koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla měřena metodou dle Bradforda (Bradford, 1976). Pro měření byla využita čistá mikrotitrační destička s 96 jamkami. Nejprve byl připraven roztok činidla Protein Assay Dye Reagent Concentrate 5x, obsahující Coomassie Brilliant Blue G-250, a MilliQ vody v poměru 1:4. Do každé jamky, ve které bylo prováděno měření, bylo napipetováno 299 μ l připraveného roztoku a následně přidán 1 μ l vzorku v podobě proteinového extraktu. V případě blanku byl přidán 1 μ l EB. Obsah každé jamky byl důkladně promíchán pipetou se sterilní špičkou a inkubován při laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Absorbance byla měřena spektrofotometricky při 595 nm za pomoci softwaru i-control 2.0™. Každý vzorek byl měřen ve 3 technických opakováních a kvantifikace byla provedena pomocí kalibrační křivky. Pro sestavení kalibrační křivky byly použity roztoky BSA o známé koncentraci. Získaná data byla zpracována v programu Microsoft Excel 365.

3.2.12 Příprava vzorků pro nanesení na gel

Nejprve byl v digestoři připraven nanášecí pufr smícháním 4x Laemmlí pufru s 2-merkaptethanolem v poměru 9:1. Do předem označených čistých 1,5ml mikrozkuvek byl vždy pipetován extrakt proteinů a nanášecí pufr v poměru 3:1. Připravená směs byla

pečlivě promíchána na vortexu, vložena do termobloku a povařena při 95 °C po dobu 7 minut.

3.2.13 Příprava Bio-Rad TGX Stain-Free™ FastCast™ gelů

Před samotnou přípravou TGX Stain-Free™ FastCast™ gelů byla skla očištěna 96% ethanolem a složena do aparatury. Pro kontrolu dostatečného těsnění aparatury, byla do prostoru mezi skly nalita destilovaná voda a její hladina byla pozorována po dobu asi 5 minut. Pokud došlo k vytečení vody, byla celá aparatura rozebrána a opětovně sestavena. Následně byla voda odlita a prostor vysušen plynným dusíkem a kouskem filtračního papíru. Roztoky pro rozdělovací i zaostřovací gel byly připraveny pomocí soupravy TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, 10% dle pokynů výrobce (Tab. 1). Nejprve byl do prostoru mezi skla, cca 1,5 cm pod horní okraj, nanesen Pasteurovou pipetou roztok pro dělicí gel. Ihned poté byl zbývající prostor vyplněn roztokem gelu zaostřovacího a nahoru umístěn hřebínek pro vytvoření jamek. Polymerizace gelu trvala přibližně 30-45 minut.

Tab. 1: Příprava 1,5mm 10% Bio-Rad TGX Stain-Free™ FastCast™ gelu.

Separační gel (10 ml)		Zaostřovací gel (3 ml)	
Roztok separačního gelu A	5 ml	Roztok zaostřovacího gelu A	1,5 ml
Roztok separačního gelu B	5 ml	Roztok zaostřovacího gelu B	1,5 ml
TEMED	5 µl	TEMED	3 µl
APS 10%	50 µl	APS 10%	15 µl

3.2.14 Gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného

Po zatuhnutí gelu byla poskládána elektroforetická aparatura a umístěna do připravené vany. Aparatura i vana byly zality running bufrem po značící risku a z gelu byl odebrán hřebínek, tak aby došlo k zalití jednotlivých jamek. Do první jamky bylo napipetováno 5 µl proteinového standardu (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards). Do zbývajících jamek bylo nanášeno 30 µg proteinového vzorku. Následně byla aparatura připojena k elektrickému zdroji a proteiny byly separovány nejprve 15 minut při 100 V, a poté přibližně 50 minut při 150 V, v závislosti na molekulové hmotnosti hledaných proteinů. Gel byl zdokumentován pomocí dokumentačního přístroje ChemiDoc™ MP Imaging System s využitím protokolu pro Stain-Free gely a programu Image Lab, pro kontrolu nanášení jednotné koncentrace proteinů.

3.2.15 Přenos proteinů na membránu

Po dokončení elektroforetické separace byl proveden přenos separovaných proteinů na polyvinylidendifluoridovou (PVDF) membránu o velikosti 8,5 x 6 cm. Před přenosem byla membrána aktivována ve 100% methanolu (30 sekund), a poté inkubována v předem připraveném transfer pufru po dobu 10 minut. Do transfer pufru byly vloženy také dvě plastové houby, šest filtračních papírů a gel po separaci. Po inkubaci jednotlivých komponent byla sestavena kazeta určená pro přenos proteinů, v podobě zvlhčené plastové houby, tři filtračních papírů, gelu, membrány a opět tři filtračních papírů a plastové houby. Za pomoci plastového válečku byly odstraněny vzduchové bublinky a kazeta byla zajištěna proti otevření. Pečlivě složená kazeta byla vložena do aparatury a společně s chladicí vložkou umístěna do elektroforetické vany. Vana byla naplněna transfer pufrem po značící risku a umístěna do lednice. Přenos probíhal přes noc (17 hodin) při konstantním napětí 24 V, a poté ještě další hodinu při 80 V. Následně byla membrána na 10-15 sekund ponořena do barvicího roztoku 0,2% Ponceau S pro kontrolu přenosu a nanesení jednotné koncentrace proteinů. Nakonec byla membrána promyta a odbarvena třepáním v MilliQ vodě po dobu 3x5 min, a následně 2x10 min v TBS-T pufru.

3.2.16 Blokace nespecifických vazeb a aplikace protilátek

Po promytí a odbarvení byly membrány blokovány pro zabránění nespecifickému navázání primární protilátky. K blokaci byl použit roztok 4% BSA a 4% odtučněného sušeného mléka v TBS-T. V případě aplikace protilátky proti tubulinu α byl k blokaci použit roztok pouze 4% odtučněného sušeného mléka v TBS-T. Membrány byly blokovány v lednici po dobu 8 h za mírného pohybu třepání (5RPM). Následně byly 2x promyty roztokem TBS-T a inkubovány v roztoku s primární protilátkou na třepačce při pomalém pohybu třepání. Ředění a doba inkubace závisela na použité primární protilátce. Protilátka proti MPK6 byla ředěna 1:15000 v 4% roztoku BSA v TBS-T a inkubována přes noc při 4 °C. Protilátka proti tagRFP byla ředěna 1:2000 v roztoku 1% BSA a 1% mléka v TBS-T a inkubována přes noc při 4 °C. Protilátka proti tubulinu α byla ředěna 1:1000 v 1% roztoku mléka v TBS-T a inkubována přes noc při 4 °C. Protilátka proti GFP byla ředěna 1:1000 v 1% roztoku BSA v TBS-T a inkubována 1 h při laboratorní teplotě. Protilátka proti aktinu byla ředěna 1:5000 v 1% roztoku BSA v TBS-T a inkubována po dobu 2 h, opět při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl roztok primární protilátky odlit a membrány byly promyty 5x10 min v TBS-T na třepačce při rychlém pohybu třepání (40-50 RPM). Následně byl na membrány aplikován roztok sekundární

protilátky s konjugovanou křenovou peroxidasou. Sekundární protilátky byly ředěny 1:5000 v 2% roztoku BSA v TBS-T a inkubovány 1,5 h při laboratorní teplotě a za mírného pohybu třepání. Nakonec byly membrány rychlým pohybem třepání promyty roztokem TBS-T 3x8 minut.

3.2.17 Detekce proteinů

Pro detekci a vizualizaci značených proteinů byl použit komerční roztok Clarity Western ECL Substrate připravený dle pokynů výrobce. Roztok byl připravován vždy čerstvý a bezprostředně před detekcí. Membrána byla vložena do čisté hranaté plastové misky a ECL roztok byl pomocí Pasteurovy pipety nanesen na celý její povrch. Inkubace v roztoku probíhala 2 minuty a následně byla membrána umístěna na povrch skleněné desky dokumentačního přístroje Bio-Rad ChemiDoc™ MP. Membrána byla snímána s využitím protokolu „Chemi high sensitivity“ a „Colorimetric“ a získaný obrazový materiál byl zpracován a vyhodnocen v programech Image Lab a ImageJ. Veškerá data a z nich vytvořené grafy byla zpracována a vyhodnocena v programu Microsoft Excel 365.

3.2.18 Mikroskopická analýza struktury cytoskeletu

Doprostřed podložního skla bylo napipetováno 100 µl tekutého MS média. Do média byla následně položena odřezaná část kořene, explantát byl přeryt krycím sklem a médium bylo doplněno tak, aby došlo k úplnému naplnění vzniklé komůrky. Na přípravu a následnou stabilizaci preparátů byla využita oboustranná lepicí páska a parafilm. Pro mikroskopování byly použity kořeny vždy ze tří rostlin transgenní linie tagRFP-TUA6, s fluorescenčně značenými mikrotubuly pomocí translační fúze tagRFP s tubulinem α6, a transgenní linie GFP-FABD2 s fluorescenčně značeným aktinovým cytoskeletem, pomocí translační fúze GFP s aktin-vazebnou doménou 2 proteinu fimbrinu z *A. thaliana*, sloužících jako kontrola, a dvojitých transgenních linií *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6} (rostlina č. 1) a *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} (rostlina č. 4), rozmnožených procesem somatické embryogeneze. Snímky byly pořízeny pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu. Pro dokumentaci struktury, a uspořádání fluorescenčně značených mikrotubulů byl použit laser pro detekci mRFP (excitace 561 nm, emisní spektrum 582-690 nm). Pro dokumentaci struktury a dynamiky fluorescenčně značeného aktinu byl použit laser pro detekci GFP (excitace 488 nm, emisní spektrum 495-555 nm). Získané mikroskopické snímky byly dále zpracovány v programu Zen Blue 3.2, Zen Black 2.3 PS1 a Microsoft Power Point 365. Pro vyhodnocení dynamiky aktinu byl využit program ImageJ.

4. VÝSLEDKY

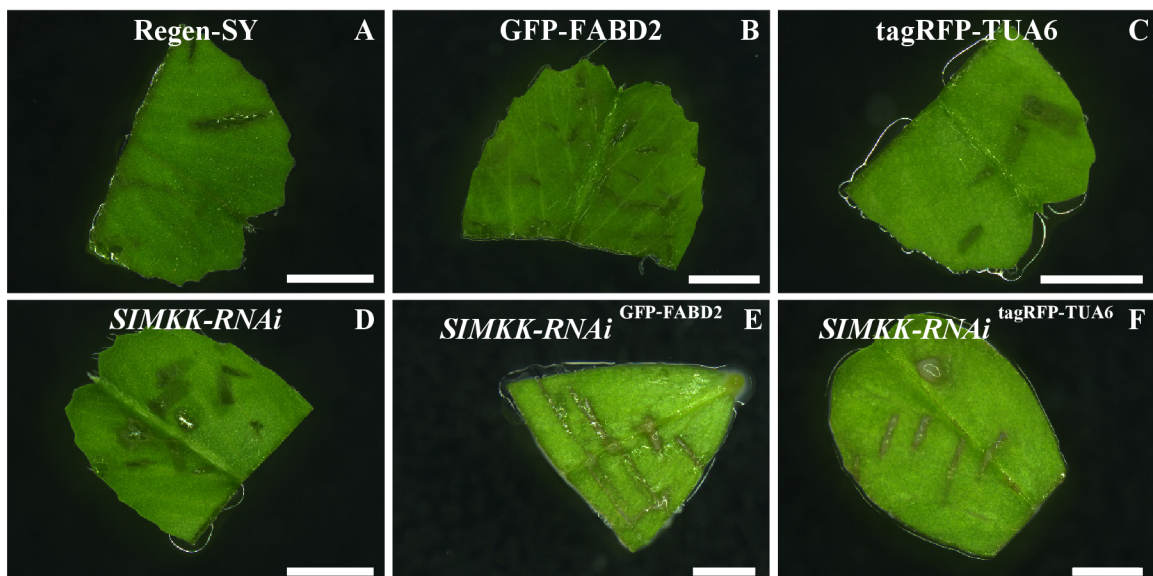
4.1. Transformace listových explantátů *Medicago sativa* ko-kultivací s *Agrobacterium tumefaciens*

4.1.1 Kultivace *Agrobacterium tumefaciens*

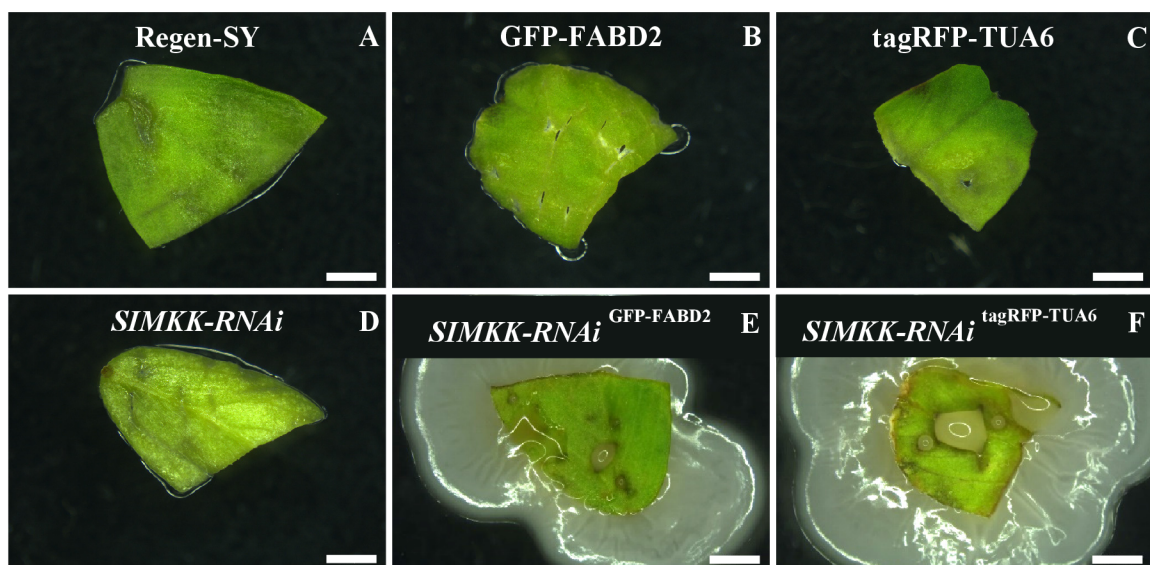
Bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, kmen GV3101 nesoucí vektor pHellsgate12 SIMKKi, určený pro cílenou transformaci *M. sativa*, byly odebrány ze zmrzlého glycerolového roztoku a přeneseny do LB média s obsahem selekčních antibiotik (spectinomycin – 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, rifampicin – 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) v 50ml zkumavce typu Falcon. Bakteriální suspenze byla inkubována ve tmě, při 180 otáčkách za minutu a teplotě 28 °C přibližně 24 hodin, do dosažení optické hustoty (OD_{600}) mezi 0,6–0,8. Po následné separaci bakteriálních buněk od média centrifugací, byl supernatant vylit do odpadu a buňky byly resuspendovány v čistém LB médiu pro dosažení optické hustoty $\text{OD}_{600} = 0,7$.

4.1.2 Transformace listových explantátů *Medicago sativa*

Sterilní listové explantáty *M. sativa* transgenních linií GFP-FABD2 a tagRFP-TUA6 byly inokulovány kulturou *Agrobacterium tumefaciens* s příslušným vektorem, dobře promíchány a ponechány 30 minut v klidu ve tmě. Následně byly explantáty osušeny na sterilním filtračním papíře a přeneseny na B5H médium (Obr. 2E, F). Petriho misky s explantáty a bakteriemi byly překryty filtračním papírem a ko-kultivovány ve fytotronu při teplotě 24 °C, relativní vlhkosti 70 %, snížené intenzitě světla cca 30 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a fotoperiodě 16 hodin světlo, 8 hodin tma. Sedm dní po inokulaci (Obr. 3E, F) byly explantáty odděleny od bakteriální kultury a opakovaně promyty sterilní MilliQ vodou. Proces ko-kultivace byl dokumentován pomocí Zoom stereomikroskopu. Listové explantáty rostlin, sloužících jako kontrola, tedy kultivar Regen-SY (Obr. 2A, 3A) a transgenní linie *SIMKK-RNAi* (Obr. 2D, 3D), GFP-FABD2 (Obr. 2B, 3B) a tagRFP-TUA6 (Obr. 2C, 3C) byly po sterilizaci ihned přeneseny na B5H médium a dále kultivovány za stejných podmínek.



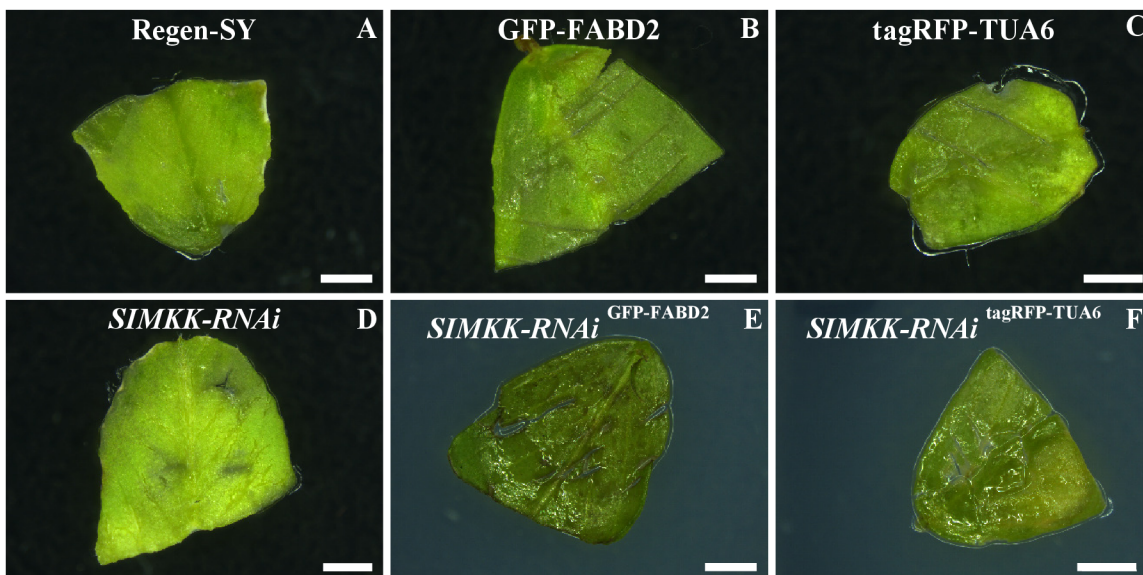
Obrázek 2. Listové explantáty *M. sativa* (A) kultivar Regen-SY, (B) GFP-FABD2, (C) tagRFP-TUA6, (D) *SIMKK-RNAi* 1. den kultivace na B5H médiu. Transformované listové explantáty (E) *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}, (F) *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6} na B5H médiu 1. den ko-kultivace s *Agrobacterium tumefaciens*. Měřítka 2 mm.



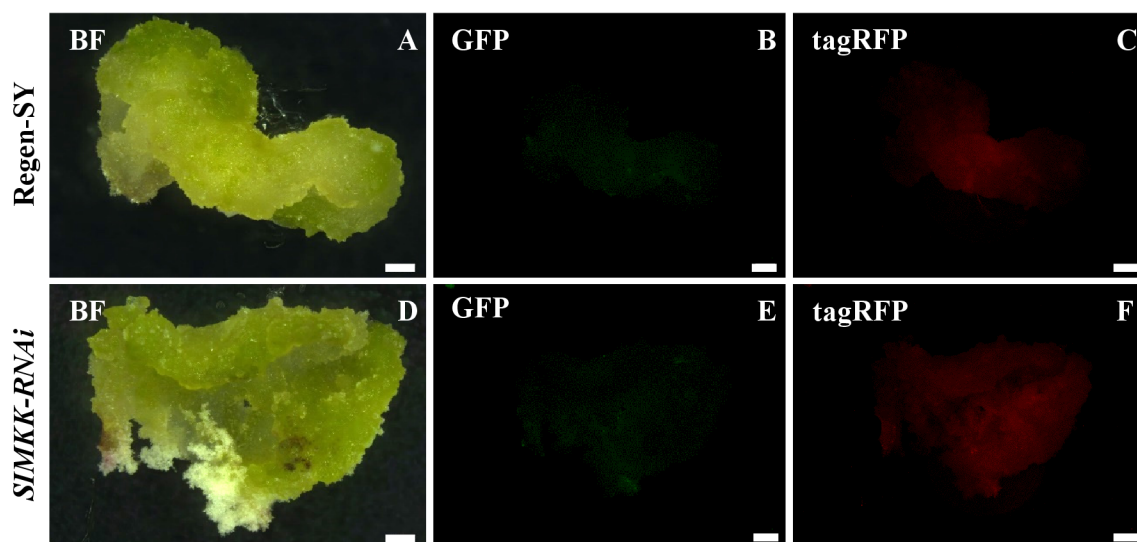
Obrázek 3. Listové explantáty *M. sativa* (A) kultivar Regen-SY, (B) GFP-FABD2, (C) tagRFP-TUA6, (D) *SIMKK-RNAi* po 7 dnech kultivace na B5H médiu. Transformované listové explantáty (E) *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}, (F) *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6} na B5H médiu po 7 dnech ko-kultivace s *Agrobacterium tumefaciens*. Měřítka 2 mm.

4.1.3 Regenerace rostlin procesem somatické embryogeneze

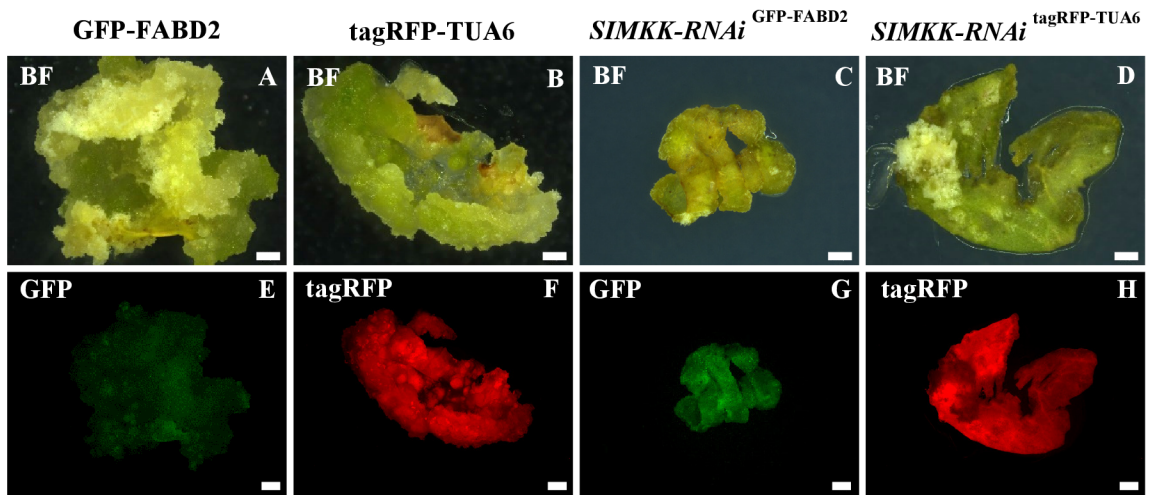
Promyté listové explantáty byly osušeny o sterilní filtrační papír a přeneseny na čerstvé sterilní B5H médium se selekčními antibiotiky (ticarcilin – $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, kanamycin – $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; Obr. 4E, F). Kultivace explantátů na B5H médiu obsahujícím rostlinné hormony probíhala po dobu tří až čtyř týdnů a vedla k aktivaci somatických buněk a následné kalogenezi (Obr. 5, 6). Jednotlivé kalusy byly následně přeneseny na B50 médium se selekčními antibiotiky, avšak bez obsahu hormonů a kultivovány po dobu dalších tří týdnů. Během kultivace docházelo na kalusech k indukci a postupnému vývoji somatických embryí (Obr. 7, 8). Somatická embrya v torpédovitém stádiu vývoje byla postupně přenášena a kultivována na MMS médiu se selekčními antibiotiky, které je bohaté na aminokyseliny a vitamíny. Nakonec byly mladé rostlinky číselně označeny, přeneseny a udržovány na MS médiu v *in vitro* podmínkách (Obr. 9). Rostliny byly kultivovány ve fytotronu při teplotě $24 \text{ }^{\circ}\text{C}$, relativní vlhkosti 70 %, intenzitě světla $60\text{--}80 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a fotoperiodě 16 hodin světlo, 8 hodin tma. Listové explantáty rostlin, sloužících jako kontrola (kultivar Regen-SY a transgenní linie *SIMKK-RNAi*, GFP-FABD2 a tagRFP-TUA6) byly po promytí regenerovány procesem somatické embryogeneze, vždy na médiích bez přídavku selekčních antibiotik a kultivovány za stejných podmínek. Jako negativní kontrola sloužily explantáty *M. sativa* kultivar Regen-SY (Obr 5A-C; 7A-C; 9A) a transgenní linie *SIMKK-RNAi* (Obr. 5D-F; 7D-F; 9D). Jako pozitivní kontrola pak transgenní linie GFP-FABD2 (Obr. 6A, E; 8A, E; 9B) a tagRFP-TUA6 (Obr. 6B, F; 8B, F; 9C). Celý proces regenerace rostlin *M. sativa* somatickou embryogenezi byl snímán pomocí mikrosnímků ze Zoom stereomikroskopu, nebo pomocí skeneru Image Scanner III.



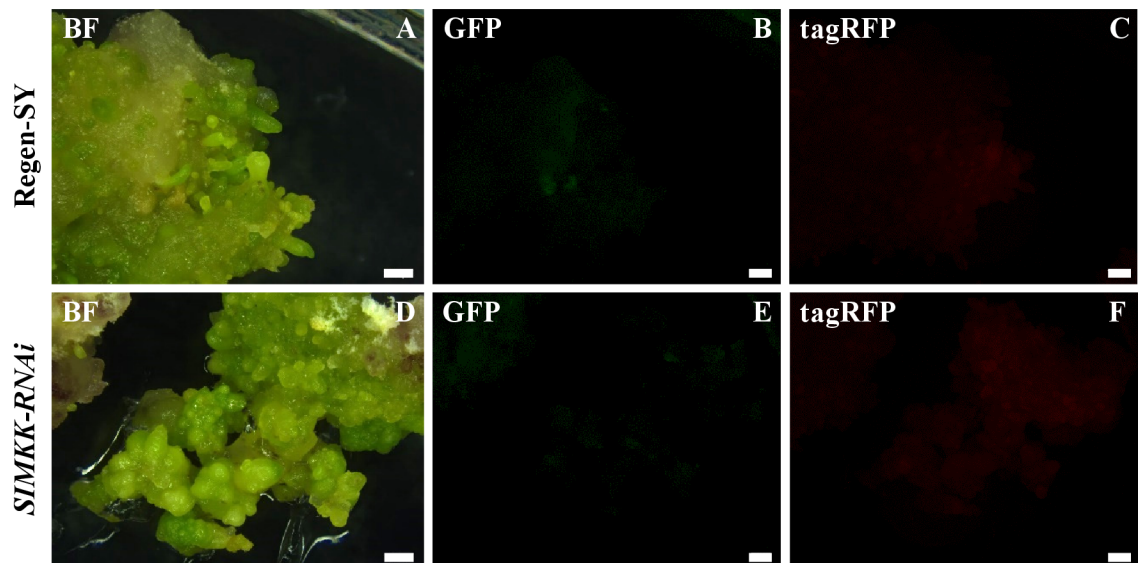
Obrázek 4. Listové explantáty *M. sativa* (A) kultivar Regen-SY, (B) GFP-FABD2, (C) tagRFP-TUA6, (D) *SIMKK-RNAi* po promytí a přenesení na čerstvé B5H médium. Transformované listové explantáty (E) *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}, (F) *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6} po promytí a přenesení na čerstvé B5H médium se selekčními antibiotiky. Měřítko 2 mm.



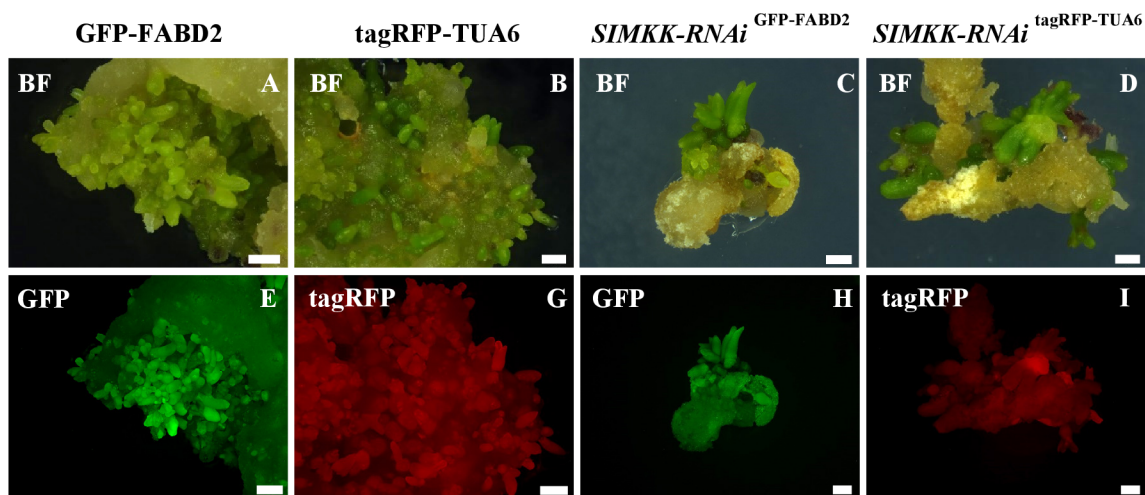
Obrázek 5. Indukce kalusu u listových explantátů *M. sativa* po 14 dnech kultivace na B5H médiu. Kultivar Regen-SY (nahore), transgenní linie *SIMKK-RNAi* (dole). A, D – procházející světlo (BF); B, E – fluorescenční kanál pro GFP; C, F – fluorescenční kanál pro tagRFP. Měřítko 1 mm.



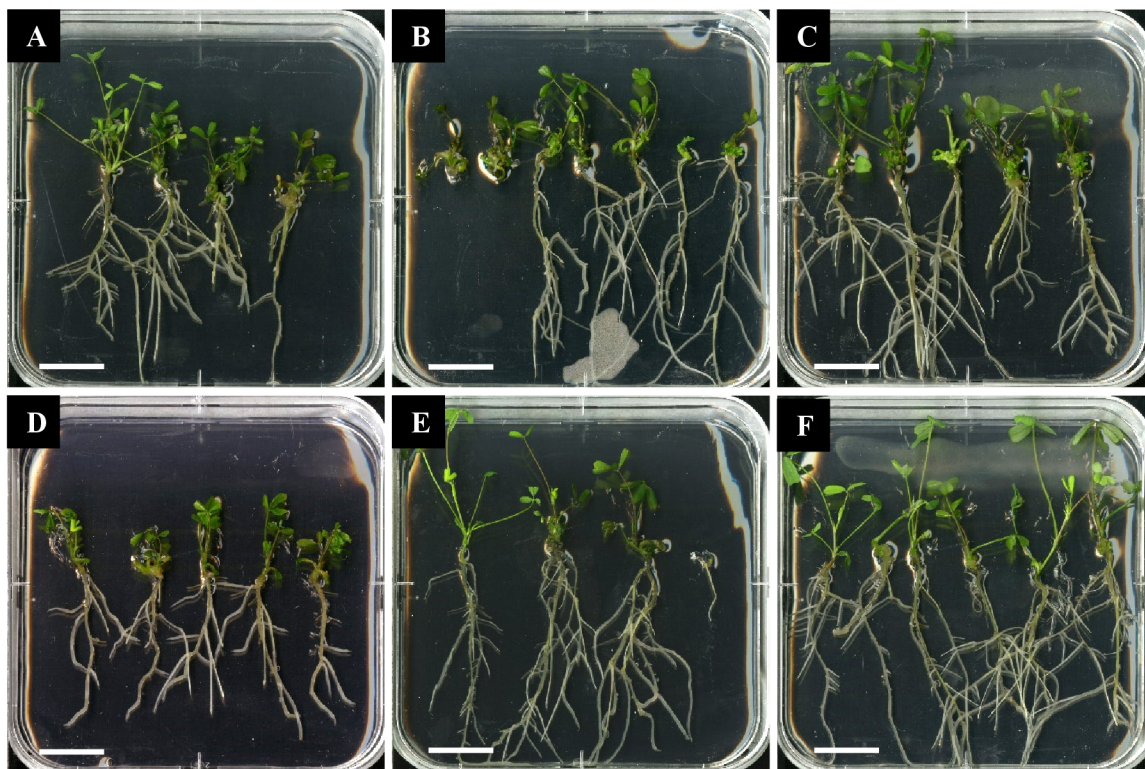
Obrázek 6. Indukce kalusu u listových explantátů *M. sativa* transgenní linie GFP-FABD2 (A, E), tagRFP-TUA6 (B, F), *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} (C, G), *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6} (D, H) po 14 dnech kultivace na B5H médiu (A, B, E, F) / B5H médiu se selekčními antibiotiky (C, D, G, H). A-D – procházející světlo (BF); E, G – fluorescenční kanál pro GFP; F, H – fluorescenční kanál pro tagRFP. Měřítka 1 mm.



Obrázek 7. Indukce embryogenního kalusu a somatických embryí *M. sativa* po 10 dnech kultivace na B50 médiu. Kultivar Regen-SY (nahore), transgenní linie *SIMKK-RNAi* (dole). A, D – procházející světlo (BF); B, E – fluorescenční kanál pro GFP; C, F – fluorescenční kanál pro tagRFP. Měřítka 1 mm.



Obrázek 8. Indukce embryogenního kalusu a somatických embryí *M. sativa* transgenní linie GFP-FABD2 (A, E), tagRFP-TUA6 (B, F), *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} (C, G), *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6} (D, H) po 10 dnech kultivace na B50 médiu (A, B, E, F) / B50 médiu se selekčními antibiotiky (C, D, G, H). A-D – procházející světlo (BF); E, G – fluorescenční kanál pro GFP; F, H – fluorescenční kanál pro tagRFP. Měřítko 1 mm.



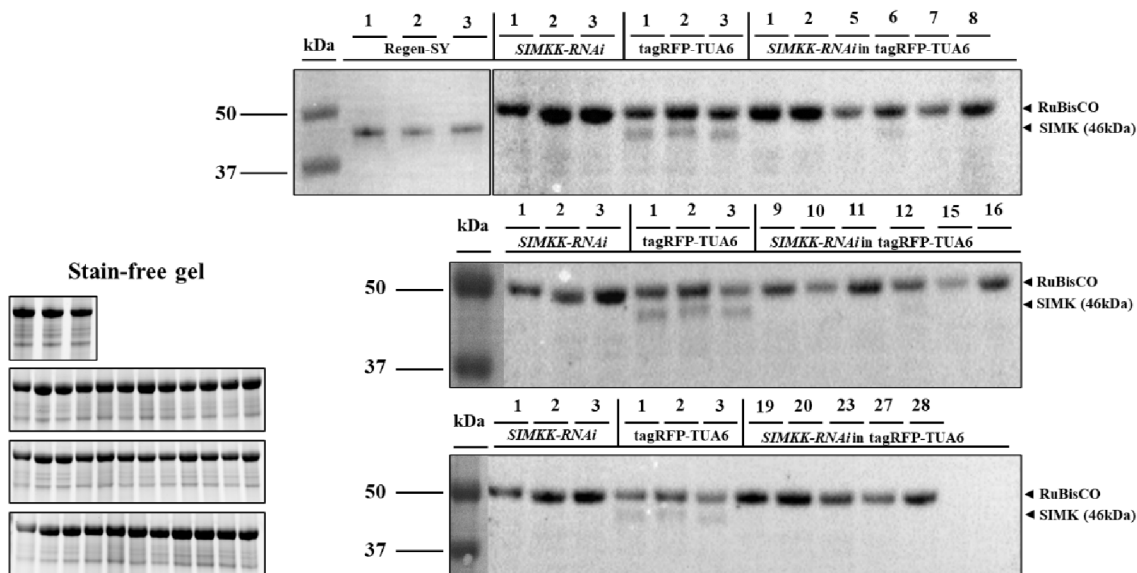
Obrázek 9. *In vitro* kultivace rostlin *M. sativa* (A) kultivar Regen-SY, (B) GFP-FABD2, (C) tagRFP-TUA6, (D) *SIMKK-RNAi*, (E) *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}, (F) *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6} na MS médiu. Měřítko 2 cm.

4.2 Kvalitativní a kvantitativní determinace změn produkce proteinu SIMK v transgenních rostlinách

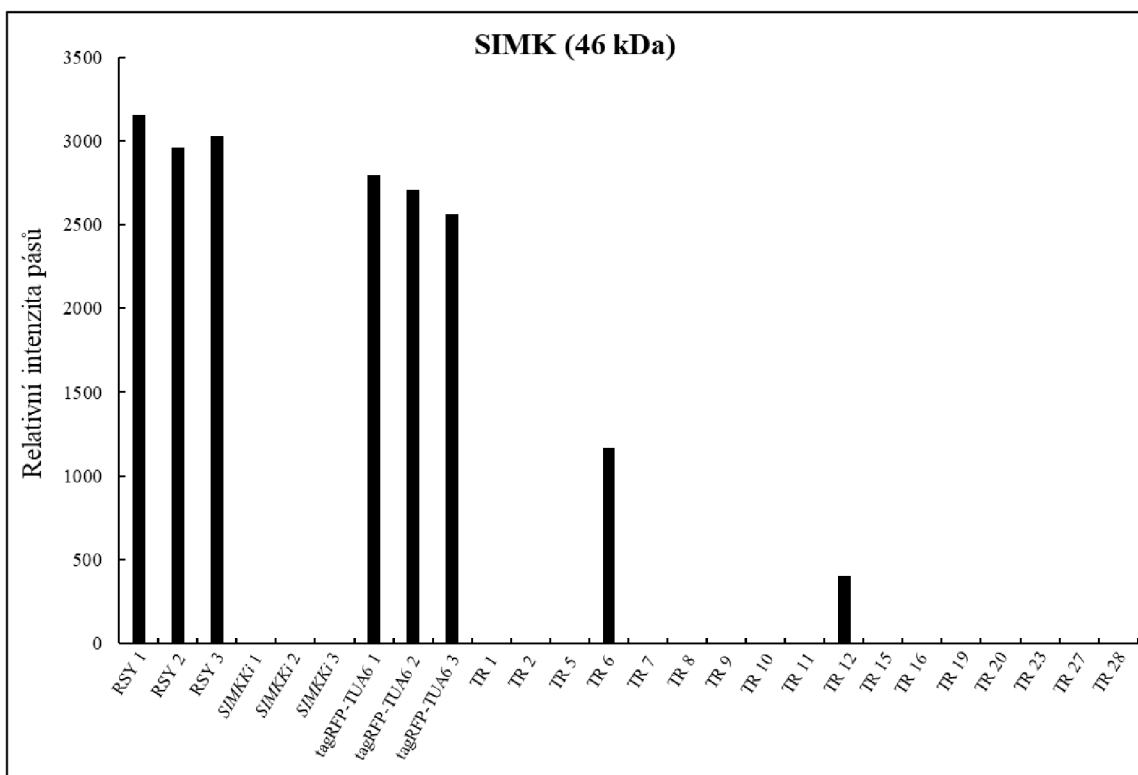
Z rostlin *M. sativa* *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6} a *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} získaných po transformaci transgenních linií s produkcí tagRFP-TUA6 a GFP-FABD2 bakteriemi *A. tumefaciens* nesoucí konstrukt pHellsgate12 SIMKKi a stejně tak i z rostlin, sloužících jako kontroly (rostliny RSY a jednoduchých transgenních linií *SIMKK-RNAi*, GFP-FABD2 a tagRFP-TUA6) byl odebrán biologický materiál v podobě listů. Ke kontrolnímu stanovení byly odebrány také vzorky listů a kořenů *A. thaliana* transgenní linie *pMAT*, stabilně exprimující GFP. Veškerý biologický materiál byl následně zhomogenizován a vyextrahován. Proteinový extrakt byl použit k detekci produkce proteinu SIMK, k jehož aktivaci dochází přenosem signálu z nadřazené SIMKK.

4.2.1 Imunoblotová analýza transgenních rostlin *Medicago sativa* *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6}

Kvalitativní a semikvantitativní determinace změn v úrovni produkce proteinu SIMK byla provedena pomocí imunoblotové analýzy proteinových vzorků 17 transgenních rostlin *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6} (označovány jako 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 19, 20, 23, 27, 28). Jako negativní kontrola (tedy bez předpokládané změny) sloužily proteinové vzorky z rostlin *M. sativa* kultivar Regen-SY (RSY) a transgenní linie tagRFP-TUA6. Jako pozitivní kontrola (se známou sníženou produkcí SIMK) pak proteinové vzorky z transgenní linie *SIMKK-RNAi* (*SIMKKi*). SIMK je protein o velikosti 46 kDa vykazující vysokou homologii k proteinu MPK6 z *A. thaliana*, k jeho detekci lze proto využít komerčně dostupnou protilátku anti-MPK6. Ze snímků membrán specifické detekce s navázanou primární a sekundární protilátkou byl vytvořen graf závislosti relativní intenzity pásů u jednotlivých kontrolních (RSY, *SIMKKi*, tagRFP-TUA6) i testovaných transgenních rostlin (TR) *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6} (Obr. 11). Z výsledků vyplývá, že nejnižší produkci proteinu SIMK, srovnatelnou s produkcí u kontrolních rostlin *SIMKK-RNAi*, vykazovaly transgenní rostliny *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6} č. 1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 15, 16, 19, 20, 23, 27 a 28 (Obr. 10, 11). U transgenních rostlin *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6} č. 6 a 12 došlo ke snížení produkce proteinu SIMK jen částečně (Obr. 10, 11). Použitá protilátka anti-MPK6 vykazovala určitou mírnou, ovšem známou nespecifitu, v jejímž důsledku docházelo také k detekci proteinu RuBisCO s velikostí cca 50 kDa (Obr. 10).



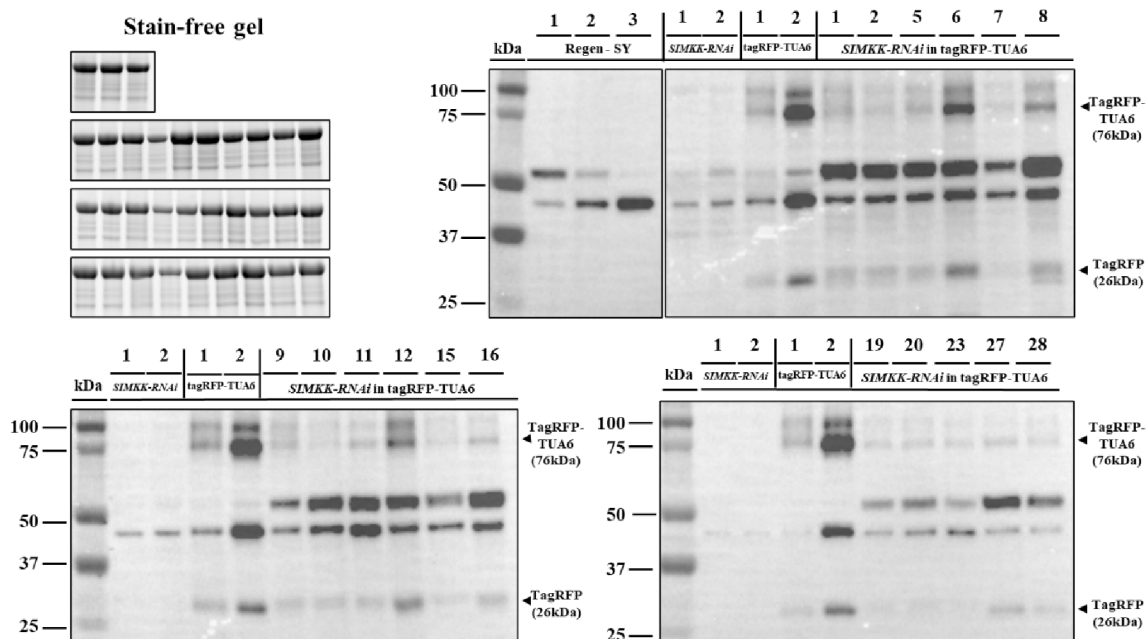
Obrázek 10. Detekce produkce proteinu SIMK u proteinových vzorků z listů kontrolních rostlin *M. sativa* kultivar Regen-SY, *SIMKK-RNAi* a tagRFP-TUA6 a dvojitých transgenních rostlin *M. sativa* *SIMKK-RNAi* tagRFP-TUA6 (1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 19, 20, 23, 27, 28) rostoucích *in vitro*. Snímek stain-free gelu slouží pro kontrolu nanesení proteinů.



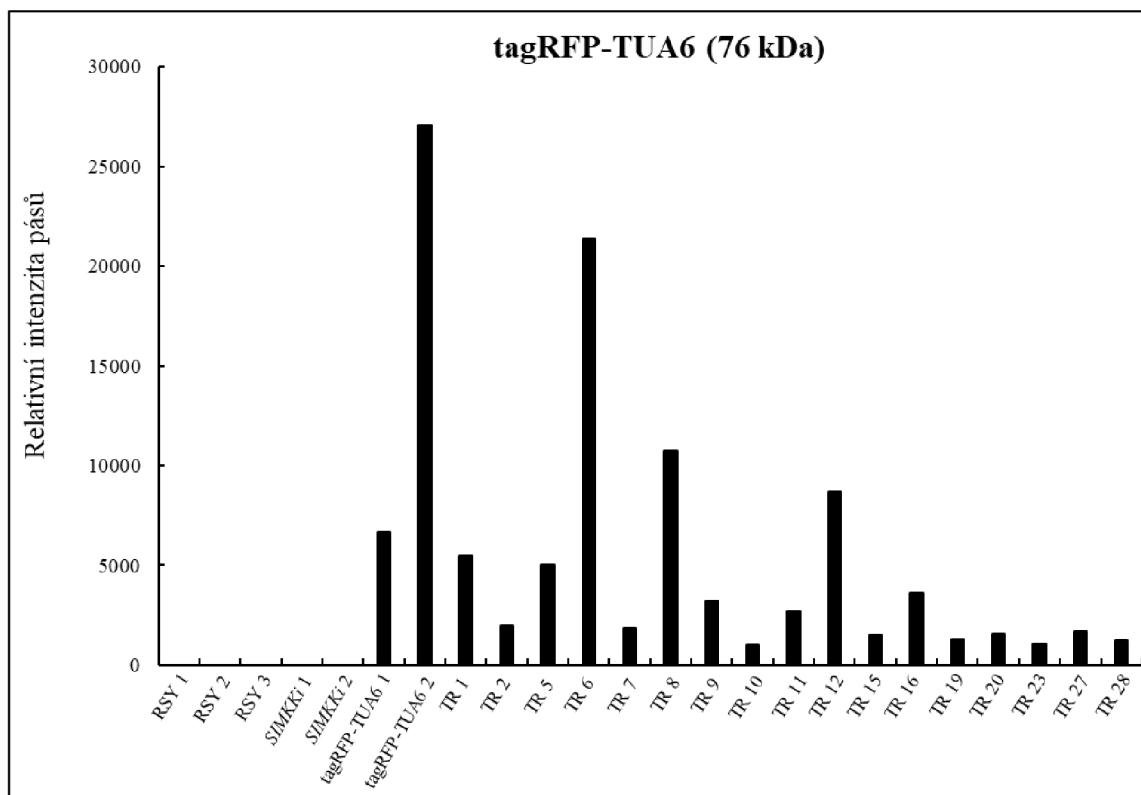
Obrázek 11. Relativní intenzita pásů u jednotlivých rostlin. Semikvantitativní vyhodnocení detekce proteinu SIMK. K nejnižší úrovni produkce SIMK docházelo u transgenních rostlin *SIMKK-RNAi* tagRFP-TUA6 č. 1, 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 15, 16, 19, 20, 23, 27 a 28. K částečnému snížení produkce proteinu SIMK došlo u transgenních rostlin *SIMKK-RNAi* tagRFP-TUA6 č. 6 a 12. TR – transgenní rostliny *M. sativa* *SIMKK-RNAi* tagRFP-TUA6.

Následně byly stejné proteinové vzorky podrobeny imunoblotové analýze pro detekci přítomnosti fúzního proteinu tagRFP-TUA6, o molekulové hmotnosti přibližně 76 kDa (Obr. 12) a výsledky byly opět semikvantitativně vyhodnoceny (Obr. 13). Jako negativní kontrola sloužily proteinové vzorky z rostlin *M. sativa* kultivar Regen-SY (RSY) a transgenní linie *SIMKK-RNAi* (*SIMKKi*). Jako pozitivní kontrola pak sloužily proteinové vzorky z transgenní linie tagRFP-TUA6. Z výsledků analýzy imunoblotu s použitím protilátky anti-tagRFP vyplývá, že k expresi fúzního proteinu tagRFP-TUA6 docházelo u transgenních (kontrolních) rostlin *M. sativa* tagRFP-TUA6 a všech testovaných rostlin *SIMKK-RNAi* ^{tagRFP-TUA6} (Obr. 12, 13). K nejvyšší expresi fúzního proteinu docházelo u transgenních rostlin *SIMKK-RNAi* ^{tagRFP-TUA6} č. 6 a 12 (Obr. 12, 13), u nichž zároveň došlo jen k částečnému snížení produkce proteinu SIMK (Obr. 10, 11), a u rostliny č. 8. Protilátka anti-tagRFP opakovaně vykazovala vysokou nespecifitu.

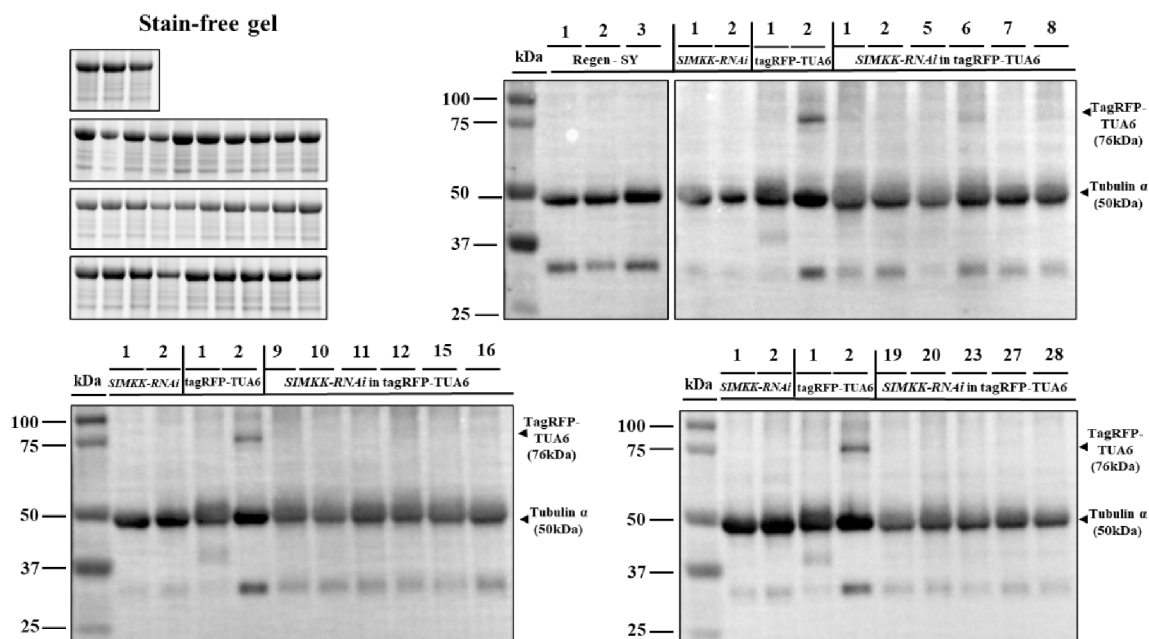
Nakonec byla u všech proteinových vzorků provedena imunoblotová analýza na přítomnost proteinu tubulinu α , o molekulové hmotnosti přibližně 50 kDa (Obr. 14) a detekce proteinu byla následně semikvantitativně vyhodnocena (Obr. 15). K detekci tubulinu α byla využita protilátka anti-tubulin α . Z výsledků je patrné, že k jeho expresi docházelo u všech rostlin, sloužících jako kontrola (kultivar Regen-SY a transgenní linie *SIMKK-RNAi* a tagRFP-TUA6) i u všech testovaných rostlin *SIMKK-RNAi* ^{tagRFP-TUA6} (Obr. 14, 15).



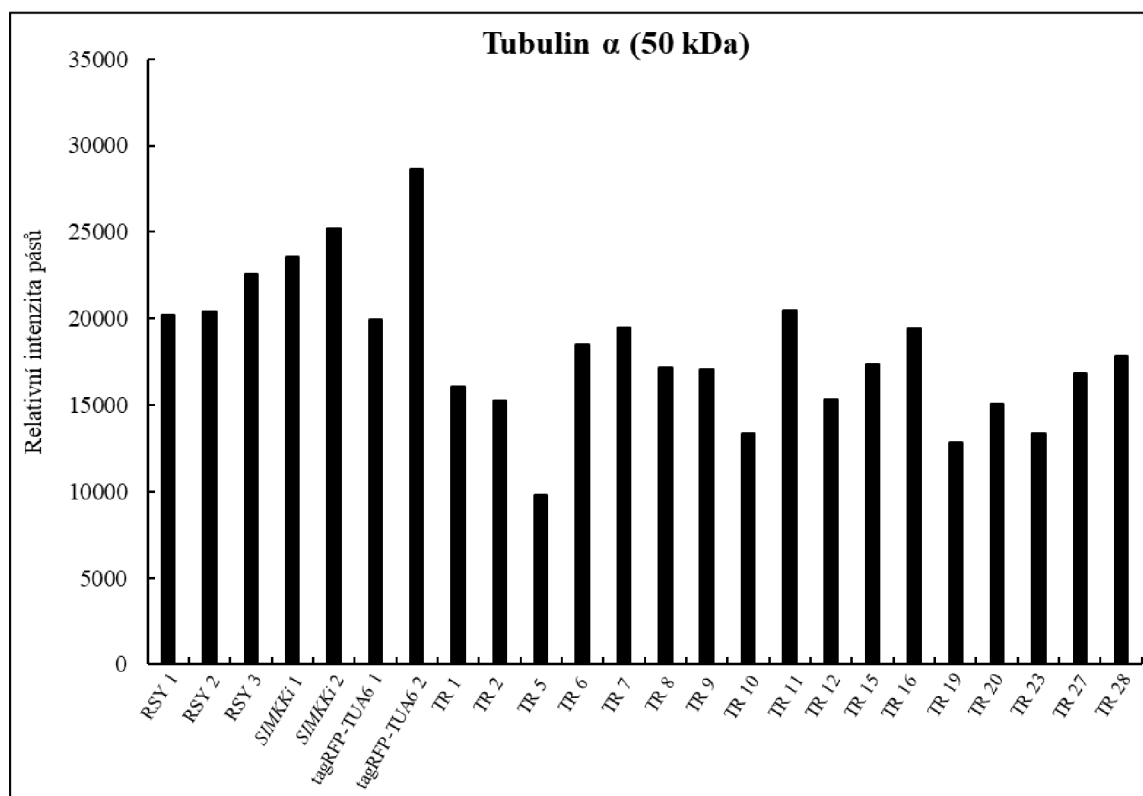
Obrázek 12. Detekce fúzního proteinu tagRFP-TUA6 a proteinu tagRFP u proteinových vzorků z listů kontrolních rostlin *M. sativa* kultivar Regen-SY, *SIMKK-RNAi* a tagRFP-TUA6 a dvojitých transgenních rostlin *M. sativa* *SIMKK-RNAi* tagRFP-TUA6 (1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 19, 20, 23, 27, 28) rostoucích *in vitro*. Snímek stain-free gelu slouží pro kontrolu nanesení proteinů.



Obrázek 13. Relativní intenzita pásů u jednotlivých rostlin. Semikvantitativní vyhodnocení detekce fúzního proteinu tagRFP-TUA6. K nejvyšší expresi fúzního proteinu docházelo u transgenních rostlin *SIMKK-RNAi* tagRFP-TUA6 č. 6, 8 a 12. TR – transgenní rostliny *M. sativa* *SIMKK-RNAi* tagRFP-TUA6.



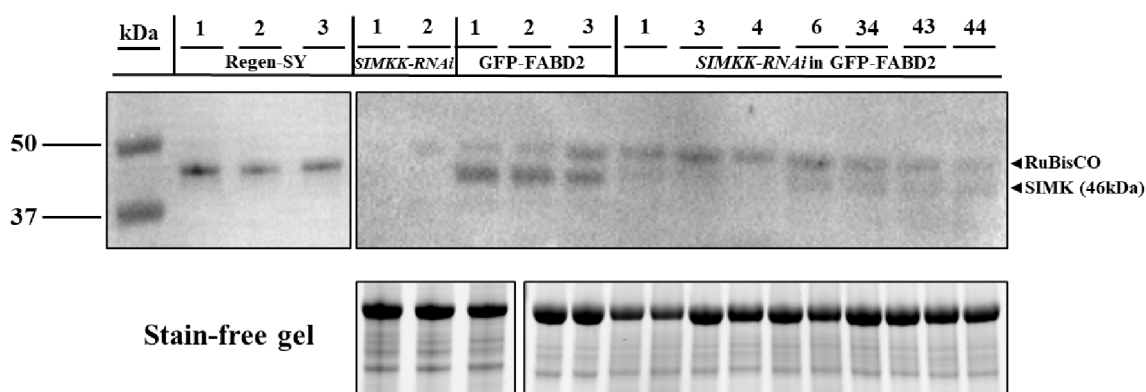
Obrázek 14. Detekce proteinu tubulinu α u proteinových vzorků z listů kontrolních rostlin *M. sativa* kultivar Regen-SY, *SIMKK-RNAi* a tagRFP-TUA6 a dvojitých transgenních rostlin *M. sativa* *SIMKK-RNAi* tagRFP-TUA6 (1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 19, 20, 23, 27, 28) rostoucích *in vitro*. Snímek stain-free gelu slouží pro kontrolu nanesení proteinů.



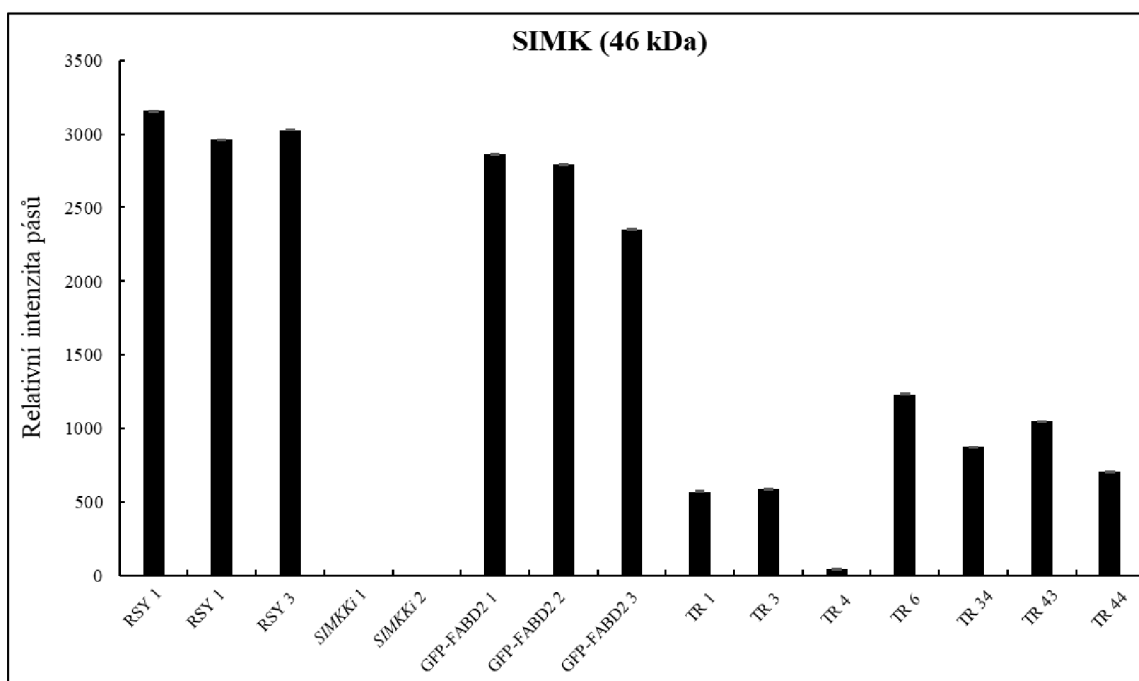
Obrázek 15. Relativní intenzita pásů u jednotlivých rostlin. Semikvantitativní vyhodnocení detekce proteinu tubulinu α . K expresi tubulinu α docházelo u všech kontrolních (RSY, *SIMKKi*, tag-RFP-TUA6) i testovaných rostlin *SIMKK-RNAi* tagRFP-TUA6. TR – transgenní rostliny *M. sativa* *SIMKK-RNAi* tagRFP-TUA6.

4.2.2 Imunoblotová analýza transgenních rostlin *Medicago sativa* *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}

Kvalitativní a semikvantitativní determinace změn v úrovni produkce proteinu SIMK byla provedena pomocí imunoblotové analýzy proteinových vzorků 7 dvojitých transgenních rostlin *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} (označovány jako 1, 3, 4, 6, 34, 43, 44). Jako negativní kontrola sloužily proteinové vzorky z rostlin *M. sativa* kultivar Regen-SY (RSY) a transgenní linie GFP-FABD2. Jako pozitivní kontrola pak sloužily proteinové vzorky z transgenní linie *SIMKK-RNAi* (*SIMKKi*). K detekci proteinu SIMK, o molekulové hmotnosti 46 kDa, byla využita protilátka anti-MPK6. Ze snímků membrán specifické detekce s navázanou protilátkou byl následně vytvořen graf závislosti relativní intenzity pásů u jednotlivých kontrolních (RSY, *SIMKKi*, GFP-FABD2) i dvojitých transgenních rostlin (TR) *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} (Obr. 17). Z výsledků vyplývá, že nejnižší produkci proteinu SIMK, téměř srovnatelnou s produkcí u kontrolních rostlin *SIMKK-RNAi*, vykazovala transgenní rostlina *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} č. 4 (Obr. 16, 17). U ostatních transgenních rostlin *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} došlo ke snížení produkce proteinu SIMK jen částečně, a to sestupně v pořadí rostlin č.: 6, 43, 34, 44, 3 a 1 (Obr. 17). Jak již bylo zmíněno, použitá protilátka anti-MPK6 vykazovala určitou nespecifitu, v jejímž důsledku docházelo také k detekci proteinu RuBisCO s velikostí cca 50 kDa (Obr. 16).



Obrázek 16. Detekce produkce proteinu SIMK u proteinových vzorků z listů kontrolních rostlin *M. sativa* kultivar Regen-SY, *SIMKK-RNAi* a GFP-FABD2 a dvojitých transgenních rostlin *M. sativa* *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} (1, 3, 4, 6, 34, 43, 44) rostoucích *in vitro*. Snímek stain-free gelu slouží pro kontrolu nanesení proteinů.

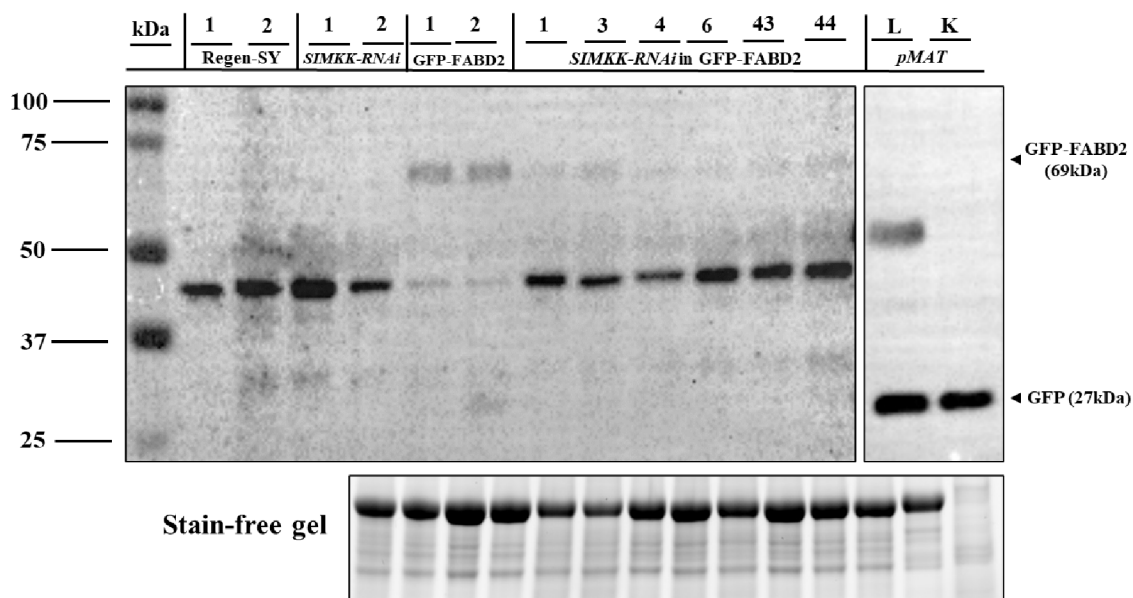


Obrázek 17. Relativní intenzita pásů u jednotlivých rostlin. Semikvantitativní vyhodnocení detekce proteinů SIMK. K nejnižší úrovni produkce SIMK docházelo u transgenní rostliny č. 4. K částečnému snížení produkce proteinu SIMK došlo u transgenních rostlin *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} (sestupně): č. 6, 43, 34, 3, 1. TR – transgenní rostliny *M. sativa* *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}.

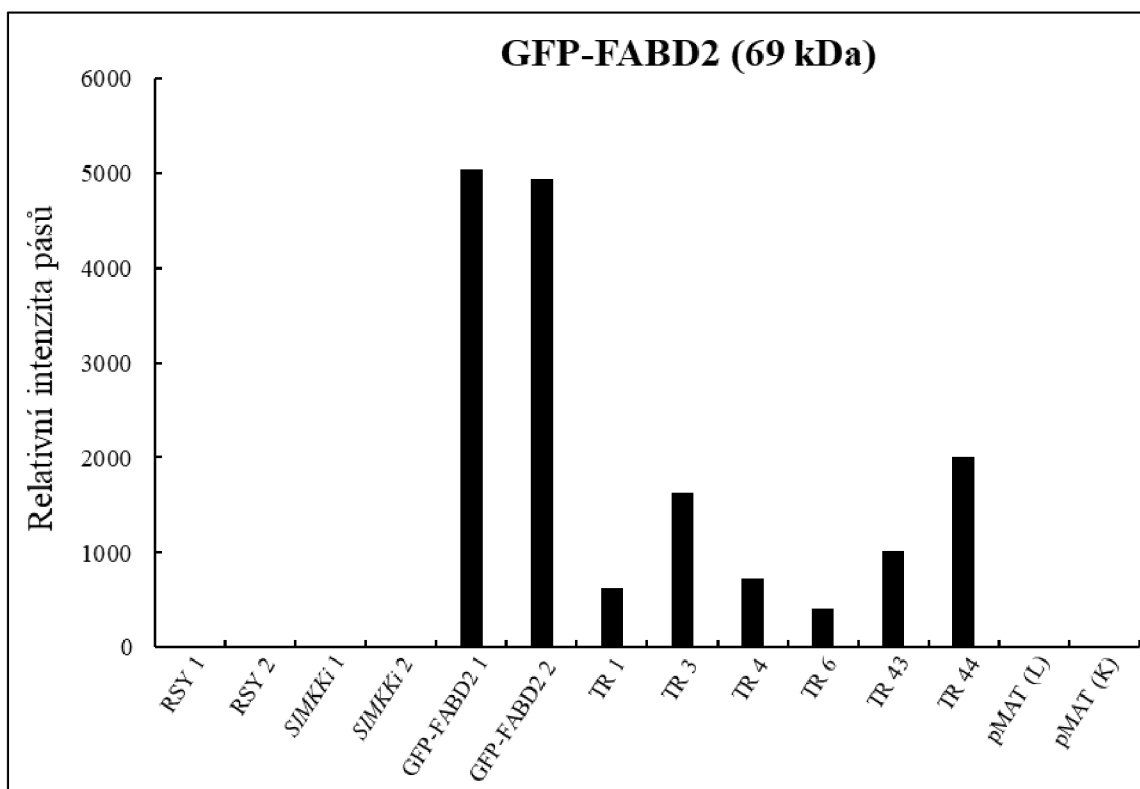
Následně byly proteinové vzorky podrobeny imunoblotové analýze pro detekci přítomnosti fúzního proteinu GFP-FABD2, o molekulové hmotnosti přibližně 69 kDa (Obr. 18), a výsledky byly opět semikvantitativně vyhodnoceny (Obr. 19). Jako negativní kontrola sloužily proteinové vzorky z rostlin *M. sativa* kultivar Regen-SY (RSY) a transgenní linie *SIMKK-RNAi* (*SIMKKi*). Jako pozitivní kontrola pak sloužily proteinové vzorky z transgenní linie GFP-FABD2 a vzorky z listů a kořenů *A. thaliana* transgenní linie *pMAT*, stabilně exprimující GFP (27 kDa). Do analýzy nebyla zahrnuta transgenní rostlina č. 34, z důvodu jejího uhynutí v důsledku bakteriální kontaminace. Z výsledků analýzy imunoblotu s použitím protilátky anti-GFP vyplývá, že k expresi fúzního proteinu GFP-FABD2 docházelo jak u kontrolních transgenních rostlin *M. sativa* GFP-FABD2, tak i všech testovaných rostlin *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} (Obr. 18, 19). Expresí fúzního proteinu u dvojíých transgenních linií *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} však byla, v porovnání s kontrolou (GFP-FABD2), značně snížena (Obr. 18, 19). Výsledky imunoblotu s protilátkou anti-GFP byly i při dlouhém expozičním času velice slabě detekovatelné a protilátka opakovaně vykazovala určitou nespecifitu.

Nakonec byla u stejných proteinových vzorků provedena imunoblotová analýza na přítomnost proteinu aktinu, o molekulové hmotnosti přibližně 42 kDa (Obr. 20)

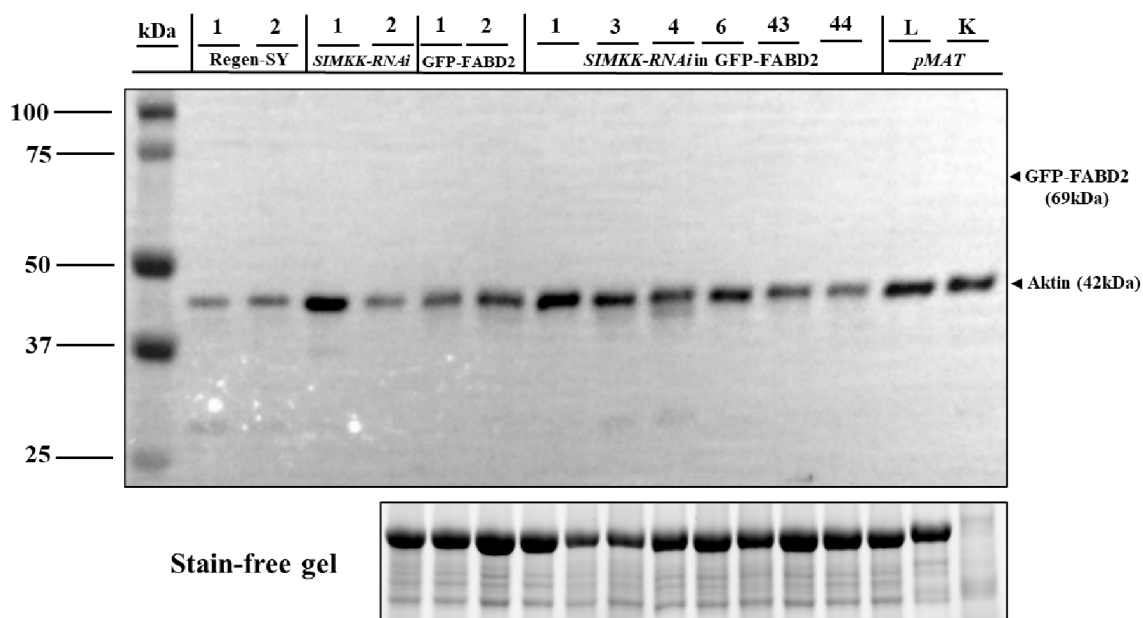
a detekce proteinu byla následně semikvantitativně vyhodnocena (Obr. 21). K detekci aktinu byla využita protilátka anti-aktin. Z výsledků je patrné, že k jeho expresi docházelo u všech rostlin *M. sativa*, sloužících jako kontrola (kultivar Regen-SY a transgenní linie *SIMKK-RNAi* a GFP-FABD2), u rostlin *A. thaliana* transgenní linie *pMAT*, i všech testovaných rostlin *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} (Obr. 20, 21).



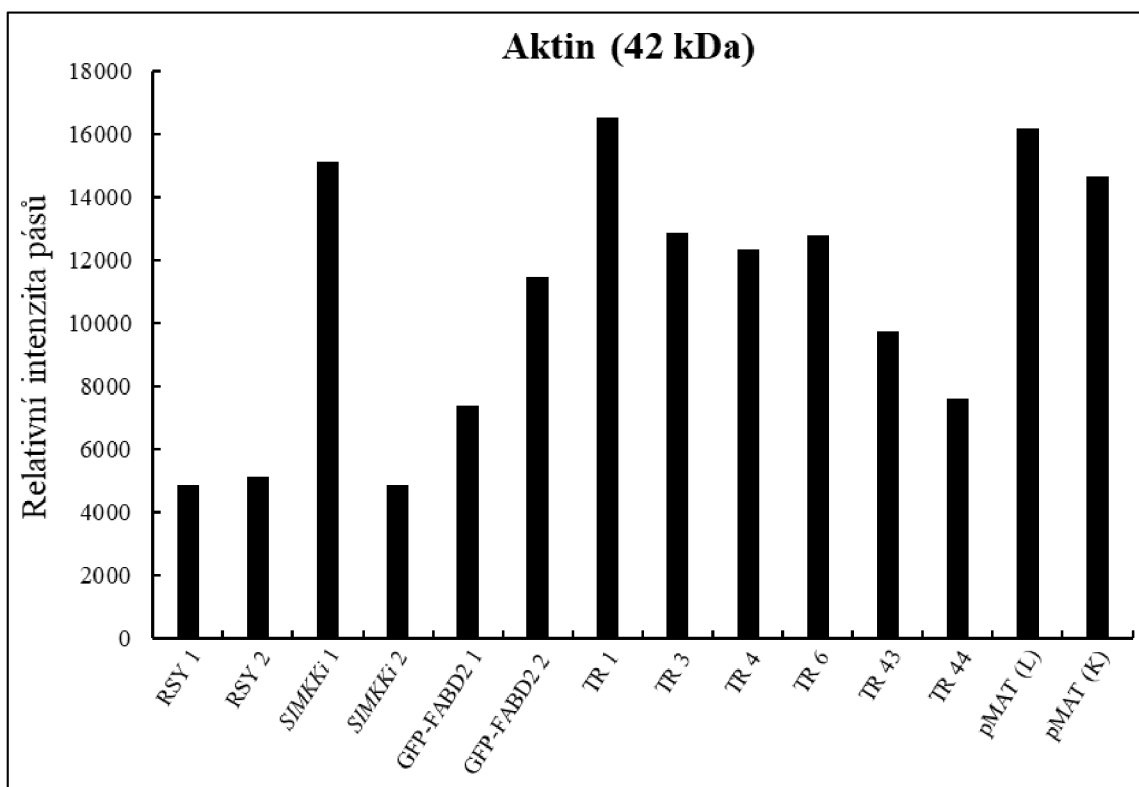
Obrázek 18. Detekce fúzního proteinu GFP-FABD2 a proteinu GFP u proteinových vzorků z listů kontrolních rostlin *M. sativa* kultivar Regen-SY, *SIMKK-RNAi* a GFP-FABD2 a dvojité transgenních rostlin *M. sativa* *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} (1, 3, 4, 6, 43, 44) a proteinových vzorků z listů (L) a kořenů (K) *A. thaliana* transgenní linie *pMAT*, stabilně exprimující GFP, rostoucích *in vitro*. Snímek stain-free gelu slouží pro kontrolu nanesení proteinů.



Obrázek 19. Relativní intenzita pásů u jednotlivých rostlin. Semikvantitativní vyhodnocení detekce fúzního proteinu GFP-FABD2. K expresi fúzního proteinu GFP-FABD2 docházelo u kontrolních rostlin *M. sativa* GFP-FABD2 a všech testovaných rostlin *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}. TR – transgenní rostliny *M. sativa* *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}.



Obrázek 20. Detekce proteinu aktinu u proteinových vzorků z listů kontrolních rostlin *M. sativa* kultivar Regen-SY, *SIMKK-RNAi* a GFP-FABD2 a dvojíých transgenních rostlin *M. sativa* *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} (1, 3, 4, 6, 43, 44) a proteinových vzorků z listů (L) a kořenů (K) *A. thaliana* transgenní linie *pMAT*, stabilně exprimující GFP, rostoucích *in vitro*. Snímek stain-free gelu slouží pro kontrolu nanesení proteinů.



Obrázek 21. Relativní intenzita pásů u jednotlivých rostlin. Semikvantitativní vyhodnocení detekce proteinu aktinu. K expresi docházelo u všech rostlin *M. sativa*, sloužících jako kontrola (kultivar Regen-SY a transgenní linie *SIMKK-RNAi* a GFP-FABD2), u rostlin *A. thaliana* transgenní linie *pMAT* i všech testovaných rostlin *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}. TR – transgenní rostliny *M. sativa* *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}.

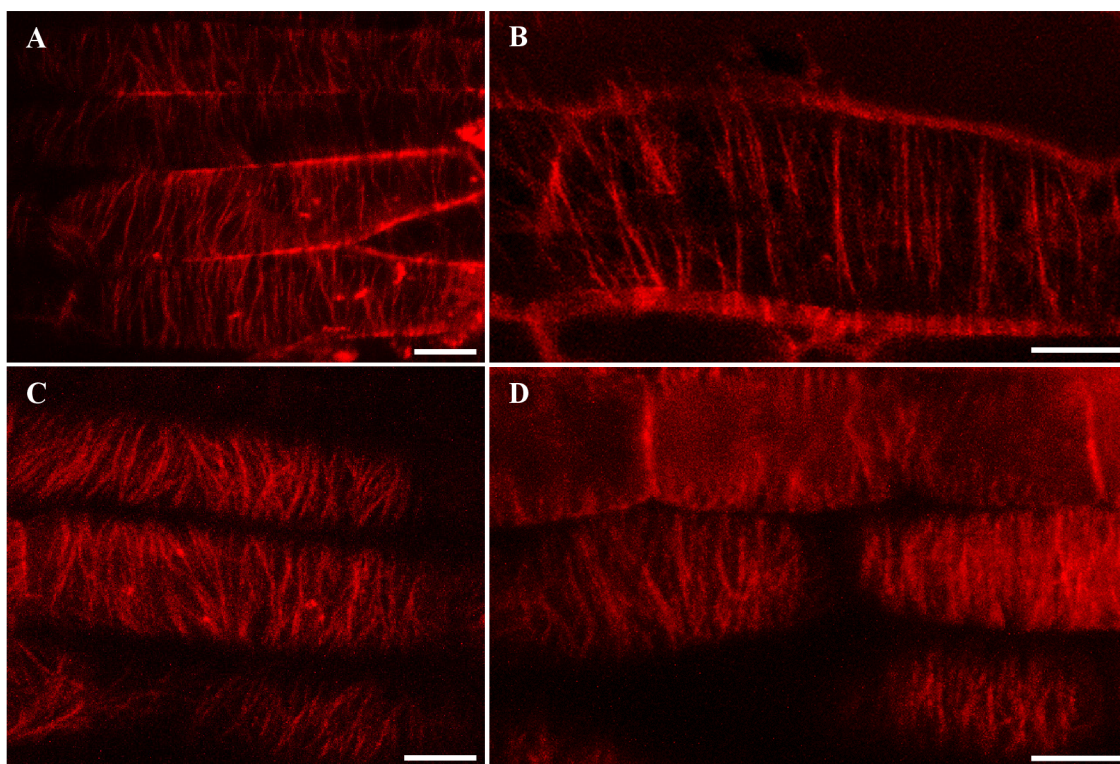
4.3 Mikroskopická analýza cytoskeletu transgenních rostlin *Medicago sativa*

4.3.1 Mikroskopická analýza mikrotubulového cytoskeletu rostlin *M. sativa* *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6}

Pro dokumentaci struktury a uspořádání mikrotubulového cytoskeletu byly použity explantáty kořenů ze tří rostlin transgenní linie tagRFP-TUA6, s fluorescenčně značenými mikrotubuly pomocí translační fúze tagRFP k tubulinu $\alpha 6$. Tyto vzorky sloužily jako kontrola, a byly porovnávány se vzorky tří rostlin dvojité transgenní linie *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6} (rostlina č. 1), rozmnožených pomocí somatické embryogeneze. Z dvojitých transgenních linií byla jako reprezentativní vybrána rostlina číslo 1, protože při předchozích biochemických analýzách vykazovala sníženou produkci proteinu SIMK, na úroveň srovnatelnou s produkcí u kontrolních rostlin *SIMKK-RNAi* (Obr. 11). Zároveň tato rostlina vykazovala průměrnou hodnotu produkce fúzního proteinu tagRFP-TUA6 (Obr. 13) a proteinu tubulinu α (Obr. 15). Připravené preparáty byly snímány pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu. Pro dokumentaci fluorescenčně

značených mikrotubulů byl použit laser 561 nm, pro detekci mRFP (excitace 561 nm, emisní spektrum 582-690 nm).

Mikroskopickou analýzou kořenů rostlin *M. sativa* transgenní linie tagRFP-TUA6 sloužící jako kontrola (Obr. 22A, B), a dvojité transgenní linie *SIMKK-RNAi* tagRFP-TUA6 (Obr. 22C, D) byla zdokumentována a porovnávána struktura a uspořádání mikrotubulového cytoskeletu. Jednotlivé mikroskopické snímky mikrotubulového cytoskeletu ukázaly mezi liniemi určité rozdíly. K analýze byly vybrány epidermální buňky kořene, nacházející se v terminální fázi elongace. U transgenní linie tagRFP-TUA6 byly kortikální mikrotubuly v pozorovaných buňkách uspořádány jednotlivě nebo v jednoduchých svazcích, byly delší a jejich orientace byla po celé kortikální vrstvě podobná, tedy kolmá vzhledem k ose elongace buněk (Obr. 22A, B). Naproti tomu u dvojité transgenní linie *SIMKK-RNAi* tagRFP-TUA6 byly pozorované kortikální mikrotubuly kratší, často navázané na sebe a spojené do silnějších svazků. Jejich orientace v kortexu buněk byla mírně odlišná se značnými odchylkami od kolmé roviny (Obr. 22C, D).



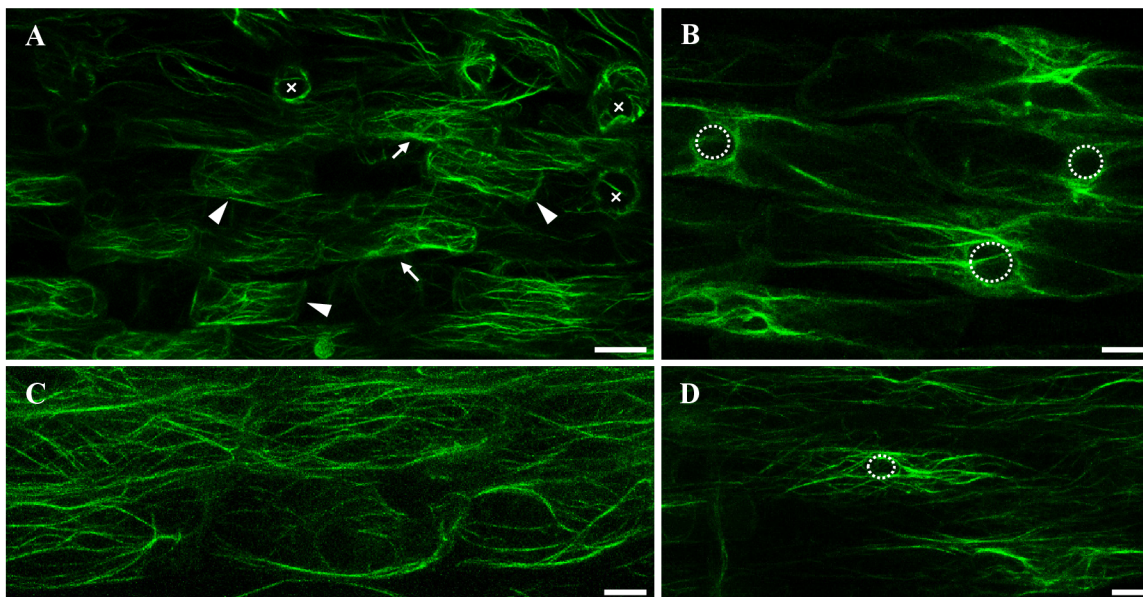
Obrázek 22. Struktura a uspořádání mikrotubulů v kortikální části epidermálních buněk kořene *M. sativa* transgenní linie tagRFP-TUA6 (A, B) a dvojité transgenní linie *SIMKK-RNAi* tagRFP-TUA6 (C, D). Měřítko 10 μ m

4.3.2 Mikroskopická analýza aktinového cytoskeletu rostlin *M. sativa* *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}

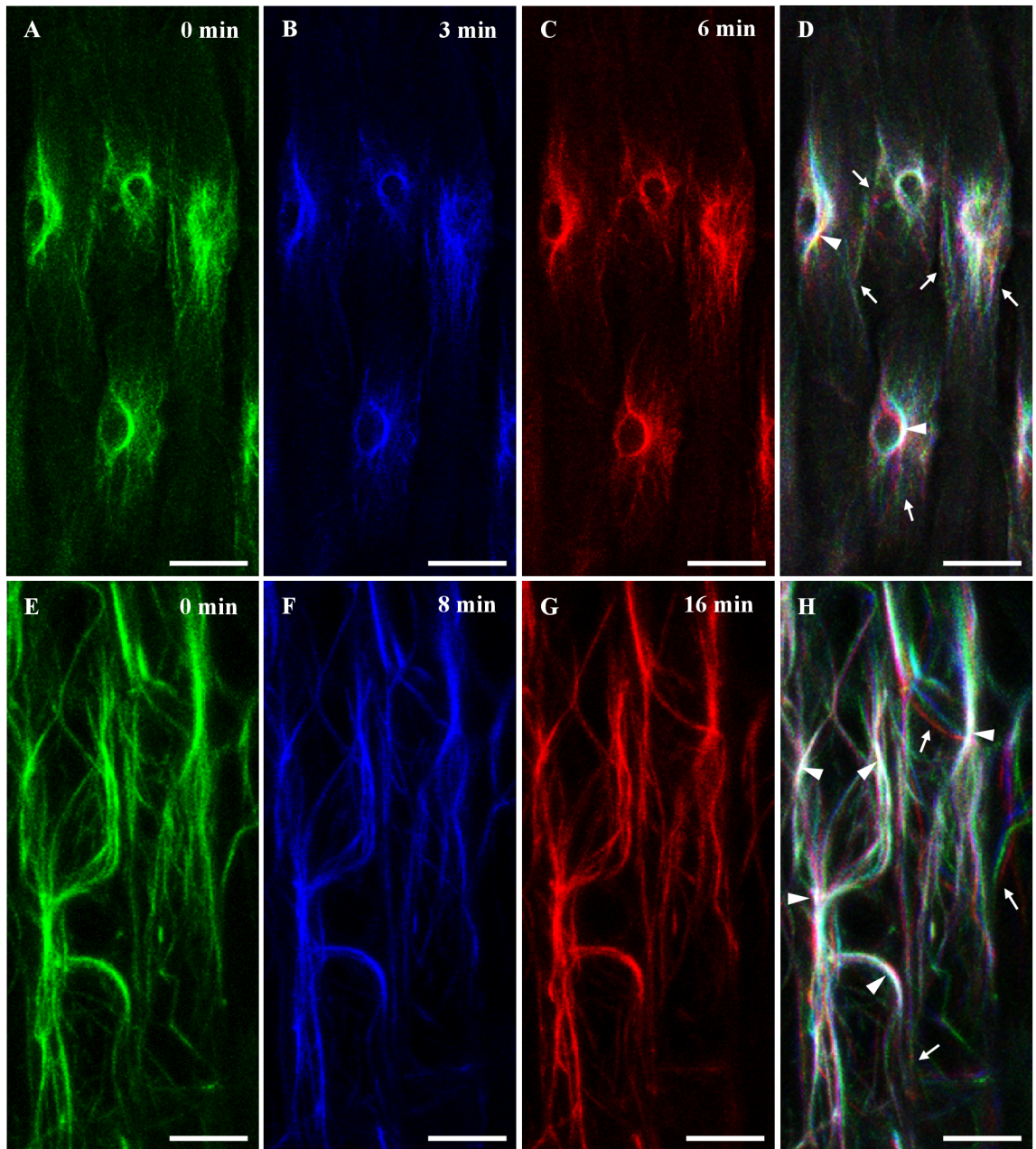
Pro dokumentaci struktury, uspořádání a dynamiky aktinového cytoskeletu byly použity explantáty kořenů ze tří rostlin transgenní linie GFP-FABD2, s fluorescenčně značeným aktinovým cytoskeletem, pomocí translační fúze GFP k aktin-vazebné doméně 2 proteinu fimbrinu z *A. thaliana*, sloužících jako kontrola, a tří rostlin dvojité transgenní linie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} (rostlina č. 4), rozmnožených pomocí somatické embryogeneze. Z dvojitých transgenních linií byla vybrána rostlina číslo 4, protože při předchozích biochemických analýzách vykazovala nejnížší produkci proteinu SIMK, téměř srovnatelnou s produkcí u kontrolních rostlin *SIMKK-RNAi* (Obr. 17). Připravené preparáty byly snímány pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu. K analýze byly vybrány epidermální buňky kořene, nacházející se v terminální fázi elongace a v zóně diferenciaci kořenových vlásků. Pro dokumentaci fluorescenčně značeného aktinu byl použit laser 488 nm pro detekci GFP (excitace 488 nm, emisní spektrum 495-555 nm).

Mikroskopickou analýzou kořenů rostlin *M. sativa* transgenní linie GFP-FABD2 sloužící jako kontrola (Obr. 23A-B; 24 A-D), a dvojité transgenní linie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} (Obr. 23C-D; 24E-F) byla zdokumentována a porovnávána struktura, uspořádání a dynamika aktinového cytoskeletu. Pro stanovení dynamiky aktinu (Obr. 24) bylo využito časosběrné snímání, a pro následné vyhodnocení byly použity časové úseky na začátku (0 min), uprostřed (3 min/8 min) a konci (6 min/16 min) snímání. Na každém snímku z určené časové sekvence byl cytoskelet označen jinou barvou (zelená pro začátek, modrá pro střed a červená pro konec snímání) a následně byly snímky vzájemně překryty a spojeny do jednoho obrázku (Obr. 24D, H). Aktinová vlákna, která byla dynamická se na spojeném snímku nepřekrývají, zobrazují se tedy různobarevně (v obrázku jsou vyznačena šipkami). Naproti tomu vlákna, která jsou po celou dobu snímání více statická, se na spojeném snímku výrazně překryjí, v důsledku čehož se jeví jako bílá (důsledek překryvu všech barev) a jsou označena hroty šipek (Obr. 24D, H). Jednotlivé mikroskopické snímky ukázaly mezi liniemi určité rozdíly, jak ve struktuře, tak dynamice aktinu. U transgenní linie GFP-FABD2 (Obr. 23A, B) byla aktinová vlákna v buňkách pozorována zejména kolem jader (na obrázku jádra vyznačena přerušovanou bílou čarou), kde vytvářela typickou síť (tzv. aktinový koš) kolem jádra. Naproti tomu u dvojité transgenní linie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} (Obr. 23C, D) nebyla tato aktinová síť kolem jader příliš výrazná a aktinová vlákna byla v buňce spíše rovnoměrně rozložena.

Z výsledků časosběrného snímání je patrné, že aktinový cytoskelet dvojité transgenní linie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} (Obr. 23H) je více svazkovaný nejen kolem jader, ale i v ostatních částech buňky, a v porovnání s transgenní linií GFP-FABD2 (Obr. 23D) je především v hrubších svazcích méně dynamický.



Obrázek 23. Struktura a uspořádání aktinových vláken v kortikální (povrchové) části (A, C) a centrální části (B, D) epidermálních buněk kořene *M. sativa* transgenní linie GFP-FABD2 (A, B) a dvojité transgenní linie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} (C, D). Šipky ukazují buňky laterální čepičky kořene, hroty šipek ukazují epidermální buňky, křížky značí kořenové vlásky, přerušovaná bílá čára značí jádro. Měřítka 20 μm (A), 10 μm (B-D).



Obrázek 24. Tři vybrané časové intervaly a jejich překryv ke stanovení dynamiky aktinového cytoskeletu epidermálních buněk kořene *M. sativa* transgenní linie GFP-FABD2 (A-D) a dvojité transgenní linie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} (E-H). A, E – začátek snímání; B, F – střed snímání; C, G – ukončení časového snímání; D, H – překryv tří kanálů. Šipky ukazují dynamická vlákna aktinu. Hroty šipek značí statická vlákna aktinu. Měřítka: 20 μm (A-D) a 10 μm (E-H).

5. DISKUSE

Základním a nejčastěji studovaným mechanismem signalizace u rostlin je kaskáda mitogenem-aktivovaných protein kináz (MAPK). Přenos signálu probíhá prostřednictvím fosforylace a defosforylace proteinů a může vést k aktivaci vývojových procesů, hormonálních regulací a obranných reakcí vůči biotickému i abiotickému stresu (Taj *et al.*, 2010; Šamajová *et al.*, 2013a). U *M. sativa* v rámci popsáných MAPK, patří mezi nejčastěji studovanou stresem indukovaná SIMK jako i její specifický aktivátor SIMKK, k jejichž aktivaci dochází působením solného stresu a elicitorů (Cardinale *et al.*, 2000; Kiegerl *et al.*, 2000; Jonak *et al.*, 2002).

Transgenní rostliny *M. sativa SIMKK-RNAi* mají sníženou expresi proteinu SIMKK a zároveň i sníženou expresi s ním spojeného proteinu SIMK, prostřednictvím RNA interference (Bekešová *et al.*, 2015; Hrbáčková *et al.*, 2021). U transgenních rostlin *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6} a *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} rovněž docházelo k nižší produkci proteinu SIMK, v porovnání s rostlinami sloužícími jako negativní kontrola (RSY, a transgenní linie tagRFP-TUA6, GFP-FABD2). Je zajímavé, že semikvantitativní analýzou produkce proteinu SIMK a fúzního proteinu tagRFP-TUA6 bylo zjištěno, že transgenní rostliny *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6} s nejnižší úrovní produkce SIMK zároveň vykazují částečně sníženou produkci fúzního proteinu tagRFP-TUA6. Naproti tomu nejvyšší expresi fúzního proteinu tagRFP-TUA6 vykazovaly transgenní rostliny *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6} č. 6 a 12, u nichž byla produkce proteinu SIMK snížena jen částečně. Tyto výsledky naznačují, že by exprese transgenu mohla určitým způsobem negativně ovlivňovat expresi fúzního proteinu. Výjimku však tvoří transgenní rostlina *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6} č. 8, u níž došlo ke snížení produkce proteinu SIMK na úroveň srovnatelnou s produkcí u kontrolních rostlin *SIMKK-RNAi*, a zároveň byla zachována poměrně vysoká exprese fúzního proteinu tagRFP-TUA6. Je tedy jasné, že tento předpoklad, jako možné vysvětlení tohoto faktu, bude nutné ještě ověřit. Podobné výsledky, naznačující negativní vliv transgenu na expresi fúzního proteinu, ukázala také semikvantitativní analýza proteinu SIMK a fúzního proteinu GFP-FABD2 u transgenních rostlin *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}. Dvojitě transgenní linie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2} se sníženou produkcí proteinu SIMK sice vykazovaly expresi fúzního proteinu GFP-FABD2, tato exprese však byla v porovnání s kontrolními rostlinami transgenní linie GFP-FABD2 značně snížena. Analýzy zaměřené na produkci proteinu tubulinu α ukázaly, že k expresi dochází u všech rostlin *M. sativa*, sloužících jako kontrola (kultivar Regen-SY a transgenní linie *SIMKK-RNAi* a tagRFP-TUA6) i u všech testovaných

dvojitých transgenních linií *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6} a úroveň produkce je mezi jednotlivými liniemi poměrně konstantní. Obdobné výsledky pak ukázala také analýza zaměřená na produkci proteinu aktinu u kontrolních (kultivar Regen-SY a transgenní linie *SIMKK-RNAi* a GFP-FABD2) a testovaných dvojitých transgenních linií *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}. Získaná data z těchto experimentů tedy naznačují, že exprese transgenu může mít negativní vliv na expresi fúzních proteinů tagRFP-TUA6 a GFP-FABD2, nijak však neovlivňuje expresi endogenního tubulinu α a aktinu. Pro potvrzení či vyvrácení těchto výsledků však bude nutné experimenty opakovat. Vzhledem k nescifickým vazbám jednotlivých protilátek bude nutné také optimalizovat dobu inkubace protilátek s membránou a případně i složení blokačního roztoku a délku samotné blokace. Bohužel u nově vytvořených dvojitých transgenních linií nebyly z časových důvodů dokončeny analýzy pro determinaci míry snížení exprese proteinů SIMK a SIMKK metodou semikvantitativní polymerázové řetězové reakce (PCR) v reálném čase, a proto nejsou součástí této diplomové práce.

Přesto, že doposud nebyla prokázána přímá fosforylace tubulinů prostřednictvím MAPK, je známo že u rostlin mohou MAPK ovlivňovat organizaci a dynamiku mikrotubulů prostřednictvím fosforylace a regulace mikrotubuly-vázajících proteinů (MAPs), jako jsou proteiny rodiny MAP65. Tyto proteiny hrají klíčovou roli při sestavování MT do svazků a sítí. Fosforylační místo proteinu MAP65-1 leží v jeho doméně pro navázání mikrotubulů („microtubule-binding domain“) a jeho fosforylace prostřednictvím MAPK tak snižuje afinitu MAP65-1 k povrchu mikrotubulů a způsobuje rozvolnění MT struktur, svazků či sítí (Smertenko *et al.*, 2004; Smertenko *et al.*, 2006; Komis *et al.*, 2011). Mezi tyto MAPK, zapojené do regulace cytoskeletu, patří mimo jiné již zmiňovaná MPK6 z *A. thaliana* vykazující vysokou homologii k proteinu SIMK. Její role souvisí zejména s určováním roviny buněčného dělení. U mutantních linií *mpk6* s chybějící funkcí MPK6 tak dochází ke změnám v orientaci této roviny a asymetrickému buněčnému dělení, kortikální mikrotubuly však viditelně narušeny nejsou (Müller *et al.*, 2010; Komis *et al.*, 2011). Mikroskopická analýza ukázala, že u dvojitých transgenních linií *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6} dochází k určitým změnám ve struktuře a organizaci kortikálních mikrotubulů, v porovnání s kontrolními transgenními liniemi tagRFP-TUA6. Z dvojitých transgenních linií byla jako reprezentativní vybrána rostlina číslo 1, která v předchozích biochemických analýzách vykazovala sníženou produkci proteinu SIMK, na úroveň srovnatelnou s produkcí u kontrolních rostlin *SIMKK-RNAi*, a zároveň vykazovala průměrnou hodnotu produkce fúzního proteinu tagRFP-TUA6 a proteinu

tubulinu α . Je zajímavé, že nasnímané mikrotubuly se jeví méně výrazné, kratší, navázané na sebe a spojené do silnějších svazků. Vzhledem k tomu, že se jedná o linie se sníženou produkcí proteinu SIMK, mohly by výsledky naznačovat určité zapojení tohoto proteinu do organizace mikrotubulů, např. právě prostřednictvím fosforylace některých MAPs. Snížená produkce této MAPK by mohla zapříčiňovat sníženou aktivaci substrátů (cílových proteinů) zodpovědných za rozvolňování MT svazků a sítí. Tyto hypotézy by však bylo nutné ověřit.

Mikrotubuly ale nejsou jedinými cytoskeletálními cíli aktivovaných MAPK. Signalizace prostřednictvím MAPK může ovlivňovat také organizaci a dynamiku aktinových mikrofilament. Konkrétně SIMK se v epidermálních buňkách kořene nachází především v jádrech. Bylo však prokázáno, že během vytváření a vývoje kořenových vlásků dochází k aktivaci a přesunu SIMK z jádra do cytoplazmy a do vrcholu rostoucích kořenových vlásků s hustou sítí aktinových filament. Zde SIMK dále fosforyluje a reguluje některé z aktin-vázajících proteinů, čímž ovlivňuje strukturu a dynamiku aktinového cytoskeletu a hraje klíčovou roli v růstu a vývoji kořenových vlásků (Baluška *et al.*, 2000; Šamaj *et al.*, 2002; Hrbáčková *et al.*, 2021). Transgenní linie *SIMKK-RNAi* se sníženou expresí proteinů SIMKK a SIMK vykazují snížený růst kořenových vlásků, a zpomalený růst a tvorbu nižšího podílu biomasy u nadzemní části (Hrbáčková *et al.*, 2021). Výsledky mikroskopické analýzy ukázaly, že u dvojitých transgenních linií *SIMKK-RNAi* ^{GFP-FABD2} dochází ke změnám v organizaci i dynamice aktinového cytoskeletu, v porovnání s kontrolními transgenními liniemi GFP-FABD2. Z dvojitých transgenních linií byla vybrána rostlina číslo 4, která v předchozích biochemických analýzách vykazovala nejnižší produkci proteinu SIMK, téměř srovnatelnou s produkcí u kontrolních rostlin *SIMKK-RNAi*. Z výsledků vyplývá, že snížená produkce proteinu SIMK, by mohla mít negativní vliv na organizaci aktinu, zejména na vytváření sítí kolem jader (tzv. aktinových košů) a mohla by souviset také se sníženou dynamikou aktinových vláken.

Je nutné vzít do úvahy, že preparáty byly připravovány z odřezaných částí kořenů. Pro potvrzení či vyvrácení těchto výsledků by však bylo potřeba zopakovat mikroskopické analýzy např. s využitím „light-sheet“ mikroskopie, při níž se snímá živá rostlina za optimálních fyziologických podmínek (Ovečka *et al.*, 2015; Vyplelová *et al.*, 2018; Ovečka *et al.*, 2022).

6. ZÁVĚR

Teoretická část této diplomové práce byla věnována zejména souhrnu informací o signalizaci u rostlin prostřednictvím MAPK kaskád. Konkrétně se soustředila na jejich klasifikaci, aktivaci a zapojení do vývojových a obranných reakcí, se zaměřením na *Medicago sativa*. Protože se v praktické části pracovalo s dvojitými transgenními liniemi se sníženou expresí proteinu SIMKK a s ním spojeného proteinu SIMK a s expresí markerů aktinového cytoskeletu a mikrotubulů, byl v další části teoretického úvodu popsán rostlinný cytoskelet včetně proteinů vázících se na aktin či mikrotubuly. Poslední kapitoly teoretické části práce pak byly věnovány samotnému procesu transformace rostlin prostřednictvím přímých a nepřímých metod.

V praktické části práce byla provedena transformace listových explantátů *M. sativa* transgenní linie tagRFP-TUA6 s fluorescenčně značenými mikrotubuly, pomocí translační fúze tagRFP k tubulinu α_6 , a transgenní linie GFP-FABD2 s fluorescenčně značeným aktinovým cytoskeletem, pomocí translační fúze GFP k aktin-vazebné doměně 2 proteinu fimbrinu, prostřednictvím bakteriální kultury *A. tumefaciens* nesoucí konstrukt pHellsgate12 SIMKKi, pro potlačení exprese proteinu SIMKK procesem RNA interference. Cílem byla indukce somatické embryogeneze a regenerace stabilních dvojitých transgenních linií *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6} a *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}. Snížená úroveň produkce proteinu SIMK byla ověřena kvalitativně a semikvantitativně metodou imunoblotování. S využitím imunoblotové analýzy byla rovněž detekována přítomnost a úroveň produkce fúzních proteinů a endogenního tubulinu a aktinu.

Pro dokumentaci struktury, uspořádání a dynamiky mikrotubulového a aktinového cytoskeletu byly připravené preparáty snímány pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu. Mikroskopickou analýzou kořenových explantátů rostlin dvojitě transgenní linie *SIMKK-RNAi*^{tagRFP-TUA6} byla zdokumentována struktura a uspořádání kortikálních mikrotubulů, přičemž byly pozorovány určité rozdíly v organizaci mikrotubulů, v porovnání s kontrolními rostlinami transgenní linie tagRFP-TUA6. Rozdíly ve struktuře a organizaci byly pozorovány také u aktinových mikrofilament, a to mezi kontrolními rostlinami transgenní linie GFP-FABD2 a dvojitě transgenní linie *SIMKK-RNAi*^{GFP-FABD2}. Mezi těmito liniemi byla zdokumentována také rozdílná dynamika aktinového cytoskeletu. Výsledky práce přispěly k charakterizaci těchto dvojitých transgenních linií, vytvořených v naší laboratoři, a přinesly první data k vlivu snížené exprese SIMKK a SIMK na cytoskelet u vojtěšky, která budou využita při dalších experimentech.

7. SEZNAM LITERATURY

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2015). *Molecular biology of the cell* (Sixth edition). Garland Science, Taylor and Francis Group.
- Andrási N., Rigó G., Zsigmond L., Pérez-Salamó I., Papdi C., Klement E., Pettkó-Szandtner A., Baba A.I., Ayaydin F., Dasari R., Cséplő A., Szabados L. (2019). The mitogen-activated protein kinase 4-phosphorylated heat shock factor A4A regulates responses to combined salt and heat stresses. *Journal of Experimental Botany* 70, 4903–4917.
- Arcalis E., Stadlmann J., Rademacher T., Marcel S., Sack M., Altmann F., Stoger E. (2013). Plant Species and Organ Influence The Structure and Subcellular Localization of Recombinant Glycoproteins. *Plant Molecular Biology* 83, 105-117.
- Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M. R., Chiu W. L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F. M., Sheen J. (2002). MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* 415, 977–983.
- Aung B., Gao R., Gruber M.Y., Yuan Z.C., Sumarah M., Hannoufa A. (2017). MsmiR156 Affects Global Gene Expression and Promotes Root Regenerative Capacity and Nitrogen Fixation Activity in Alfalfa. *Transgenic Research* 26, 541-557.
- Aung B., Gruber M., Amyot L., Omari K., Bertrand A., Hannoufa A. (2015a). Ectopic Expression of LjmiR156 Delays Flowering, Enhances Shoot Branching, and Improves Forage Quality in Alfalfa. *Plant Biotechnology Reports* 9, 1-15.
- Aung B., Gruber M., Amyot L., Omari K., Bertrand A., Hannoufa A. (2015b). MicroRNA156 as a Promising Tool for Alfalfa Improvement. *Plant Biotechnology Journal* 13, 779-790.
- Babaoglu M., Davey M. R., Power J. B. (2000). Genetic engineering of grainlegumes: key transformation events. *Agri. Biotech. Net.* 2, 1–12.
- Baluška F., Salaj J., Mathur J., Braun M., Jasper F., Šamaj J., Chua N. H., Barlow P.W., Volkmann D. (2000). Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges. *Development Biology* 227, 618–632.
- Barampuram S., Zhang ZJ. (2011). Recent advances in plant transformation. *Methods in Molecular Biology* 701, 1-35.
- Bayer M., Nawy T., Giglione C., Galli M., Meinnel T., Lukowitz W. (2009). Paternal control of embryonic patterning in Arabidopsis thaliana. *Science* 323, 1485–88.
- Beck M., Komis G., Ziemann A., Menzel D., Šamaj J. (2011). Mitogen-activated protein kinase 4 is involved in the regulation of mitotic and cytokinetic microtubule transitions in *Arabidopsis thaliana*. *The New Phytologist* 189, 1069–83.
- Bekešová, S., Komis, G., Křenek, P., Vyplelová, P., Ovečka, M., Luptovčíak, I., Illés, P., Kuchařová, A., Šamaj, J. (2015). Monitoring protein phosphorylation by acrylamide pendant Phos-TagTM in various plants. *Frontiers in Plant Science* 6, 336.
- Blondon F., Marie D, Brown S, Kondorosi A. (1994). Genome size and base composition in *Medicago sativa* and *M. truncatula* species. *Genom* 37, 264-70.
- Boller T., Felix G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60, 379–406.
- Böttcher C., Westphal L., Schmotz C., Prade E., Scheel D., Glawischnig E. (2009). The multifunctional enzyme CYP71B15 (PHYTOALEXIN DEFICIENT3) converts cysteine-indole-3-acetonitrile to camalexin in the indole-3-acetonitrile metabolic network of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant cell* 21, 1830–1845.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Bray D. (2001). *Cell Movements: From Molecules to Motility*, 2nd ed. New York: Garland Science.
- Breitler J.C., Labeyrie A., Meynard D., Legavre T., Guiderdoni E. (2002). Efficient microprojectile bombardment-mediated transformation of rice using gene cassettes. *Theoretical and Applied Genetics* 104, 709–719.

- Brouhard G.J., Stear J.H., Noetzel T.L., Al-Bassam J., Kinoshita K., Harrison S.C., Howard J., Hyman A.A. (2008). XMAP215 is a processive microtubule polymerase. *Cell* 132, 79-88.
- Bubb M.R., Spector I., Beyer B.B., Fosen K.M. (2000). Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization an explanation for certain in vivo observations. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 5163–5170.
- Calderini O., Glab N., Bergounioux C., Heberle-Bors E., Wilson C. (2001). A novel tobacco mitogenactivated protein (MAP) kinase kinase, NtMEK1, activates the cell cycle-regulated p43Ntf6 MAPkinase. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 18139–45.
- Campbell B.T., Baezinger P.S., Mitra A., Sato S., Clemente T. (2000). Inheritance of multiple genes in wheat. *Crop Science* 40, 1133–1141.
- Cardinale F., Jonak C., Ligterink W., Niehaus K., Boller T., Hirt H. (2000). Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *Journal of Biological Chemistry* 275, 36734-36740.
- Cardinale F., Meskiene I., Ouaked F., Hirt H. (2002). Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *The Plant cell* 14, 703–711.
- Crossway A., Oakes J.W., Irvine J.M., Ward B., Knauf V.C., Shewmaker C.K. (1986). Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Molecular and General Genetics* 202, 179–185.
- Dangl J. L., Jones J. D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826–833.
- Danquah A., de Zelicourt A., Colcombet J., Hirt H. (2013). The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology Advances* 32, 40–52.
- Daveya M.R., Anthonya P., Powera J.B., Loweb K.C. (2005). Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology Advances* 23, 131–171.
- Djamei A., Pitzschke A., Nakagami H., Rajh I., Hirt H. (2007). Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: abusing MAPK defense signaling. *Science* 318, 453–6.
- Dong C.H., Kost B., Xia G., Chua N.H. (2001a). Molecular identification and characterization of the Arabidopsis AtADF1, AtADFS and AtADF6 genes. *Plant Molecular Biology* 45, 517-27.
- Dong C.H., Xia G.X., Hong Y., Ramachandran S., Kost B., Chua N.H. (2001b). ADF proteins are involved in the control of flowering and regulate F-actin organization, cell expansion, and organ growth in Arabidopsis. *Plant Cell* 13, 1333-46.
- Dos Reis R.A., Keunen E., Mourato M.P., Martins L.L., Vangronsveld J., Cuypers A. (2018). Accession-specific life strategies affect responses in leaves of Arabidopsis thaliana plants exposed to excess Cu and Cd. *Journal of Plant Physiology* 223, 37–46.
- Dröbak B.K., Franklin-Tong V.E., Staiger C.J. (2004). The role of the actin cytoskeleton in plant cell signaling. *The New Phytologist* 163, 13-30.
- Evrard A., Kumar M., Lecourieux D., Lucks J., Koskull-Doring P.V., Hirt H. (2013). Regulation of the heat stress response in Arabidopsis by MPK6-targeted phosphorylation of the heat stress factor HsfA2. *PeerJ* 1:e59.
- Fischer R., Stoger E., Schillberg S., Christou P., Twyman R.M. (2004). Plant based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 152–158.
- Frame B.R., Drayton P.R., Bagnall S.V., Lewnau C.J., Bullock W.P., Wilson H.M., Dunwell J.M., Thompson J.A., Wang K. (1994). Production of fertile transgenic maize plants by silicon carbide whisker-mediated transformation. *Plant Journal* 6, 941–948.
- Friso G., van Wijk K.J. (2015). Posttranslational protein modifications in plant metabolism. *Plant Physiology* 169, 1469–1487.
- Gad A.E., Rosenberg N., Altman A. (1990). Liposome-mediated gene delivery into plant cells. *Physiologia Plantarum* 79, 177–183.
- Galjart N. (2010). Plus-end-tracking proteins and their interactions at microtubule ends. *Current Biology* 20, R528-37.
- Goddard R.H., Wick S.M., Silflow C.D., Snustad D.P. (1994). Microtubule Components of the Plant Cell Cytoskeleton. *Plant Physiology* 104, 1-6.

- Guan Y., Lu J., Xu J., McClure B., Zhang S. (2014). Two mitogen-activated protein kinases, MPK3 and MPK6, are required for funicular guidance of pollen tubes in Arabidopsis. *Plant Physiology* 165, 528–33.
- Gungabissoon R.A., Khan S., Hussey P.J. (2001). Interaction of elongation factor 1 alpha from *Zea mays* (ZmEF-1 alpha) with F-actin and interplay with the maize actin severing protein, ZmADF3. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 49, 104–11.
- Haak D. C., Fukao T., Grene R., Hua Z., Ivanov R., Perrella G., Li S. (2017). Multilevel Regulation of Abiotic Stress Responses in Plants. *Frontiers in plant science* 8, 1564.
- Hall J. L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53, 1–11.
- Hamada T. (2007). Microtubule-associated proteins in higher plants. *Journal of Plant Research* 120, 79-98.
- Hawkins C. and Yu L.-X. (2018). Recent progress in alfalfa (*Medicago sativa* L.) genomics and genomic selection. *The Crop Journal* 6, 565-575.
- Hématy K., Cherk C., Somerville S. (2009). Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 406–13.
- Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa*) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant Journal* 6, 271-282.
- Hoekema A., Hirsch P.R., Hooykaas P.J.J., Schilperoort R.A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Nature* 303, 179–180.
- Holm P.B., Olsen O., Schnorf M., BrinchPedersen H., Knudsen S. (2000). Transformation of barley by microinjection into isolated zygote protoplasts. *Transgenic Research* 9, 21–32.
- Hord C.L., Sun Y.J., Pillitteri L.J., Torii K.U., Wang H. (2008). Regulation of *Arabidopsis* early anther development by the mitogen-activated protein kinases, MPK3 and MPK6, and the ERECTA and related receptor-like kinases. *Molecular Plant* 1, 645–58.
- Howard J., Hudspeth A.J., Vale R.D. (1989). Movement of microtubules by single kinesin molecules. *Nature* 342, 154-8.
- Hrbáčková M., Luptovčíak I., Hlaváčková K., Dvořák P., Tichá M., Šamajová O., Novák D., Bednarz H., Niehaus K., Ovečka M., Šamaj J. (2021). Overexpression of alfalfa SIMK promotes root hair growth, nodule clustering and shoot biomass production. *Plant Biotechnology Journal* 19, 767–784.
- Huang S., Robinson R.C., Gao L.Y., Matsumoto T., Brunet A., Blanchoin L., Staiger C.J. (2005). *Arabidopsis* VILLIN1 generates actin filament cables that are resistant to depolymerization. *The Plant Cell* 17, 486–501.
- Hussey P.J., Ketelaar T., Deeks M.J. (2006). Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. *Annual Review of Plant Biology* 57, 109-25.
- Cheng M., Fry J.E., Pang S.Z., Zhou H.P., Hironaka C.M., Duncan D.R., Conner W., Wan Y. C. (1997). Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology* 115, 971-980.
- Cheng M., Lowe B.A., Spencer T.M., Ye, X., Armstrong C.L. (2004). Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 40, 31–45.
- Chinchilla D., Zipfel C., Robatzek S., Kemmerling B., Nurnberger T. (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defense. *Nature* 448, 497–500.
- Christie P.J. (1997). *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in Eubacteria. *Journal of Bacteriology* 179, 3085–3094.
- Christou P. (1995). Strategies for variety-independent genetic transformation of important cereals, legumes and woody species utilising particle bombardment. *Euphytica* 85, 13–27.
- Ichimura K., Casais C., Peck S. C., Shinozaki K., Shirasu K. (2006). MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 281, 36969–36976.

- Ichimura K., Mizoguchi T., Yoshida R., Yuasa T., Shinozaki K. (2000). Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant Journal* 24, 655–665.
- Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J., Henry Y., Champion A., Kreis M., Zhang S., Hirt H., Wilson C., Heberle-Bors E., Ellis B., Morris P., Innes R., Ecker J., Scheel D., Klessig D., Machida Y., Mundy J., Ohashi Y., Walker J., (MAPK Group). (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* 7, 301-308.
- Ishida Y., Saito H., Ohta S., Hiei Y., Komari T., Kumashiro, T. (1996). High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology* 4, 745-750.
- Ishikawa M., Soyano T., Nishihama R., Machida Y. (2002). The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase contains a functional nuclear localization signal at the binding site for the NACK1 kinesinlike protein. *The Plant Journal* 32, 789–98.
- Jia W., Li B., Li S., Liang Y., Wu X. (2016). Mitogen-activated protein kinase cascade MKK7-MPK6 plays important roles in plant development and regulates shoot branching by phosphorylating PIN1 in *Arabidopsis*. *PLoS Biology* 14, e1002550.
- Jiang Q., Fu C., Wang ZY. (2019). A Unified *Agrobacterium*-Mediated Transformation Protocol for Alfalfa (*Medicago sativa* L.) and *Medicago truncatula*. *Methods in Molecular Biology* 1864, 153-163.
- Jonak C., Kiegerl S., Ligterink W., Barker P.J., Huskisson N.S., Hirt H. (1996). Stress signaling in plants: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 11274–9.
- Jonak C., Nakagami H., Hirt H. (2004). Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiology* 136, 3276-3283.
- Jonak C., Okrész L., Bögre L., Hirt H. (2002). Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 415–424.
- Jones J. D., Dangl J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329.
- Jones-Villeneuve E., Huang B., Prudhome I., Bird S., Kemble R., Hattori J., Miki B. (1995). Assessment of microinjection for introducing DNA into uninuclear microspores of rapeseed. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 40, 97–100.
- Joo S., Liu Y., Lueth A., Zhang S. (2007). MAPK phosphorylation-induced stabilization of ACS6 protein is mediated by the non-catalytic C-terminal domain, which also contains the cis-determinant for rapid degradation by the 26 S proteasome pathway. *The Plant Journal* 54, 129–40.
- Kaeppeler HE, Gu W, Somers DA, Rines HW, Cockburn AE. (1990). Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into plant cells. *Plant Cell Report* 9, 415–8.
- Kaeppeler H., Somers D.A., Rines H.W., Cockburn A.F. (1992). Silicon carbide fiber-mediated stable transformation of plant cells. *Theoretical and Applied Genetics* 84, 560–566.
- Keshavareddy G., Kumar A.R.V., Vemanna S. R. (2018). Methods of Plant Transformation- A Review *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 7, 2656-2668.
- Kiegerl S., Cardinale F., Siligan C., Gross A., Baudouin E., Liwosz A., Eklöf S., Till S., Bögre L., Hirt H., Meskiene I. (2000). SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. *The Plant Cell* 12, 2247–2258.
- Kikkert J., Vidal J., Reisch B. (2005). Stable transformation of plant cells by particle bombardment/biolistics. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 286, 61-78.
- Kim J.M., Woo D.H., Kim S.H., Lee S.Y., Park H.Y., Seok H.Y., Chung W., Moon Y.H. (2012). *Arabidopsis* MKKK20 is involved in osmotic stress response via regulation of MPK6 activity. *Plant Cell Reports* 31, 217–224.
- Kim S.H., Woo D.H., Kim J.M., Lee S.Y., Chung W.S., Moon Y.H. (2011). *Arabidopsis* MKK4 mediates osmotic-stress response via its regulation of MPK3 activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 412, 150–154.

- Kohoutová L., Kourová H., Nagy S.K., Volc J., Halada P. (2015). The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase 6 is associated with γ -tubulin on microtubules, phosphorylates EB1c and maintains spindle orientation under nitrosative stress. *The New Phytologist* 207, 1061–74.
- Komari T. (1990). Transformation of cultured cells of *Chenopodium quinoa* by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulence region of pTiBo542. *Plant Cell Report* 9, 303–306.
- Komis G., Illés P., Beck M., Šamaj J. (2011). Microtubules and mitogen-activated protein kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 14, 650–7.
- Komis G., Šamajová O., Ovečka M., Šamaj J. (2018). Cell and Developmental Biology of Plant Mitogen-Activated Protein Kinases. *Annual Review of Plant Biology* 69, 237–265.
- Kovar D.R., Gibbon B.C., McCurdy D.W., Staiger C.J. (2001). Fluorescently-labeled fimbrin decorates a dynamic actin filament network in live plant cells. *Planta* 213, 390–95.
- Kovar D.R., Staiger C.J., Weaver E.A., McCurdy D.W. (2000). AtFim1 is an actin filament crosslinking protein from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 24, 625–36.
- Kubinieć R. T., Liang H., Hui S. W. (1990). Effects of pulse length and pulse strength on transfection by electroporation. *BioTechniques* 8, 16–20.
- Kumar K., Kumar M., Kim S. R., Ryu H., Cho Y. G. (2013). Insights into genomics of salt stress response in rice. *Rice (New York, N.Y.)* 6, 27.
- Kumar K., Raina S.K., Sultan S.M. (2020). *Arabidopsis* MAPK signaling pathways and their cross talks in abiotic stress response. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 29, 700–714.
- Lamb J.F.S., Sheaffer C.C., Rhodes L.H., Mark Sulc R., Underander D.J., Brummer E.C. (2006). Five Decades of Alfalfa Cultivar Improvement: Impact on Forage Yield, Persistence, and Nutritive Value. *Crop Science* 46, 902–909.
- Lewis, S.A., Wang D., Cowan N.J. (1988). Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule-binding motif with tau protein. *Science* 242, 936–939.
- Li H, Xu H, Zhou Y, Zhang J, Long C., Li S., Chen S., Zhou J., Shao F. (2007). The phosphothreonine lyase activity of a bacterial type III effector family. *Science* 315, 1000–3.
- Li L., Qu R., Kochko A., Fauquet C. M., Beachy R. N. (1993). An improved rice transformation system using the biolistic approach. *Plant Cell Report* 12, 50–55.
- Li R., Guo C., Li X., Gu J., Lu W., Xiao K. (2011). Plant mitogenactivated protein kinases and their roles in mediation of signal transduction in abiotic stresses. *Frontiers of Agriculture in China* 5, 187–195.
- Li Y., Cai H., Liu P., Wang C., Gao H., Wu C., Yan K., Zhang S., Huang J., Zheng C. (2017). Arabidopsis MAPKKK18 positively regulates drought stress resistance via downstream MAPKK3. *Biochemical a Biophysical Research Communications* 484, 292–297.
- Liu W., Aung B., Hannoufa A., Xing T., Tian L. (2018). Recent Progress of Transgenic Technology Development for Alfalfa. *American Journal of Plant Sciences* 9, 467–482.
- Liu Y., Schiff M., Dinesh-Kumar S.P. (2004a). Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY-/MYB transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant Journal* 38, 800–9.
- Liu Y., Zhang S. (2004b). Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ET biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16, 3386–99.
- López-Bucio J.S., Dubrovsky J.G., Raya-Gonzalez J., Ugartechea-Chirino Y., López-Bucio J. (2014). *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *Journal of Experimental Botany* 65, 169–83.
- López-Bucio J.S., Salmerón-Barrera G.J., Ravelo-Ortega G., Raya-González J., León P., de la Cruz H.R., Campos-García J., López-Bucio J., Guevara-García A. (2019). Mitogen-activated protein kinase 6 integrates phosphate and iron responses for indeterminate root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 250, 1177–1189.
- Lukowitz W., Roeder A., Parmenter D., Somerville C. (2004). A MAPKK kinase gene regulates extraembryonic cell fate in *Arabidopsis*. *Cell* 116, 109–19.

- Mao G., Meng X., Liu Y., Zheng Z., Chen Z., Zhang S. (2011). Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23, 1639–53.
- Matsuoka D., Nanmori T., Sato K.I., Fukami Y., Kikkawa U., Yasuda T. (2002). Activation of AtMEK1, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase, in vitro and in vivo: analysis of active mutants expressed in *E. coli* and generation of the active form in stress response in seedlings. *The Plant Journal* 29, 637–647.
- Mayer U., Jürgens G. (2002). Microtubule cytoskeleton: a track record. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 494-501.
- Mitchison T., Kirschner M. (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312, 237-42.
- Mohanta T.K., Mohanta N., Parida P., Panda S.K., Ponpandian L.N., Bae H. (2016). Genome-Wide Identification of Mitogen-Activated Protein Kinase Gene Family across Fungal Lineage Shows Presence of Novel and Diverse Activation Loop Motifs. *PLoS One* 11, e0149861.
- Moustafa K., AbuQamar S., Jarrar M., Al-Rajab A.J., Trémouillaux-Guiller J. (2014). MAPK cascades and major abiotic stresses. *Plant Cell Reports* 33, 1217–1225.
- Moustafa K., Lefebvre-De Vos D., Leprince A.S., Savoure A., Lauriere C. (2008). Analysis of the *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase families: organ specificity and transcriptional regulation upon water stresses. *Scholarly Research Exchange Article ID: 143656*.
- Mullins R.D., Heuser J.A., Pollard T.D. (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 6181–6186.
- Müller J., Beck M., Mettbach U., Komis G., Hause G. (2010). *Arabidopsis* MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *The Plant Journal* 61, 234–48.
- Nagatani N., Honda H., Shimada T., Kobayashi T. (1997). DNA delivery into rice cells and transformation using silicon carbide whiskers. *Biotechnology Techniques* 11, 781–786.
- Ning J., Zhang B., Wang N., Zhou Y., Xiong L. (2011). Increased leaf angle1, a Raf-like MAPKKK that interacts with a nuclear protein family, regulates mechanical tissue formation in the Lamina joint of rice. *Plant Cell* 23, 4334–47.
- Nishihama R., Ishikawa M., Araki S., Soyano T., Asada T., Machida Y. (2001). The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase is a regulator of cell-plate formation in plant cytokinesis. *Genes and Development* 15, 352–63.
- Ostergaard L., Petersen M., Mattsson O., Mundy J. (2002). An *Arabidopsis* callose synthase. *Plant Molecular Biology* 49, 559–66.
- Ovečka M., Sojka J., Tichá M., Komis G., Basheer J., Marchetti C., Šamajová O., Kuběnová L., Šamaj J. (2022). Imaging plant cells and organs with light-sheet and super-resolution microscopy. *Plant Physiology* 188, 683-702.
- Ovečka M., Takáč T., Komis G., Vadovič P., Bekešová S., Doskočilová A., Smékalová 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, 2335–2350.
- Ovečka M., Vaškebová L., Komis G., Luptovčíak I., Smertenko A., Šamaj J. (2015). Preparation of plants for developmental and cellular imaging by light-sheet microscopy. *Nature Protocols* 10, 1234-47.
- Patharkar O.R., Walker J.C. (2016). Core mechanisms regulating developmentally timed and environmentally triggered abscission. *Plant Physiology* 172, 510–20.
- Pitzschke A., Datta S., Persak H. (2014). Salt stress in *Arabidopsis*: lipid transfer protein AZI1 and its control by mitogen-activated protein kinase MPK3. *Molecular plant* 7, 722–738.
- Qiu J.L., Fiil B.K., Petersen K., Nielsen H.B., Botanga C.J. (2008). *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *The EMBO Journal* 27, 2214–21.

- Radovic J., Lagic Z., Jevtic G., Mrfat-Vukelic S., Ignjatovic S. (2003). Variability for production and morphological traits of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 39, A1-A3. (Special issue).
- Radovic J., Sokolovic D., Markovic J. (2009). Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnology in Animal Husbandry* 25, 465–475.
- Rakoczy-Trojanowska M. (2002). Alternative methods of plant transformation – a short review. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7, 849–858.
- Ramirez-Zavaleta C.Y., Garcia-Barrera L.J., Rodriguez-Verástegui L.L., Arrieta-Flores D., Gregorio-Jorge J. (2022). An Overview of PRR- and NLR-Mediated Immunities: Conserved Signaling Components across the Plant Kingdom That Communicate Both Pathways. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 12974.
- Raza A., Razzaq A., Mehmood S.S., Zou X., Zhang X., Lv H., Xu J. (2019). Impact of climate change on crops adaptation and strategies to tackle its outcome: a review. *Plants* 8, 34.
- Ren D., Yang K.Y., Li G.J., Liu Y., Zhang S. (2006). Activation of Ntf4, a tobacco mitogen-activated protein kinase, during plant defense response and its involvement in hypersensitive response-like cell death. *Plant Physiology* 141, 1482–93.
- Rivera A. L., Gomez-Lim M., Fernandez F., Loske A. M. (2012). Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews* 9, 308–345.
- Rodriguez M. C., Petersen M., Mundy J. (2010). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 61, 621-49.
- Rogers E.E., Glazebrook J., Ausubel F.M. (1996). Mode of action of the *Arabidopsis thaliana* phytoalexin camalexin and its role in *Arabidopsis*-pathogen interactions. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 9, 748-57.
- Rubin C.I., Atweh G.F. (2004). The role of stathmin in the regulation of the cell cycle. *Journal of Cellular Biochemistry* 93, 242-50.
- Salmenkallio-Marttila M., Aspegren K., Kerman S., Kurt U., Mannonen L., Ritala A., Teeriz T.H., Kauppinen V. (1995). Transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) by electroporation of protoplasts *Plant Cell Report* 15, 301–304.
- Sanford J.C. (1990). Biolistic plant transformation. *Physiologia Plantarum* 79, 206–209.
- Sanford J. C., Klein T. M., Wolf E. D., Allen N. (1987). Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology* 5, 27-37.
- Sangwan V., Orvar B.L., Beyerly J., Hirt H., Dhindsa R.S. (2002). Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *The Plant Journal* 31, 629–638.
- Sasabe M., Soyano T., Takahashi Y., Sonobe S., Igarashi H. (2006). Phosphorylation of NtMAP65–1 by a MAP kinase down-regulates its activity of microtubule bundling and stimulates progression of cytokinesis of tobacco cells. *Genes and Development* 20, 1004–14.
- Sawahel W.A. (2001). Stable genetic transformation of cotton plants using polybrene spermidine treatment. *Plant Molecular Biology Reporter* 19, 377a–377f.
- Sharp D.J., Ross J.L. (2012). Microtubule-severing enzymes at the cutting edge. *Journal of Cell Science* 125, 2561-9.
- Sheahan M.B., Staiger C.J., Rose R.J., McCurdy D.W. (2004). A green fluorescent protein fusion to actin-binding domain 2 of *Arabidopsis* fimbrin highlights new features of a dynamic actin cytoskeleton in live plant cells. *Plant Physiology* 136, 3968–78.
- Shen L., Zhuang B., Wu Q., Zhang H., Nie J., Jing W., Yang L., Zhang W. (2019). Phosphatidic acid promotes the activation and plasma membrane localization of MKK7 and MKK9 in response to salt stress. *Plant Science* 287, 110190.
- Shimamoto K., Teralda R., Izawa T., Fujimoto H. (1989). Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* 338, 274–276.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2007). Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58, 221–227.
- Shun-Wu Y., Ke-Xaun T. (2004). MAP kinase cascades responding to environment stress in plants. *Acta Botanica Sinica* 46, 127-36.

- Schmidt M.A., Lafayette P.R., Artelt B.A., Parrott W.A. (2008). A comparison of strategies for transformation with multiple genes via microprojectile-mediated bombardment. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 44, 162–168.
- Singh N., Chawla H.S. (1999). Use of silicon carbide fibers for Agrobacterium mediated transformation in wheat. *Current Science* 76, 1483–1485.
- Směkalová V., Luptovčíak I., Komis G., Šamajová O., Ovečka M. (2014). Involvement of YODA and mitogen activated protein kinase 6 in Arabidopsis post-embryonic root development through auxin up-regulation and cell division plane orientation. *The New Phytologist* 203, 1175–93.
- Smertenko A.P., Chang H.Y., Sonobe S., Fenyk S.I., Weingartner M., Bögre L., Hussey P.J. (2006). Control of the AtMAP65-1 interaction with microtubules through the cell cycle. *Journal of Cell Science* 119, 3227–37.
- Smertenko A.P., Chang H.Y., Wagner V., Kaloriti D., Fenyk S., Sonobe S., Lloyd C., Hauser M.T., Hussey P.J. (2004). The Arabidopsis microtubule-associated protein AtMAP65-1: molecular analysis of its microtubule bundling activity. *Plant Cell* 16, 2035–2047.
- Song Y., Lv J., Ma Z., Dong W. (2019). The mechanism of alfalfa (*Medicago sativa* L.) response to abiotic stress. *Plant Growth Regulation* 89, 239–249.
- Stanko V., Giuliani C., Retzer K., Djamei A., Wahl V. (2014). Timing is everything: Highly specific and transient expression of a MAP kinase determines auxin-induced leaf venation patterns in Arabidopsis. *Molecular Plant* 7, 1637–52.
- Stefanova G., Slavov S., Gecheff K., Vlahova M., Atanassov A. (2013). Expression of Recombinant Human Lactoferrin in Transgenic Alfalfaplants. *Biologia Plantarum* 57, 457–464.
- Šamaj J., Ovečka M., Hlavacka A., Lecourieux F., Meskiene I., Lichtscheidl I., Lenart P., Salaj J., Volkmann D., Bögre L., Baluška F., Hirt H. (2002). Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *EMBO Journal* 21, 3296–3306
- Šamajová O., Komis G., Šamaj J. (2013a). Emerging topics in the cell biology of mitogen-activated protein kinases. *Trends in Plant Science* 18, 140–8.
- Šamajová O., Plíhal O., Al-Yousif M., Hirt H., Šamaj J. (2013b). Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. *Biotechnology Advances* 31, 118–128.
- Taj G., Agarwal P., Grant M., Kumar A. (2010). MAPK machinery in plants: recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways. *Plant Signaling and Behavior* 5, 1370–8.
- Taylor N.J., Fauquet C.M. (2002). Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA and Cell Biology* 21, 963–977.
- Teige M., Scheikl E., Eulgem T., Dóczi R., Ichimura K., Shinozaki K., Dangl J. L., Hirt H. (2004). The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. *Molecular Cell* 15, 141–152.
- Tichá M., Illésová P., Hrbáčková M., Basheer J., Novák D., Hlaváčková K., Šamajová O., Niehaus K., Ovečka M., Šamaj J. (2020). Tissue culture, genetic transformation, interaction with beneficial microbes, and modern bio-imaging techniques in alfalfa research. *Critical Reviews in Biotechnology* 40, 1265–1280.
- Torricelli, R., (2006). Evaluation of lucerne varieties for organic agriculture. Proceedings 26th EUCARPIA Fodder Crops and Amenity Grasses Section Meeting, 141–144.
- Tzfira T., Citovsky V. (2006). Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 17, 147–154.
- Ueda M., Aichinger E., Gong W., Groot E., Verstraeten I. (2017). Transcriptional integration of paternal and maternal factors in the Arabidopsis zygote. *Genes and Development* 31, 617–27.
- Vain P. (2007). Thirty years of plant transformation technology development. *Plant Biotechnology Journal* 5, 221–229.
- Vaughan GL, Jordan J, Karr S. (1991). The toxicity, in vitro, of silicon carbide whiskers. *Environmental Research* 56, 57–67.

- Virk N., Li D., Tian L., Huang L., Hong Y., Li X., Zhang Y., Liu B., Zhang H., Song F. (2015). Arabidopsis Raf-like mitogen-activated protein kinase kinase gene Raf43 is required for tolerance to multiple abiotic stresses. *PLoS ONE* 10.
- Voigt B., Timmers A.C., Samaj J., Müller J., Baluska F., Menzel D. (2005). GFP-FABD2 fusion construct allows in vivo visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of Arabidopsis seedlings. *European Journal of Cell Biology* 84, 595-608.
- Volenc J.J., Cunningham S.M., Haagenson D.M., Berg W.K., Joern B.C. Wiersma D.W. (2002). Physiological Genetics of Alfalfa Improvement: Past Failures, Future Prospects. *Field Crops Research* 75, 97-110.
- Voronin V., Aionesei T., Limmongkon A., Barinova I., Touraev A. (2004). The MAP kinase kinase NtMEK2 is involved in tobacco pollen germination. *FEBS Letters* 560, 86–90.
- Vyplelová P., Ovečka M., Komis G., Šamaj J. (2018). Advanced microscopy methods for bioimaging of mitotic microtubules in plants. *Methods in Cell Biology* 145, 129-158.
- Wang D., Khurshid M., Sun Z.M., Tang X.Y., Zhou M.L., Wu Y.M. (2016). Genetic Engineering of Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Protein and Peptide Letters* 23, 495-502.
- Wang L., Ma K.B., Lu Z.G., Ren S.X., Jiang H.R., Cui J.W., Chen G., Teng N.J., Lam H.M., Jin B. (2020). Differential physiological, transcriptomic and metabolomic responses of Arabidopsis leaves under prolonged warming and heat shock. *BMC Plant Biology* 20, 86.
- Wang X., Mao T. (2019). Understanding the functions and mechanisms of plant cytoskeleton in response to environmental signals. *Current Opinion in Plant Biology* 52, 86-96.
- Weaver JC, Chizmadzhev YA. (1996). Theory of electroporation: a review. *Biochemistry and Bioenergetics* 41, 135–60.
- Wordragen M.V., Roshani S., Ruud V., Regis P., Abvan K., Pim Z. (1997). Liposome-mediated transfer of YAC DNA to tobacco cells. *Plant Molecular Biology Reporter* 15, 170–178.
- Xu J., Li Y., Wang Y., Liu H., Lei L., Yang H. (2008). Activation of MAPK Kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 26996-7006.
- Yanagawa Y., Yoda H., Osaki K., Amano Y., Aono M., (2016). Mitogen-activated protein kinase 4-like carrying an MEY motif instead of a TXY motif is involved in ozone tolerance and regulation of stomatal closure in tobacco. *Journal of Experimental Botany* 67, 3471–79.
- Yeh C. M., Chien P. S., Huang H. J. (2007). Distinct signalling pathways for induction of MAP kinase activities by cadmium and copper in rice roots. *Journal of Experimental Botany* 58, 659-671.
- Yi J., Lee Y.S., Lee D.Y., Cho M.H., Jeon J.S., An G. (2016). *OsMPK6* plays a critical role in cell differentiation during early embryogenesis in *Oryza sativa*. *Journal of Experimental Botany* 67, 2425–37.
- Yu L., Nie J., Cao C., Jin Y., Yan M., Wang F., Liu J., Xiao Y., Liang Y., Zhang W. (2010). Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in Arabidopsis thaliana. *The New Phytologist* 188, 762–773.
- Zeng Q., Chen J.G., Ellis B.E. (2011a). AtMPK4 is required for male-specific meiotic cytokinesis in Arabidopsis. *The Plant Journal* 67, 895–906.
- Zeng Q., Sritubtim S., Ellis B.E. (2011b). AtMKK6 and AtMPK13 are required for lateral root formation in Arabidopsis. *Plant Signaling and Behavior* 6, 1436–39.
- Zhang S., Klessig D.F. (1998). The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 95, 7225–30.
- Zhou C., Cai Z., Guo Y., Gan S. (2009). An Arabidopsis mitogen-activated protein kinase cascade, MKK9-MPK6, plays a role in leaf senescence. *Plant Physiology* 150, 167-77.
- Zigmond S.H. (2004). Formin-induced nucleation of actin filaments. *Current Opinion in Cell Biology* 16, 99–105.
- Zupan J., Muth T.R., Draper O., Zambryski P. (2000). The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant Journal* 23, 11–28.

8. SEZNAM ZKRATEK

2,4-D	kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABD	aktin-vazebná doména (z angl. actin-binding domain)
ABPs	aktin-vázající proteiny (z angl. actin-binding proteins)
ACC	z angl. aminocyclopropane-1-carboxylic acid
ACS	z angl. aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase
ADF	aktin-depolymerizující faktor (z angl. actin-depolymerizing factor)
ADP	adenosindifosfát
AMK	aminokyseliny
ANPs	z angl. <i>Arabidopsis</i> nucleus- and phragmoplast- localized kinases
APS	peroxodisíran amonný (z angl. ammonium persulfate)
ASPs	z angl. actin-severing proteins
ATP	adenosintrifosfát
AZI1	z angl. azelaic acid induced 1
BAK1	z angl. BRI1-associated kinase
bp	pár bází (z angl. base pair)
BSA	hovězí (bovinní) sérový albumin
γ-TuC	γ -tubulin komplex
Ca²⁺	kation vápenatý
Cd	kadmium
CDPKs	z angl. calcium-dependent protein kinases
Cu	měď
CuCl₂	chlorid měďnatý
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
DTT	dithiotreitol
EB1c	z angl. end binding protein 1c
ECL	elektro-chemiluminiscenční substrát
EDTA	kyselina 2,2',2'',2'''-(ethan-1,2-diyl dinitrilo)tetraoctová
EGTA	ethylenglykol-bis (2-aminoethylether) – N, N, N', N' tetraoctová kyselina

EF	elongační faktor
ETI	z angl. effector-triggered immunity
F-aktin	filamentární aktin
Flg22	flagellin 22
FLS2	z angl. flagell sensing 2
FRK1	z angl. flg22-induced receptor kinase 1
G-aktin	globulární aktin
GCP4	z angl. gamma tubulin complex protein 4
GDP	guanosindifosfát
GFP	zelený fluorescenční protein (z angl. green fluorescent protein)
GFP-FABD2	amino-terminální fúze zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) k aktin-vazebné doméně 2 (ABD 2) proteinu Fimbrinu 1 z <i>Arabidopsis thaliana</i> .
GTP	guanosintrifosfát
H⁺	kation vodíku
H₂O	voda
HAMK	tepelným šokem aktivovaná mitogenem-aktivovaná proteinkinasa (z angl. heat shock-activated MAPK)
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin]ethansulfonová kyselina
HR	hypersenzitivní odpověď
HSF	z angl. heat-shock factor
HSP	z angl. heat-shock protein
ILA1	z angl. increased leaf angle 1
KIN	kinetin
KLP	proteiny podobné kinesinu
LB	médium pro kultivaci bakterií (z angl. Lysogeny broth)
LRR	z angl. leucine-rich repeat
M-fáze	mitotická fáze
<i>M. sativa</i>	<i>Medicago sativa</i> L ssp.
<i>M. truncatula</i>	<i>Medicago truncatula</i> Gaether
MAPs	proteiny asociované s mikrotubuly (z angl. microtubule-associated proteins)
MAP2K	mitogenem-aktivovaná proteinkinasa
MAP3K	mitogenem-aktivovaná proteinkinasa

MAPK	mitogenem-aktivovaná proteinkinasa
MAPKK	mitogenem-aktivovaná proteinkinasakinas
MAPKKK	mitogenem-aktivovaná proteinkinasakinasakinas
MEK	mitogenem-aktivovaná proteinkinasakinas
MEKK	mitogenem-aktivovaná proteinkinasakinasakinas
MEY	motiv methionin-kyselina glutamová-tyrozin
MilliQ H₂O	purifikovaná voda technologií společnosti Millipore Corporation
MKK	mitogenem-aktivovaná proteinkinasakinas
MKS1	MAP kinase substrate 1
MMK	mitogenem-aktivovaná proteinkinasa z <i>Medicago sativa</i>
MPK	mitogenem-aktivovaná proteinkinasa
mRFP	červený fluorescenční protein monomer (z angl. red fluorescent protein monomer)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (z angl. messenger ribonucleic acid)
MS	Murashige and Skoog médium
MT	mikrotubuly
MYB41	z angl. Myb domain protein 41
Na⁺	kation sodíku
NAA	kyselina alfa-naftalenacetátová
NB	z angl. nucleotide-binding
NLR	z angl. nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors; NOD-like receptors
NPK1	z angl. nucleus- and phragmoplast-localized kinase1
Obr.	obrázek
OD₆₀₀	optická hustota při 600 nm
PA	kyselina fosfatidová
PAD3	z angl. phytoalexin deficient 3
PAMP	z angl. pathogen-associated molecular patterns
PEG	polyethylenglykol
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových kationtů
PIN1	z angl. PINFORMED1

PM	plazmatická membrána
<i>pMAT</i>	linie <i>A. thaliana</i> stabilně exprimující protein GFP
POK1	z angl. phragmoplast orienting kinesin 1
PR	proteiny rezistence (z angl. pathogenesis-related proteins)
PRKK	z angl. pathogen-responsive MAPKK
PRR	z angl. pattern recognition receptors
PTI	z angl. PAMP-triggered immunity
PVDF	polyvinylidendifluorid
R-proteiny	proteiny rezistence
R-geny	geny rezistence
RB	elektrodotový pufr (z angl. running buffer)
RLKs	z angl. receptor like-kinases
RLPs	z angl. receptor like-proteins
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
RNAi	RNA interference
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)
RPM	otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
SAMK	stresem aktivovaná mitogenem aktivovaná proteinkinasa
SCMT	transformace pomocí vláken karbidu křemíku (z angl. silicon carbide-mediated transformation)
SH	Schenk and Hildebrant médium
SIMK	solným stresem indukovaná mitogenem aktivovaná proteinkinasa
SIMKK	stresem indukovaná mitogenem aktivovaná proteinkinasakinas
SIPK	kyselinou salicylovou indukovaná mitogenem aktivovaná proteinkináza (z angl. salicylic acid-induced protein kinase)
SOS1	antiportér (z angl. salt overlay sensitive1)
TBS-T	Tris-HCl solný pufr + Tween 20 (z angl. tris buffered saline + Tween 20)
T-DNA	transferová deoxyribonukleová kyselina (z angl. transfer deoxyribonucleic acid)
Tab.	tabulka

tagRFP-TUA6	amino-terminální fúze červeného fluorescenčního proteinu (tagRFP) k tubulinu α -6
TDY	motiv threonin-kyselina aspargová-tyrozin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TEY	motiv threonin-kyselina glutamová-tyrozin
TGY	motiv threonin-glycin-tyrozin
Ti	tumor indukující (z angl. tumor inducing)
TMV	virus mozaiky tabáku
TPY	motiv threonin-prolin-tyrozin
TR	transgenní rostliny
UV	ultrafialové záření (z angl. ultraviolet)
VIP1	z angl. VirE1-interacting protein 1
Vir	faktory virulence
WIPK	poraněním indukovaná mitogenem-aktivovaná proteinkináza (z angl. wound induced protein kinase)
WRKY	transkripční faktory (název odvozen od sekvence heptapeptidu WRKYGQK N-terminálního konce TF)
ZAT6	z angl. zinc finger of <i>Arabidopsis thaliana</i> 6
ZAT12	z angl. zinc finger of <i>Arabidopsis thaliana</i> 12
ZFNs	nukleázy zinkového prstu