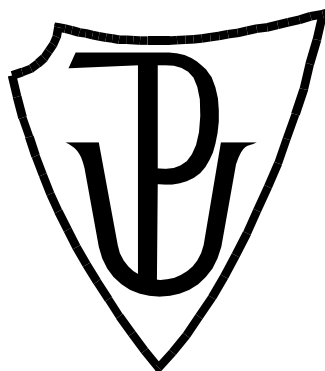


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Oddělení buněčné biologie

Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum



**Stabilní transformace fluorescenčně značené
mitogen-aktivované proteinkinasy MMK2 do rostlin
*Medicago sativa***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: **Bc. Eva Kodadová**
Studijní program: N0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství
Specializace: Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Mgr. Dominik Novák, Ph.D.**
Rok: 2021

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/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....

Poděkování

„Ráda bych poděkovala vedoucímu své diplomové práce, panu Mgr. Dominikovi Novákovi, Ph.D., za jeho ochotu, odborné rady a věnovaný čas při práci na teoretické i experimentální části. Také bych chtěla poděkovat paní Kataríně Takáčové za spolupráci při přípravě rostlinného materiálu. Dále bych ráda poděkovala prof. RNDr. Jozefovi Šamajovi, DrSc. a kolektivu Oddělení buněčné biologie za možnost práci vypracovat a za odbornou pomoc. Tato práce byla podpořena z projektu OP VVV CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000827 „Rostliny jako prostředek udržitelného globálního rozvoje“ (2018–2022) a IGA_PrF_2020_025 "Vývoj embrya a endospermu je ovlivňováno YODA-HSP90 signální kaskádou v *Arabidopsis thaliana*".“

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora	Bc. Eva Kodadová
Název práce	Stabilní transformace fluorescenčně značené mitogen-aktivované proteinkinasy MMK2 do rostlin <i>Medicago sativa</i>
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Oddělení buněčné biologie CRH
Vedoucí práce	Mgr. Dominik Novák, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

Tolice vojtěška (*Medicago sativa* L.) je významná zemědělská plodina, využívaná k výkrmu hospodářských zvířat, produkci biomasy a také k přirozenému zúrodnování půdy dusíkatými sloučeninami. Studium její fyziologie napomáhá jejímu efektivnějšímu využívání a poskytuje potřebné informace pro biotechnologické vylepšení její odolnosti, výnosnosti a dalších zemědělsky užitných vlastností. Tato diplomová práce se zabývá *Agrobacterium*-zprostředkovanou transformací vojtěšky geny fluorescenčně značené mitogen-aktivované proteinkinasy MMK2. K transformaci byly využity plazmidy nesoucí konstrukty *proMMK2::GFP:cMMK2*, *35S::GFP:cMMK2* a *AtUBQ10::GFP:cMMK2*. Získané transgenní rostliny mohou sloužit k následujícímu studiu lokalizace, aktivity a funkce MMK2. MMK2 je jedním z článků mitogen-aktivovaných proteinkinasy signálních drah a je popsáno její zapojení do odpovědi na biotický a abiotický stres. Všechny mechanismy a komponenty těchto drah ale nejsou dosud známy a proto je nutné jejich další zkoumání.

Klíčová slova	Transformace, <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , mitogen-aktivované proteinkinasy, MAPK, MMK2, <i>Medicago sativa</i> , vojtěška, alfalfa
Počet stran	77
Počet příloh	0
Jazyk	Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname	Bc. Eva Kodadová
Title	Stable transformation of <i>Medicago sativa</i> plants with fluorescently labeled mitogen-activated protein kinase MMK2
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Cell Biology CRH
Supervisor	Mgr. Dominik Novák, Ph.D.
The year of presentation	2021

Abstract

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) is an important crop used as forage to feed grazing livestock, for biomass production and also for natural improvement of soil quality by the production of nitrogen compounds. Studying of alfalfa physiology provides better understanding of its molecular mechanisms. These findings provide information essential for biotechnological improvement of a wide range of traits. This diploma thesis describes the *Agrobacterium*-mediated transformation of alfalfa with genes of fluorescently labeled mitogen-activated protein kinase MMK2. Transformation with plasmids, carrying constructs *proMMK2::GFP:cMMK2*, *35S::GFP:cMMK2* and *AtUBQ10::GFP:cMMK2*, was performed to obtain stably transformed transgenic plants. These plants can be used for following research of localization, activity and function of MMK2. MMK2 is part of mitogen-activated protein kinases signaling pathways and plays role in biotic and abiotic stress responses. However not all mechanisms and components of these pathways are well known and further studies are necessary for a better understanding of MMK2.

Keywords	Transformation, <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , mitogen-activated protein kinases, MAPK, MMK2, <i>Medicago sativa</i> , alfalfa
Number of pages	77
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	Úvod.....	10
2	Současný stav řešené problematiky	12
2.1	<i>Medicago sativa</i>	12
2.1.1	Původ a morfologie	12
2.1.2	Zemědělský význam.....	13
2.1.3	Symbióza s rhizobiálními bakteriemi.....	14
2.2	MAP kinasová signální dráha	15
2.2.1	MAP kinasové dráhy v <i>Medicago sativa</i>	18
2.2.2	MAP kinasa MMK2	19
2.3	Transformační techniky <i>Medicago sativa</i>	20
2.3.1	Transformace pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	21
2.3.1.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	21
2.3.1.2	Mechanismus infekce rostliny	21
2.3.1.3	Využití v genovém inženýrství	24
2.3.2	Biolistická metoda.....	26
2.3.3	Elektroporace	28
2.3.4	Transformace <i>in planta</i>	28
2.4	<i>In vitro</i> kultivace <i>Medicago sativa</i>	29
2.4.1	Techniky pletivových kultur rostlin	29
2.4.2	Somatická embryogeneze	30
3	Experimentální část.....	32
3.1	Materiál.....	32
3.1.1	Použité chemikálie	32
3.1.2	Použité přístroje	34
3.1.3	Použitý software.....	34
3.1.4	Použité roztoky a média	35

3.1.5	Rostlinný materiál	39
3.1.6	Bakteriální materiál	39
3.1.7	Plazmidy	39
3.2	Metody	40
3.2.1	Příprava tekutého LB média	40
3.2.2	Příprava pevného LB média	40
3.2.3	Příprava SH média	40
3.2.4	Příprava B5H a B5HatbT/C média	40
3.2.5	Příprava B50atbT/C média	41
3.2.6	Příprava MMST/C a MMSatbT/C média	41
3.2.7	Příprava MS média	42
3.2.8	Transformace <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	42
3.2.9	Izolace plazmidové DNA	43
3.2.10	Kultivace <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pro transientní transformaci	44
3.2.11	Transientní transformace listů <i>Nicotiana benthamiana</i>	44
3.2.12	Sterilizace listů <i>Medicago sativa</i>	45
3.2.13	Kultivace <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pro stabilní transformaci	45
3.2.14	Stabilní transformace rostliny <i>Medicago sativa</i>	45
3.2.15	Izolace DNA z rostlin pro genotypování	47
3.2.16	PCR	47
3.2.17	Agarosová elektroforéza	49
3.2.18	Mikroskopické snímání	50
4	Výsledky	52
4.1	Transformace <i>Agrobacterium tumefaciens</i> a její ověření	52
4.2	Transientní transformace listů <i>Nicotiana benthamiana</i>	54
4.3	Stabilní transformace rostliny <i>Medicago sativa</i>	58
4.3.1	Selekce transgenních rostlin pomocí konfokální mikroskopie	58

4.3.2	Ověření přítomnost fúzních genů v transformovaných rostlinách <i>Medicago sativa</i>	61
5	Diskuze	63
6	Závěr	67
7	Literatura	68
8	Seznam použitých zkratek	76

CÍLE PRÁCE

V rámci teoretické části této diplomové práce byla zpracována rešerše zaměřená na:

- obecnou charakteristiku a zemědělský význam rostliny *Medicago sativa*
- mechanismus a funkci mitogen-aktivovaných proteinkinás (MAPKs), zejména pak proteinu MMK2
- transformační techniky využívané pro účelovou změnu genomu *Medicago sativa*

V rámci praktické části byly realizované experimenty za účelem:

- transformace *Agrobacterium tumefaciens* konstrukty fluorescenčně značené mitogen-aktivované proteinkinasy MMK2 pod kontrolou nativního a konstitutivního promotoru
- ověření funkčnosti konstruktů fluorescenčně značené mitogen-aktivované proteinkinasy MMK2 pod kontrolou nativního a konstitutivního promotoru pomocí transientní transformace listů *Nicotiana benthamiana* a následné mikroskopie
- stabilní transformace rostlin *Medicago sativa* geny fluorescenčně značené mitogen-aktivované proteinkinasy MMK2 pod kontrolou nativního a konstitutivního promotoru pomocí somatické embryogeneze
- selekce transgenních rostlin pomocí konfokální mikroskopie
- ověření přítomnosti genů, kódujících fluorescenčně značené fúzní proteiny MMK2, v transformovaných rostlinách

1 ÚVOD

Tolice vojtěška (*Medicago sativa* L.) je významná a celosvětově rozšířená zemědělská plodina. Její hlavní využití v zemědělství je výkrm hospodářských zvířat díky jejímu složení bohatému na proteiny, vlákninu, minerály, vitamíny a další sekundární metabolity. Jedná se o luskovinu, proto je schopna vstoupit do symbiotického vztahu s rhizobiálními bakteriemi přítomnými v půdě, které fixují vzdušný dusík. Díky této schopnosti nachází uplatnění v osevním postupu, jelikož přirozeně zúrodňuje okolní půdu nadbytečně akumulovanými dusíkatými sloučeninami.

S vývojem moderní společnosti čelí zemědělství řadě výzev, jako jsou klimatické změny, úbytek úrodné půdy, vyšší nároky na kvalitu potravin a zajištění jejich dostatku pro rostoucí populaci. V těchto směrech mohou pomoci rozvíjející se biotechnologické přístupy, které jsou schopny poskytnout nutričně vylepšené a odolné odrůdy plodin s vyšší výnosností. Tím bude zároveň zredukováno množství používaných pesticidů. Podrobné studium fyziologie těchto zemědělských plodin, ke kterým se řadí i vojtěška, je proto nezbytné. Mimo to nese vojtěška potenciál v rozšíření jejího využití v přirozeném obohacování zemědělské půdy dusíkatými sloučeninami. Jedním z cílů moderního zemědělství je omezení používání dusíkatých hnojiv, které zásadním způsobem přispívají k akumulaci skleníkových plynů v atmosféře, vedoucí ke skleníkovému efektu.

Zemědělské plodiny musí, stejně jako ostatní rostliny, čelit řadě faktorů, které mohou mít negativní vliv na jejich vývoj a růst. Mezi tyto faktory patří mimo jiné vystavení biotickým a abiotickým stresovým podmínkám. Buněčné odpovědi na tyto externí podněty zajišťuje řada zprostředkovatelů. Mezi ně se řadí mitogen-aktivované proteinkinasy (MAP kinasy). Ty zajišťují přenos signálů od povrchových receptorů až po specifické cíle, jako jsou například transkripční faktory, ribozomální proteiny, cytoskeletální proteiny, nebo jiné proteinkinasy. MAP kinasové signální dráhy jsou aktivně studované a neustále jsou objevovány jejich jednotlivé komponenty.

Cílem této diplomové práce byla transformace vojtěšky fluorescenčně značenou mitogen-aktivovanou proteinkinásou zvanou MMK2 a s tím spojené zvládnutí kultivačních a pletivových laboratorních technik, metod ověření úspěšnosti transformace a mikroskopických metod. V rámci teoretické části byla vypracována literární rešerše, zabývající se obecnou charakteristikou vojtěšky a jejího zemědělského významu, mechanismu a funkce mitogen-aktivovaných proteinkinás, zejména pak proteinkinasy MMK2, a transformačních technik využívaných

při účelové změně genomu vojtěšky. V praktické části byly realizovány experimenty zaměřené na transformaci *Agrobacterium tumefaciens* konstrukty fluorescenčně značené mitogen-aktivované proteinkinasy MMK2 pod kontrolou nativního a konstitutivního promotoru, ověření funkčnosti těchto konstruktů za využití transientní transformace listů *Nicotiana benthamiana* a následnou *Agrobacterium*-zprostředkovanou stabilní transformaci rostlin vojtěšky těmito konstrukty. Získané transgenní rostliny, produkující fluorescenčně značenou mitogen-aktivovanou proteinkinasu MMK2, získají uplatnění v nadcházejících výzkumech, které se budou zabývat subcelulární lokalizací proteinkinasy MMK2, její aktivity a funkce při vystavení různým stresovým podmínkám a také její roli při interakci s prospěšnými nebo patogenními bakteriemi.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 *Medicago sativa*

2.1.1 Původ a morfologie

Tolice vojtěška (*Medicago sativa* L.) je dvouděložná rostlina patřící do čeledi bobovité (Obr. 1). Je to autotetraploidní víceletá luskovina a významná pícnina. Jedná se o jednu z prvních známých zemědělských plodin a byla velmi rozšířená již ve starověku (Spohn a Golte-Bechtel, 2005). Starověcí Řekové ji nazývali *medical* a Římané *medica*, podle oblasti Média, odkud pocházela. Odtud je odvozen také latinský název rodu *Medicago*. V oblastech, kde je nyní pěstována, je často nazývána alfalfa, z arabského *al-fasfasa* („koňská síla“). Nazývá se tak, jelikož si v minulosti armády vozily její zásoby, aby při invazích zajistily dostatek výživné potravy pro koně (Bolton, 1962). U nás je nejčastěji nazývána vojtěška nebo lucerna.



Obr. 1 Tolice vojtěška (*Medicago sativa* L.), kvetoucí v *in vivo* laboratorních podmínkách

Vojtěška patří do rozsáhlého rodu *Medicago*, který je primárně rozšířený v oblasti kolem Středozevního moře. Samotná vojtěška pochází z oblasti jihozápadní Asie a východního Středomoří, ale je dobře adaptovaná na širší škálu podnebných podmínek mírného a subtropického pásu. Je rozšířena po celé Evropě, Středomoří a od Středního východu až po Čínu a Sibiř. Na území České republiky se dostala ze začátku 17. století. (Veronesi *et al.*, 2010).

Vojtěška je víceletá rostlina, která může růst až 12 let. Květenství je tvořeno hrozny, každý hrozen čítá kolem 10-15 květů. Základ každého květu tvoří květní lůžko uzavřené kalichem, skládajícím se z pěti nerozvětvených kališních lístků zakončených pěti laloky. Květní lůžko slouží jako základna pro korunu, pestík a tyčinky. Koruna vojtěšky je tvořena z pěti okvětních lístků. Plod je nepukavý, hlemýžďovitě svinutý lusk a má šedočernou až nafialovělou barvu. Semena mají oválný, zploštělý, ledvinovitý tvar a zbarvují se do světlehnědé barvy, později tmavnou. Vojtěška dorůstá výšky v rozmezí 30-100 cm. Její stonek je vzpřímený, jednotlivá internodia jsou oddělena nody, ze kterých rostou trojčetné řapíkaté listy. Kořenový systém vojtěšky je bohatě vyvinutý a větvený, hlavní kořen dorůstá délky až několika metrů (Fehr, 1980; Barnes, 1980).

2.1.2 Zemědělský význam

Vojtěška je významná pícnina, která je běžně pěstována jako levný a bohatý zdroj proteinů, minerálů, vitamínů a vlákniny. Je přezdívána „královnou pícnin“ (Hanson, 1988). Využívá se především na výkrm hospodářské zvěře a k produkci biomasy. Uplatnění nachází také v osevním postupu. Její bohatý kořenový systém zkypruje a obohacuje půdu (Bouton, 1996).

Vojtěška má ze všech luskovin největší polní výtěžek, zhruba 2000-3000 kg/ha. V zemědělství může být na poli nepřetržitě pěstována 4-5 let, obvyklá je však rotace s dalšími plodinami každé 2-3 roky (Rafińska *et al.*, 2016).

Vojtěška má také dlouhou tradici v ayurvédské a čínské medicíně. Využívala se k léčbě nervového systému, při poruchách zažívacího traktu a při dalších onemocněních. V současnosti je známo, že kromě velkého množství proteinů je vojtěška také bohatá na sekundární metabolity. Nejvýznamnější z nich jsou saponiny a flavonoidy, dále phytoestrogeny, vitamíny, trávicí enzymy, alkaloidy a aminokyseliny (Rafińska *et al.*, 2016). To odhaluje její potenciál pro širší využití v medicíně a farmaceutickém průmyslu. Jako potravina s vysokou nutriční hodnotou

se také využívá při výrobě doplňků stravy nebo bylinných výtažků. Využití extraktu z jejích listů jako výživového doplňku pro lidskou výživu je v Evropě schváleno (Bora a Sharma, 2010).

Genom vojtěšky dosud nebyl zcela osekvenován. Jako modelová rostlina při jejím výzkumu slouží její příbuzný diploidní druh *Medicago truncatula*. *Medicago truncatula* je zároveň nejběžnější modelovou rostlinou ve výzkumu luskovin (Hawkins a Long, 2018).

2.1.3 Symbióza s rhizobiálními bakteriemi

Vojtěška vstupuje do symbiotického vztahu s bakteriemi fixujícími dusík, zvanými rhizobia. Díky tomuto vztahu potřebuje z půdy jen velmi malé dávky dusíku v minerální formě. Symbiotický vztah rostliny a bakterie je druhově specifický, s tolicí vojtěškou do symbiózy vstupuje bakterie *Sinorhizobium meliloti*.

Symbióza je iniciována signálními molekulami, které vylučuje rostlina při nedostatku dusíku. Tyto signální molekuly aktivují transkripční faktory půdních bakterií. Tyto transkripční faktory se nazývají NodD a regulují expresi nodulačních genů (*nod* genů) bakterií. Ty zajišťují bakteriím schopnost rozpoznat svého hostitele a infikovat jeho buňky skrze kořenové vlásky díky produkci bakteriálních Nod faktorů (Cren *et al.*, 1995; Ibáñez *et al.*, 2016). Nod faktory u hostitelské rostliny indukují morfologické změny a spouští proces nodulace, vedoucí k tvorbě hlízek na kořenovém systému. Tyto hlízky poskytují bakteriím anaerobní prostředí a živiny a bakterie zde tak mají ideální podmínky pro fixaci vzdušného dusíku (Gage, 2004). K fixaci vzdušného dusíku využívají rhizobia nitrogenasový enzymový komplex, který jej přeměňuje na amoniak. Ten je pak dále metabolizován pro specifické potřeby rostliny (Fischer, 1994).

Symbiotický vztah vojtěšky a rhizobií je natolik efektivní, že je vojtěška schopna akumulovat více amoniaku, než sama potřebuje. Přebytečný amoniak je pak uvolňován do okolní půdy, kde je dále za účasti nitrifikačních bakterií přeměňován na dusitany a dusičnany. Přirozeně se tak zúrodňuje okolní půda. Z toho důvodu je vojtěška velmi často zařazovaná do osevního postupu (Rashmi *et al.*, 1997).

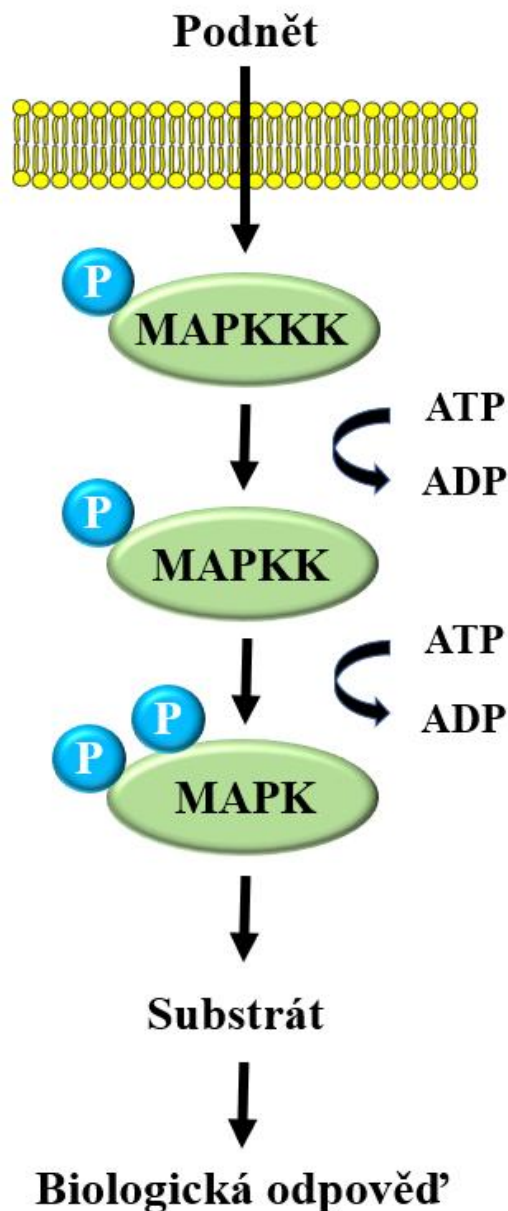
2.2 MAP kinasová signální dráha

Mitogen-aktivovaná proteinkinasaová signální dráha se zásadním způsobem podílí na přenosu signálů v eukaryotické buňce (Howe *et al.*, 1992). Signály přijaty z tyrosinových kinas, cytokininových receptorů a receptorů spřažených s G proteinem ústí v aktivaci rodiny proteinů intracelulárních serinových/threoninových kinas, zvaných mitogen-aktivované proteinkinasy (MAP kinasy), známých také jako extracelulárně regulované kinasy (ERK). Tyto enzymy jsou schopny reagovat na velký počet podnětů, aby byly vyvozeny velice specifické buněčné odpovědi (Marshall, 1994). Jejich funkcí jsou regulovány důležité buněčné procesy, jako například embryogeneze, buněčná proliferace, buněčná diferenciace nebo buněčná smrt (Boulton *et al.*, 1991). Velkou úlohu také hrají při odpovědi na stresové podmínky (Ely *et al.*, 1990). Aktivované MAP kinasy regulují funkci a aktivaci různých cílů, jako jsou transkripční faktory, cytoskeletální proteiny, ribozomální proteiny nebo další proteinkinasy (Ishihama a Yoshioka, 2012; Šamajová *et al.*, 2013a).

Podněty pro spuštění MAP kinasové signální dráhy mohou být přijaty z buněčného povrchu, mohou být také aktivovány v závislosti na hladině metabolitů v buňce nebo na stavu vnějšího a vnitřního prostředí buňky. Buněčná odpověď závisí na kinetice jejich aktivace nebo deaktivace, na subcelulární lokalizaci daných proteinkinasek, na komplexech, ve kterých se nacházejí, a na dostupnosti substrátů (Raman *et al.*, 2007).

MAP kinasová dráha se skládá z různých kaskádových modulů tvořených třemi následovně aktivovanými proteinkinasami (Obr. 2). Každá kaskáda je aktivovaná specifickým extracelulárním podnětem a vede k aktivaci konkrétní MAP kinasy (Keshet a Seger, 2010; Komis a Šamaj, 2014). Extracelulárními podněty vedoucí k aktivaci kaskádových modulů mohou být například přítomnost růstových regulátorů nebo cytokininů, dále také stresové podmínky, jako jsou např. vystavení buněk suchu nebo chladu, dále přítomnost toxinů, osmolarita, tvorba kyslíkových radikálů, ultrafialové záření nebo teplotní podmínky (Pearson *et al.*, 2001; Šamajová *et al.*, 2013b).

Kaskáda je zahájena interakcí MAP kinasy kinasy kinasy (MAPKK kinasy, MAPKKK) s malou molekulou GTPasy nebo fosforylací proteinkinasy, přicházející od povrchových receptorů buňky. MAPKK kinasy jsou serin/threonin proteinové kinasy, které přímo fosforylují a aktivují MAP kinasy kinasy (MAPK kinasy, MAPKK). MAPK kinasy pak následně aktivují MAP kinasy (MAPK)



Obr. 2 Obecné schéma MAP kinasové signální dráhy v rostlinách. Signál přijatý z vnějšího prostředí je přenášen MAP kinasovou signální dráhou. MAP kinasa (MAPK) fosforyluje specifický substrát, což vede k odpovídající biologické reakci.

za využití dvojité fosforylace na konzervovaném tripeptidu, mající TxY motiv v aktivačním segmentu na threoninových a tyrosinových residuech. Když je MAP kinasa aktivována, fosforyluje různorodé substráty v cytosolu (Morrison, 2012). Aktivace cytoplazmatických MAP kinasových modulů taky často indukuje translokaci MAP kinas do jádra, kde aktivují sety genů fosforylací specifických transkripčních faktorů. Celkově tvoří MAP kinasové moduly signální dráhy, zajišťující odpovídající biologickou odpověď (Treisman, 1996).

MAP kinasové komplexy se váží na tzv. proteinové lešení („scaffold“ proteiny) a tím je regulovaná a definována specifita funkce MAP kinas, lokalizace MAP kinas a trvání MAP kinasové aktivace (Dhanasekaran *et al.*, 2007). Stejná MAP kinasa tak může být aktivována různými podněty, může fosforylovat řadu různých substrátů a mít rozdílné úlohy. Tyto proteinové lešení jsou odpovědné za koordinaci celých MAP kinasových modulů (Komis *et al.*, 2018). Jako příklad rozdílných úloh jedné MAP kinasy může být uvedena MPK4 z modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*, která se nezávisle účastní různých buněčných odpovědí, jako jsou odpovědi na oxidativní stres, utlumení vrozené imunitní reakce nebo regulace organizace kortikálních mikrotubulů při cytokinezi (Šamajová *et al.*, 2013a). Jeden konkrétní substrát může být na druhou stranu fosforylován několika různými MAP kinasami (Smékalová *et al.*, 2014). Feilner *et al.* (2005) publikovali studii, při které v rostlině *Arabidopsis thaliana* identifikovali 48 různých substrátů MAP kinasy MPK3 a 39 různých substrátů MAP kinasy MPK6. Z toho 26 bylo shodných pro obě tyto MAP kinasy.

Lokalizace aktivovaných MAP kinas může být určena i dostupností substrátů v daných částech buňky. Pro aktivaci některých MAP kinas je nutné jejich přemístění, které je zprostředkované vazebnými partnery, jako jsou MAP kinasové fosfatasy a MAPK kinasové fosfatasy (Yoo *et al.*, 2008; Zaïdi *et al.*, 2010). Subcelulární lokalizace jednotlivých MAP kinasových modulů má velký význam v jejich správné funkci. Mnoho modulů sdílí stejné zástupce, což může vést k nežádoucím křížením signálních drah. Každý specifický MAP kinasový modul by tak měl být lokalizován co nejblíže svého místa příjmu signálu. Toto místo však nemusí být v blízkosti lokace cílového substrátu, což podtrhuje důležitost role proteinových lešení v cestě MAP kinasového modulu od receptoru k odpovídajícímu funkčnímu místu (Komis *et al.*, 2018).

MAP kinasy regulují širokou škálu procesů ve všech buněčných typech. MAP kinasové moduly vyšších rostlin jsou evolučně konzervovanější, než MAP kinasové moduly živočichů, a mají vysokou komplexitu (Dóczy *et al.*, 2012). U modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* se vyskytuje minimálně 20 různých genů kódujících MAP kinasy, 10 genů kódujících MAPK kinasy a 60-80 genů kódujících MAPKK kinasy (Colcombet a Hirt, 2008).

2.2.1 MAP kinasové dráhy v *Medicago sativa*

MAP kinasy se ve vojtěšce (*Medicago sativa* L.) účastní přenosu signálu v buněčných odpovědích. Různé MAP kinasy se mohou účastnit několika různých signalizačních drah indukovaných biotickým nebo abiotickým stresem (Bigeard a Hirt, 2018). Jednou z dobře prostudovaných MAP kinas ve vojtěšce je SIMK (z angl. „stress-induced MAPK“). SIMK je orthologem MAP kinasy MPK6 z rostliny *Arabidopsis thaliana* (At2G43790). Je aktivována MAPK kinasou SIMKK, jejíž exprese je indukovaná vystavením solnému stresu nebo patogenním elicitorům (Jonak *et al.*, 1993; Kiegerl *et al.*, 2000). SIMK může být aktivovaná také MAPK kinasou PRKK. Na rozdíl od SIMKK musí být ale PRKK aktivovaná nadřazeným článkem v MAP kinasovém modulu, MAPKK kinasou. PRKK má navíc funkci pouze v odpovědi na stres z patogenů (Cardinale *et al.*, 2002). SIMK má roli obecně ve všech odpovědích na hyper-osmotický stres (Munnik *et al.*, 1999). Nedávno byla také popsána lokalizace SIMK v kořenových vláscích vojtěšky a její zapojení do procesu nodulace, spojeného se symbiotickým vztahem vojtěšky a rhizobiálních bakterií (Hrbáčková *et al.*, 2021).

V signálních dráhách odpovědi na stres z vysokých teplot a chladu byly ve vojtěšce identifikovány dvě MAP kinasy. První je HAMK (z angl. „heat-activated MAP kinase“), která je aktivovaná při vysokých teplotách. Její aktivita je spojená s produkcí obraného proteinu HSP70 (Suri a Dhindsa, 2008). Druhou je SAMK (z angl. „stress-activated MAP kinase“, dříve označovaná jako MMK4), která je aktivovaná při nízkých teplotách (Jonak *et al.*, 1996). Chlad a teplo jsou vnímány pomocí strukturních změn v plazmatické membráně, signál pak putuje přes cytoskelet, Ca²⁺ kanály a cyklin-dependentní proteinové kinasy (CDKs) až k aktivaci MAP kinasových kaskád (Sangwan *et al.*, 2002). SAMK je orthologem MAP kinasy MPK3 z rostliny *Arabidopsis thaliana* (At3G45640). Společně se SIMK jsou zapojeny v odpovědi na stres vyvolaný patogeny, ale také na různé abiotické stresové podmínky, jako je mechanické poškození nebo sucho (Bögge *et al.*, 1996; Bögge *et al.*, 1997).

Mezi další známé MAP kinasy z vojtěšky patří MMK2 (*Medicago* MAPK2) a MMK3 (*Medicago* MAPK3). MMK2 je orthologem MAP kinasy MPK4 z rostliny *Arabidopsis thaliana* (At4G01370). MMK3 je orthologem MAP kinasy MPK13 z rostliny *Arabidopsis thaliana* (At1G07880). MMK3 hraje roli v regulaci cytokinise buněk. Koncentrace MMK3 byla pozorována mezi segregujícími se chromozomy a později byla popsána její lokalizace v rovině dělení (Bögge *et al.*, 1999). Byla také pozorována aktivace MAPKK kinasy OMTK1 (z angl. „oxidative stress-activated

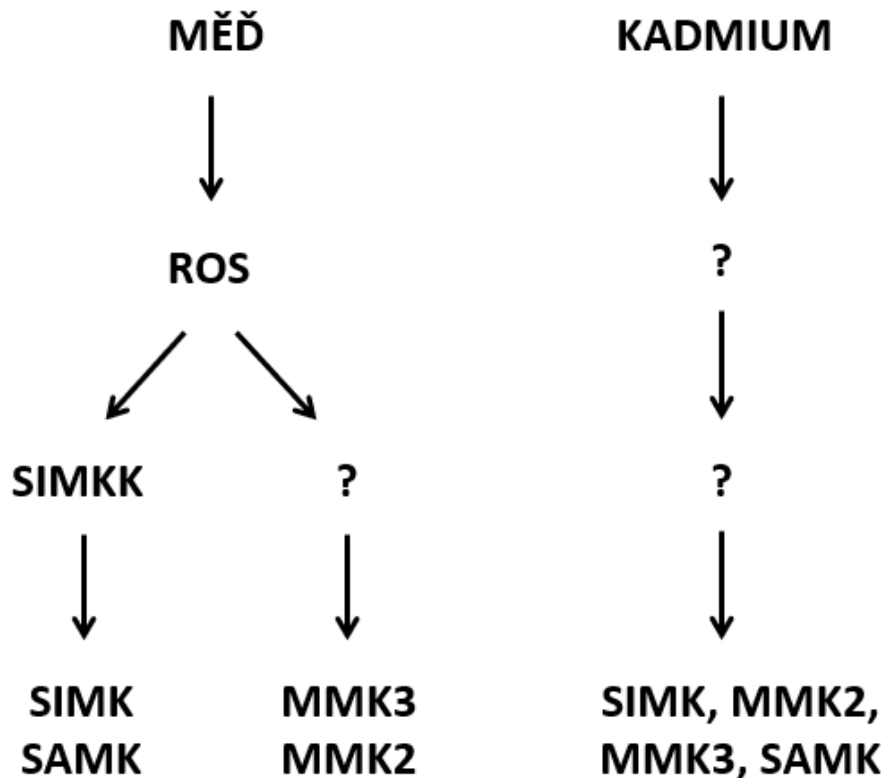
MAP triple-kinase 1“), vedoucí k aktivaci MMK3 při vystavení vojtěšky oxidativnímu stresu (Nakagami *et al.*, 2004). Čtveřice MAP kinas SIMK, SAMK, MMK2 a MMK3 se společně účastní odpovědi na stres z těžkých kovů mědi a kadmia (Jonak *et al.*, 2004).

2.2.2 MAP kinasa MMK2

Jednou z MAP kinas identifikovaných ve vojtěšce (*Medicago sativa* L.) je již dříve zmíněná MMK2 (*Medicago MAPK2*). Izolovaná DNA, kódující funkční MMK2, sdílí 65% podobnost s již dříve identifikovanou MAP kinasou, nacházející se ve vojtěšce, zvanou MMK1. Jonak *et al.* v roce 1995 provedli experiment, při kterém demonstrovali, že MMK1 a MMK2 se i přes jejich podobnost liší v jejich substrátové specifitě. Při expresi těchto dvou MAP kinas v bakteriích bylo pozorováno, že MMK2 byla na rozdíl od MMK1 schopna fosforylovat protein myelin. Také objevili, že při expresi MMK1 a MMK2 v kvasinkách může MMK2 velmi specificky nahradit funkci kvasinkové MAP kinasy SLT2/MPK1. Schopnost MMK2 zastoupit v signální dráze SLT2/MPK1 naznačuje existenci evoluční funkční konzervace mezi dráhami v kvasinkách a vyšších rostlinách (Jonak *et al.* 1995).

Role MAP kinasy MMK2 při vystavení biotickému stresu byla studovaná při interakci vojtěšky s kvasinkami. Její exprese byla indukována kvasinkovými elicitory, konkrétně pep13, chitinem a β -glukanem, což naznačuje její roli v odpovědi na stres způsobený patogenem (Cardinale *et al.*, 2000, Cardinale *et al.*, 2002). MMK2 je zároveň orthologem MAP kinasy MPK4 z rostliny *Arabidopsis thaliana*. MPK4 je lokalizovaná v jádře a cytoplazmě buněk *Arabidopsis thaliana* a má roli v odpovědi na různé stresové podmínky. Významná je její role v odpovědi na stres z patogenů (Desikan *et al.*, 2001; Andreasson *et al.*, 2005; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2007; Jeena *et al.*, 2015). Tato spojitost může indikovat další význam MMK2 v odpovědi vojtěšky na biotický stres.

MMK2 se účastní signální dráhy v odpovědi na stres z těžkých kovů, což bylo pozorováno při ošetření rostlin vojtěšky vysokým množstvím kadmiových a měďnatých iontů (Obr. 3). Měď je redoxně aktivní kov a vede k tvorbě volných kyslíkových radikálů. Ty jsou možným spouštěčem aktivity SIMKK, fosforylující SIMK a SAMK. Spouštěče a komponenty MAP kinasové kaskády vedoucí k aktivaci MMK2 a MMK3 nejsou zatím známy (Jonak *et al.*, 2004).



Obr. 3 MAP kinasové signální dráhy indukované mědí a kadmiiem. ROS = reaktivní formy kyslíku. Otazníky představují neznámé komponenty v kaskádě (upraveno podle Jonak *et al.*, 2004).

2.3 Transformační techniky *Medicago sativa*

Za účelem získání rostlin s požadovanými vlastnostmi byly rostliny šlechtěny po mnoho staletí. Významné vědecké objevy v oblasti přírodních věd v posledních desetiletích přispěly k rapidnímu rozvoji genového inženýrství. To umožnilo výzkumníkům pracovat na metodách pro zlepšení výnosnosti, adaptability a tolerance významných plodin proti biotickému i abiotickému stresu (Hrbáčková *et al.*, 2020). V současné době je možno cíleně měnit genom rostlin za využití technologií rekombinantní DNA. Tímto způsobem jsme schopni získat transgenní rostliny, které budou mít ideální vlastnosti, kvalitu, odolnost a výnosnost. Pro tvorbu transgenních rostlin byla vyvinuta řada metod, které nám umožňují vnést DNA segmenty našeho zájmu do rostlinného genomu (Snustad a Simmons, 2009).

Rostlinné transformační metody jsme schopni obecně rozdělit na dvě kategorie: nepřímé metody a přímé metody. Nepřímé transformační techniky vnášejí exogenní

DNA do rostlinného genomu za využití vektorů. Mezi tyto techniky se řadí transformace za využití virových vektorů nebo *Agrobacterium*-zprostředkovaná transformace. Přímé transformační metody se dělí na fyzikální a chemické metody. Mezi fyzikální se řadí elektroporace, mikroinjekce DNA, bombardování mikroprojektily a využití vláken z karbidu křemíku. Chemické metody jsou potom polyethylenglykolová metoda (PEG), lipofekce a diethylaminoethyl (DEAE) dextranová metoda (Keshavareddy *et al.*, 2018).

Pro transformaci rostlin vojtěšky se využívá především transformace zprostředkovaná *Agrobacteriem*. Dále využívané metody pro transformaci vojtěšky jsou bombardování mikroprojektily, sloužící k rychlému a snadnému vnesení DNA přímo do buněk, dále metoda elektroporace, sloužící k efektivnímu vnesení DNA, RNA nebo lipidů, a transformace meristémů *in planta* (Tichá *et al.*, 2020).

2.3.1 Transformace pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

2.3.1.1 *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium je rod aerobních chemoheterotrofních půdních bakterií, patřící do rodiny *Rhizobiaceae*. Tato rodina se dále řadí do kmenu *Proteobacteria*. Jejím nejvýznamnějším zástupcem je bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Jedná se o patogenní gramnegativní tyčinkovitou bakterii, která způsobuje krčkovité tumory u dvouděložných rostlin. Tomuto onemocnění se také říká bakteriální boulovitost kořenů. Onemocnění se projevuje tvorbou nádorů v pletivech spodních částí rostlin (Smith a Townsend, 1907; Braun 1982).

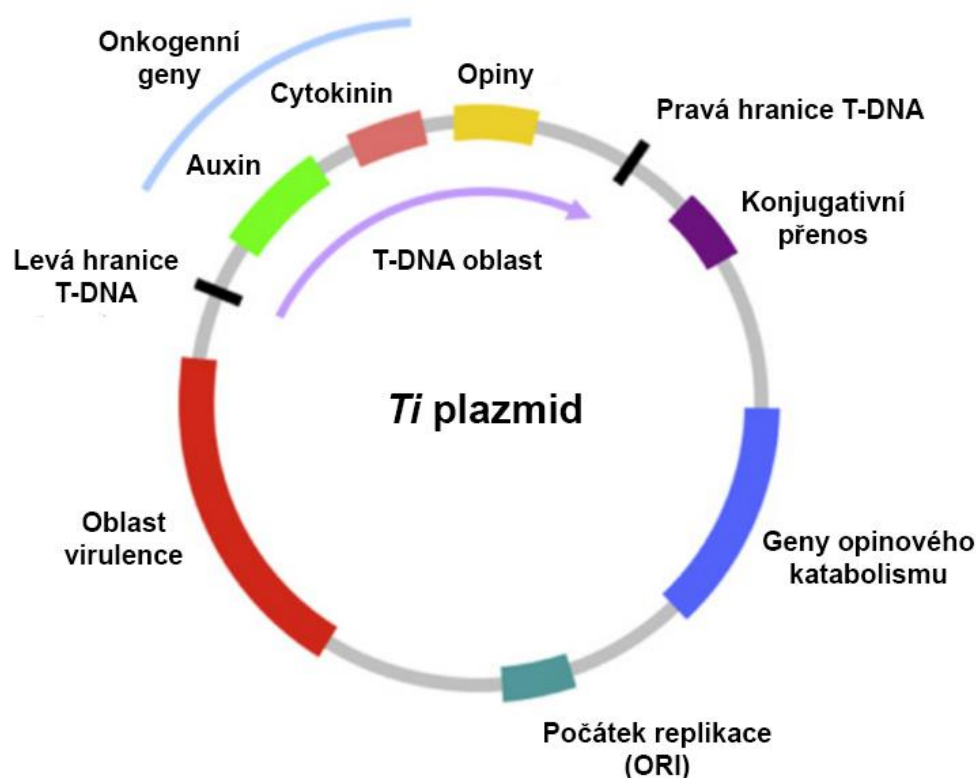
Agrobacterium tumefaciens je schopno infikovat velké množství rostlinných druhů, má jeden z největších rozsahů potencionálních hostitelů ze všech patogenních bakterií (DeCleene a DeLey, 1976). Schopnost těchto bakterií začlenit úsek své genetické informace do rostlinného hostitele byla adaptována pro využití v genovém inženýrství rostlin. Transformace rostlin za využití *Agrobacterium tumefaciens* je nejvíce využívaná transformační technika (Păcurar *et al.*, 2011; Křenek *et al.*, 2015).

2.3.1.2 Mechanismus infekce rostliny

Agrobacterium tumefaciens se přirozeně vyskytuje v půdě. Zde je specificky schopno rozpoznat vhodného rostlinného hostitele podle signálních molekul, které se uvolňují

z poškozených rostlinných tkání při poranění (Brown, 1936; Braun, 1947). Mezi tyto signální molekuly patří zejména fenolické sloučeniny, jako acetosyringon a hydroxyacetosyringon, nebo cukernaté sloučeniny (Zambryski, 1992). Signální molekuly jsou rozpoznány bakteriálním VirA/VirG signálním transdukčním systémem, který aktivuje geny virulence na bakteriálním *Ti* plazmidu (tumor-indukující plazmid) (Gelvin, 2003).

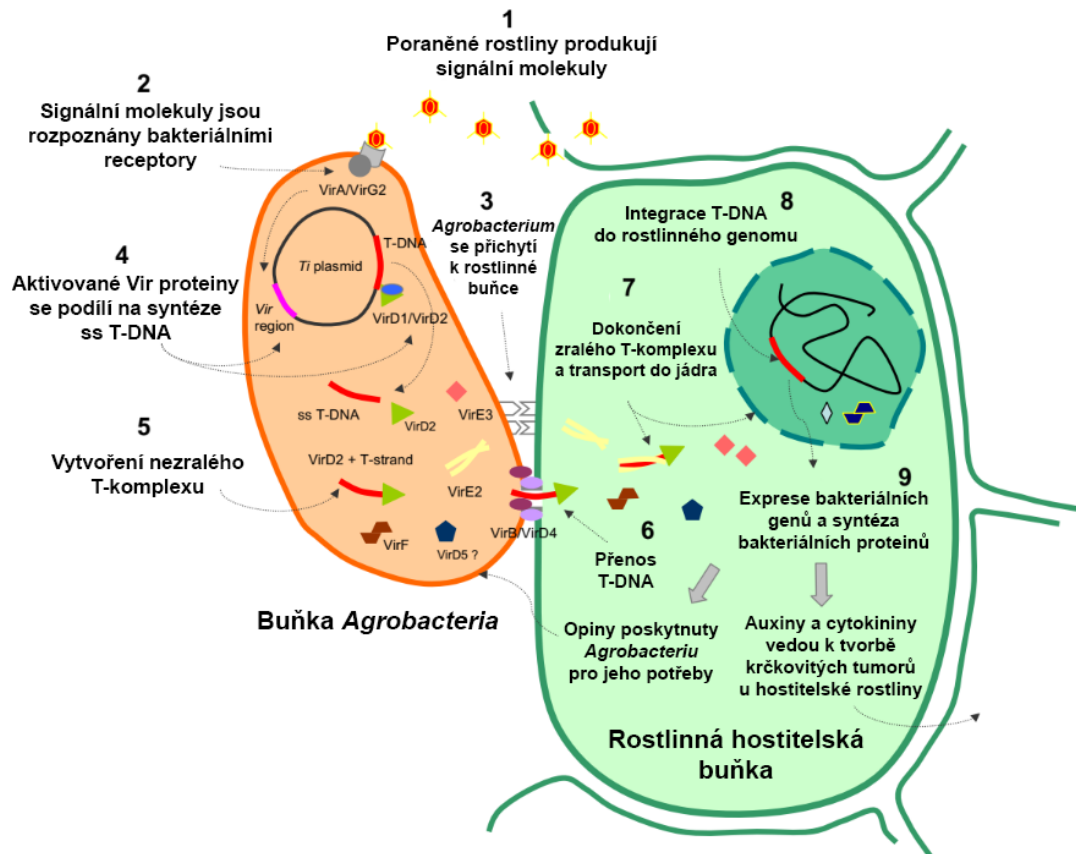
Ti plazmid hraje zásadní roli při infekci rostlinného hostitele *Agrobacterium* (Obr. 4). Obsahuje oblast zvanou T-DNA, která je nutná pro tvorbu nádorů. Velikost T-DNA je 24 782 bp a obsahuje 13 známých genů (Gielen *et al.*, 1999). T-DNA obsahuje geny kódující enzymy, které katalyzují syntézu rostlinných hormonů auxinu a cytokininu, potřebných pro růst nádoru, a také enzymy katalyzující syntézu opinů. Opiny jsou sloučeniny sloužící bakteriím *Agrobacterium* jako zdroj uhlíku a dusíku. Pomocí tohoto parazitického vztahu přiměje *Agrobacterium* svého rostlinného hostitele syntetizovat opiny pro jeho vlastní potřebu (Nester *et al.*, 1984).



Obr. 4 *Ti* plazmid (upraveno podle Păcurar *et al.*, 2011)

Mimo T-DNA obsahuje *Ti* plazmid také další dvě oblasti. První je oblast virulence (*vir* oblast), která je zodpovědná za virulenci plazmidu. Oblast virulence obsahuje geny, které jsou potřeba pro přenos a integraci T-DNA do genomu hostitele (Stachel a Nester, 1986). Jedná se o zhruba 35 genů, které se seskupují do osmi známých operonů, zvaných *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG*, *virF* a *virH* (Valentine, 2003). Další oblast *Ti* plazmidu obsahuje geny opínového katabolismu (Nester *et al.*, 1984).

K hostiteli se *Agrobacterium* pohybuje pomocí chemotaxe a do hostitelského organismu vstupuje přes poraněná místa (Păcurar *et al.*, 2011). Mechanismus infekce je znázorněn na Obr. 5. Pro infekci jsou poraněná místa vhodná hlavně z toho důvodu, že v těchto místech dochází k aktivní buněčné proliferaci a replikaci DNA (Villemont *et al.*, 1997). *Agrobacterium* se přichytí k rostlinné hostitelské buňce. Aktivované geny virulence produkují proteiny, jako jsou *VirD1/VirD2* endonukleázy, které zajišťují syntézu ssT-DNA (jednovláknové T-DNA) z T-DNA oblasti *Ti* plazmidu (Lacroix *et al.*, 2006). *VirD2* protein se kovalentně váže na syntetizované T-DNA vlákno a vytváří takzvaný nezralý T-komplex (Nilsson a Olsson, 1997). Nezralý T-komplex je pak přenesen do cytoplazmy rostlinné buňky za pomoci *VirB* a *VirD4* proteinů, společně s dalšími potřebnými virulentními proteiny, jako jsou *VirE2*, *VirE3*, *VirF* a *VirD5* (Christie, 2004; Fronzes *et al.*, 2009). V hostitelské rostlinné buňce se protein *VirE2* váže na nezralý T-komplex a vytváří zralý T-komplex, který je schopen proniknout do jádra infikované buňky (Gelvin, 1998; Lacroix a Citovsky, 2019). V jádře jsou podpůrné proteiny uvolněny z T-komplexu a podléhají proteolýze, holá ssT-DNA je poté převedena na dsT-DNA (dvouvláknovou T-DNA) a je integrována do genomu hostitele (van Larebeke *et al.*, 1975; Lacroix *et al.*, 2006).



Obr. 5 Infekce rostlinné hostitelské buňky bakterií *Agrobacterium*. 1 Z rostlin se při poranění uvolňují látky, které slouží jako signální molekuly pro *Agrobacterium*. 2 Bakteriální receptory VirA/VirG2 rozpoznávají signální molekuly hostitele. 3 *Agrobacterium* se přichytí na rostlinnou hostitelskou buňku. 4 Oblast virulence na *Ti* plazmidu je aktivována a produkuje Vir proteiny. 5 Syntetizuje se ssT-DNA vlákno, na které se váže protein VirD2, a tvoří se nezralý T-komplex. 6 T-komplex a podpůrné Vir proteiny přechází do hostitelské buňky. 7 Nezralý T-komplex a protein VirE2 vytváří zralý T-komplex. 8 T-DNA je integrována do rostlinného genomu. 9 Rostlina exprimuje bakteriální geny z T-DNA, kódující proteiny pro syntézu auxinů, cytokininů a opinů (upraveno podle Păcurar *et al.*, 2011).

2.3.1.3 Využití v genovém inženýrství

Schopnost začlenit úsek své genetické informace do genomu rostlinného hostitele přiměla biology po celém světě podrobně studovat mechanismy infekce rostliny bakterií *Agrobacterium tumefaciens*. Ukázalo se, že by *Agrobacterium tumefaciens* mohlo být potencionálním nástrojem molekulární biologie a dalo by se využít pro cílenou manipulaci s rostlinným genomem.

V počátcích výzkumu bylo diskutováno, zda se do genomu hostitelské rostliny integruje celý *Ti* plazmid, nebo pouze T-DNA oblast. Experimenty ukázaly, že pro transfer T-DNA není potřeba žádného fyzického spojení mezi T-DNA

a zbytkem *Ti* plazmidu (De Framond *et al.*, 1983; Hoekema *et al.*, 1983). Přenos DNA je zprostředkován *vir* geny, které se nachází mimo oblast T-DNA. Levá a pravá hranice T-DNA obsahují signální sekvence, důležité pro rozpoznání oblasti, která má být přenesena do genomu hostitele. Na základě těchto objevů byly vytvořeny dva vektorové systémy pro transformaci rostlin. Prvním je *cis* systém, který vnáší geny zájmu za pomoci homologní rekombinace do T-DNA oblasti, která se nachází spolu s *vir* oblastí na jednom *Ti* plazmidu (Zambryski *et al.*, 1983). Druhým je binární systém, který využívá poznatku, že se T-DNA oblast a *vir* oblast mohou nacházet na dvou různých molekulách. Nové geny jsou vnášeny do T-DNA na plazmidu zvaném binární vektor. Tento plazmid neobsahuje *vir* oblast, ale může obsahovat bakteriální selekční markerový gen. Jako druhý je připraven takzvaný pomocný plazmid, který má odstraněnou T-DNA oblast, ale obsahuje *vir* oblast. Oba plazmidy jsou následně transformovány do *Agrobacterium tumefaciens*, které infikuje rostlinu (Bevan *et al.*, 1982; Hoekema *et al.*, 1983).

Kmeny *Agrobacterium tumefaciens* musely být upraveny do podoby, ve které jsou využívány dnes. Některé struktury z *Ti* plazmidu byly odstraněny, například geny zodpovědné za tvorbu nádorů a geny opinové syntézy. Naopak některé komponenty musely být přidány nebo vylepšeny. Podstatou využití *Ti* plazmidu v genovém inženýrství je struktura oblasti T-DNA. T-DNA je ohraničena levou a pravou hraniční sekvencí. Tyto sekvence jsou tvořeny přímými nedokonalými repeticemi o délce 25-28 bp. Jsou jedinými elementy s *cis* povahou, nezbytnými pro přenos T-DNA. Přírodně se vyskytující onkogeny a geny opinové syntézy mohou být nahrazeny geny zájmu spolu s markerovými a selekčními geny. Jakákoliv DNA vložena mezi tyto hranice tak může být přenesena do hostitelské buňky (Yadav *et al.*, 1982, Pácurar *et al.*, 2011).

Pro transformaci rostlin vojtěšky za využití bakterie *Agrobacterium tumefaciens* byl představen protokol pro rychlou a vysoce účinnou transformaci podle Samac a Austin-Phillips (2006). Protokol byl založen na poznacích z postupného vývoje metod transformace a regenerace vojtěšky z pletivových kultur (Saunders a Bingham, 1972; Mitten *et al.*, 1984; Brown a Atanassov, 1985; Matheson *et al.*, 1990; Samac, 1995). Tento protokol využívá explantáty z mladých listů dobře regenerovatelných genotypů vojtěšky. Mladé listy jsou odebrány z rostlin pěstovaných ve fytoztrónových komorách a sterilizovány. Poté jsou kokultivovány s bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens*, nesoucími požadovaný konstrukt, po dobu 7-8 dní. Bakterie jsou poté

odstraněny šetrným omytím explantátů a rostliny jsou regenerovány pomocí somatické embryogeneze za využití série přesně definovaných kokultivačních médií. Transgenní rostliny mohou být tímto způsobem získány již za 9 týdnů a kolem 60-80 % inokulovaných explantátů produkuje transgenní rostliny.

Při transformaci rostlin za využití *Agrobacterium* je důležitý vhodně zvolený selekční systém. D'Halluin *et al.* (1990) jako první publikovali experiment, při kterém za využití *Agrobacterium*-zprostředkované transformace vnesli do vojtěšky gen rezistence zvaný *bar* (z angl. „bialaphos resistance“), kódující fosfinotricin-N-acetyltransferasu, poskytující rezistenci vůči herbicidu 4-hydroxy-methyl fosphinoyl-D,L-homoalanin (fosfinotricin). Pro transformaci využili explantáty odvozené ze stonkových a řapíkových řezů. Transformace vojtěšky za využití rezistence vůči herbicidům jako selekčního markeru nebyla ale příliš využívána, hlavně kvůli nízké účinnosti transformace. Selektce za využití rezistence vůči antibiotikům převažovala až do doby, než Montague *et al.* (2007) publikovali selekční systém, který využíval transformaci vojtěšky selekčním genem *pat*, kódujícím fosfinotricin acetyltransferasu a poskytujícím rezistenci vůči herbicidu fosfinotricin. Tento systém poskytuje účinnost transformace vyšší než 50 %.

Agrobacterium-zprostředkovaná transformace se u vojtěšky využívá k řadě vylepšení. Liu *et al.* (2011) představili transgenní rostliny vojtěšky transformované genem *BADH*, kódujícím betainaldehyddehydrogenasu. Tyto rostliny získaly zvýšenou toleranci proti solnému stresu. Tohidfar *et al.* (2013) transformovali vojtěšku syntetickým genem *cry3a*, který zvýšil rezistenci vojtěšky vůči patogennímu druhu brouků zvanému klikoroh vojtěškový (*Hypera postica*). Zhang a Wang (2015) zvýšili toleranci vojtěšky vůči solnému stresu vnesením genu *rstB* (z angl. „*Rhizobium* salt tolerance B“), který zajišťuje větší akumulaci vápenatých iontů.

2.3.2 Biolistická metoda

Biolistická metoda, známá také jako bombardování mikroprojektily, je jednou z transformačních technik, která nám umožňuje přenos DNA do neporušených buněk a tkání. Využívá vysokorychlostní projektily, které slouží jako nosiče DNA nebo jiných částic, pro přenos skrze buněčnou stěnu a membrány.

Mikroprojektily jsou malé koherentní částice, které mohou být akcelerovány tak, že jsou schopny penetrovat buněčné stěny a membrány, které jsou hlavní bariéry bránící přenosu DNA. Jsou dostatečně malé, aby pronikly do buňky, aniž by způsobily

velké poškození, a jsou schopny na sobě nést navázanou DNA. Obvykle jsou tvořeny z kovů, jako je zlato nebo wolfram (Sanford, 1990). Mikroskopické částice zlata nebo wolframu jsou obaleny DNA a jsou následně vystřeleny do rostlinné tkáně. Po proniknutí do buňky se DNA oddělí od mikroprojektilu a je transientně exprimována, nebo se stabilně integruje do genomu hostitele. Přenos je zprostředkován pomocí přístroje zvaného genové dělo. První genové dělo bylo popsáno v roce 1987 (Sanford *et al.*, 1987; Klein *et al.*, 1987). Wolframové částice (microcarrier) byly obalené DNA a naneseny na hranu plastové střely (macrocarrier). Střela byla z děla vyhnána pomocí střelného prachu. Tato střela dodala mikroprojektilům dostatečnou rychlost pro penetraci pletiva. Střela narazila na brzdící destičku (stopping plate), která obsahovala malé póry, kterými prošly pouze wolframové částice s nabalenou DNA. Tento mechanismus byl časem nahrazen novou generací přístrojů, kde byl střelný prach nahrazen a jako zdroj energie pro urychlení je využíván hnací plyn, který je naplněn v plynové komoře. Tento plyn je stlačován a vyvíjí tlak na destičku (rupture disk), po jejím prasknutí dojde k akceleraci mikroprojektilů (Taylor a Fauquet, 2002).

Tato technika má řadu výhod. Je efektivní u celé řady rostlinných druhů a typů rostlinných pletiv, často je používána pro editaci genomu u zemědělsky významných plodin, jako jsou kukuřice, bavlník, rýže, sója nebo pšenice. Také je rychlá a jednoduchá na provedení, není potřebná příprava vektorů, je možné transformovat několik genů najednou. Využívá se pro transformaci jádra, chloroplastů a mitochondrií (Baltes *et al.*, 2017). Nevýhodou je, že velká část mikroprojektilů není schopná proniknout do rostlinných buněk. Účinnost tak může být nižší, než u transformace zprostředkované bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* (Dai *et al.*, 2001; Keshavareddy *et al.*, 2018). Také může způsobovat chromozomální poškození (Liu *et al.*, 2019).

Biolistická metoda je využívána i pro transformaci vojtěšky. Ramaiah a Skinner (1997) tuto metodu využili pro získání transgenních rostlin transformací pyly. Do pylu byl vnesen plazmid, nesoucí reportérový gen pro β -glucuronidasu (GUS). Integrace GUS byla pak prokázána u 30 % dospělých rostlin, vyvinutých ze semen rostlin, které byly oplodněné transformovaným pylem. Po několika vegetačních obdobích však některé z rostlin ztratily integrované plazmidy, nebo se snížila jejich exprese. Pereira a Erickson (1995) stabilně transformovali vojtěšku genem *NTPII* bombardováním

kalusů odvozených od explantátů z řapíku a stonku, ze kterých byly regenerovány rostliny. Transformované rostliny získaly rezistenci vůči kanamycinu.

2.3.3 Elektroporace

Elektroporace je transformační technika, při které jsou za působení elektrických impulzů tvořeny póry na povrchu buňky díky změnám polarity na membránách (Zimmermann a Vienken, 1982). Využívá se pro přenos biochemických sloučenin, jako jsou lipidy, proteiny, DNA a RNA do buněčného prostoru. Elektroporace je často používaná technika v genovém inženýrství, protože je rychlá a jednoduchá (Harrison *et al.*, 1991). Má ale nízkou účinnost a z toho důvodu se především používá pro transformaci rostlinných protoplastů, což jsou buňky bez buněčné stěny (Rakoczy-Trojanowska, 2002; Rivera *et al.*, 2012).

Elektrické pole, aplikované na buněčnou suspenzi, indukuje tvorbu dipolárního momentu uvnitř buňky a změnu elektrického potenciálu na buněčných membránách. To vede k nerovnováze a zvýšení propustnosti membrány (Bates *et al.*, 1983). Délka pulzu, typ pulzu a doba jeho trvání mají silný vliv na úspěšnost transformace. Účinky, které má změna elektrického potenciálu na fyziologii buňky, jsou vratné, pokud je elektrický pulz aplikovaný po dobu kratší než 100 μs (Turgut-Kara a Ari, 2010).

Choudhary *et al.* (1990) studovali odpovědi vojtěšky na biotický stres transformací protoplastů za využití elektroporace. Protoplasty byly transformovány konstrukty obsahující reportérový gen pro chloramfenikolacetyltransferasu (CAT) izolovaný z bakterií. Poté byla studována změna jeho exprese po ošetření houbovými elicitory nebo redukovaným glutathionem.

Kosturkova (1993) dále pokračovala v optimalizaci metody elektroporace pro vojtěšku a transformovala protoplasty z mezofylového pletiva mladých lístků. Transformace proběhla za využití plazmidu pCaMVNEO nesoucího gen rezistence vůči kanamycinu.

2.3.4 Transformace *in planta*

Nezbytným krokem při transformaci některými technikami je úspěšná regenerace rostlin z transformovaných buněk. K tomu se využívají techniky pletivových kultur. Přestože byla vyvinuta řada protokolů, některé rostliny se obtížně regenerují a vyžadují složitou a časově náročnou manipulaci. Z tohoto důvodu byly vyvinuty techniky

transformace *in planta*, které nezávisí na regeneraci rostlin z pletivových kultur. Jedná se o metody, které vnášejí holou DNA přímo do živých rostlin, a nejsou omezené pouze na dobře regenerovatelné rostlinné genotypy (Keshavareddy *et al.*, 2018).

Příkladem *in planta* transformace je metoda floral dip, využívaná pro transformaci modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. Jedná se o jednoduchou metodu, při které jsou vrchní části kvetoucí rostliny *Arabidopsis thaliana* namáčeny do kultury bakterií *Agrobacterium tumefaciens*, nesoucích požadovaný konstrukt. Rostliny následně produkují semena. Z potomstva jsou poté vyselektovány transformované semenáčky. Jelikož se nevyužívají techniky pletivových kultur, odpadá problematika somaklonální variability (Clough a Bent, 1998; Bent, 2006).

Pro *in planta* transformaci vojtěšky vyvinuli Weeks *et al.* (2008) protokol, při kterém jsou z dvoudenních semenáčků asepticky odstraněny děložní lístky v oblasti apikálního nodu výhonku. Semenáček je následně kultivován s bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens*, nesoucími požadovaný konstrukt. U tohoto protokolu je výhodou, že není potřebné využití selekčních a reportérových markerů.

2.4 In vitro kultivace *Medicago sativa*

2.4.1 Techniky pletivových kultur rostlin

Pletivové kultury jsou obecným označením pro kultury buněk, pletiv, orgánů, nebo jejich komponentů, asepticky připravených pod definovanými fyzikálními a chemickými podmínkami *in vivo*. Tyto techniky se začaly vyvíjet na začátku 20. století. Jejich základy položil Gottlieb Haberlandt, který také představil koncept totipotence buněk. Jedná se o důležitý nástroj v oblastech studia buněčné fyziologie, biochemie, molekulární biologie a zejména genového inženýrství a ve vývoji zemědělských biotechnologií (Thorpe, 2007).

Jedná se o techniky, při kterých jsou malé části rostlin, zvané explantáty, umístěny do uměle vytvořeného nutričního média, které umožňuje jejich funkci a růst. Díky správnému složení média může být i z malého množství buněk regenerována celá rostlina. Těchto poznatků se využívá v genovém inženýrství, protože většina transformačních technik je aplikovaná na explantáty, ze kterých je potřeba následně regenerovat rostliny.

2.4.2 Somatická embryogeneze

Somatická embryogeneze je proces, při kterém je zformováno embryo ze somatické buňky, tedy z buňky, která není gameta nebo nevznikla spojením gamet. Umožňuje produkci morfologicky a vývojově zdravých embryí, což vede k zisku celých rostlin z nediferenciovaných somatických buněk (Bhatia a Bera, 2015). Celý proces je postaven na totipotenci rostlinných buněk. Totipotence je schopnost buněk diferenciovat se na jakýkoliv buněčný typ. Na rozdíl od jiných organismů jsou u rostlin totipotentní nejen buňky v zygotickém embryu, ale za určitých podmínek také somatické buňky.

Levine (1947) představil experiment, kdy z pletivových buněk mrkve vystavených nízké hladině kyseliny 1-naftyloctové (NAA) regeneroval semenáčky. První popis schopnosti buněčných kultur se množit a organizovaně vyvíjet pak předložili Steward (1958) a Reinert (1958). Somatická embryogeneze je využívána jak pro regeneraci rostlin ze somatických buněk, tak pro studia raného vývoje embrya a regulátorů embryogeneze (Zimmerman, 1993).

Iniciace somatické embryogeneze je závislá na přísunu hormonů nebo na vystavení specifickým stresovým podmínkám. Spuštění signální dráhy vede k výrazným změnám ve struktuře chromatinu, genové expresi a indukuje sérii buněčných dělení. V závislosti na typu vnějšího podnětu, například typu hormonu využitého k ošetření, může buněčné dělení vést k tvorbě velkého množství neorganizovaných nediferenciovaných buněk tvořících kalus nebo k polarizovanému růstu s organizovaným vzorem, vedoucím k tvorbě somatického embrya (Dudits *et al.*, 1995).

Nepřímá somatická embryogeneze vyžaduje indukci tvorby kalusu a následně indukci embryogenní formy kalusu přidávkem rostlinných hormonů. U vojtěšky vyvolávají tvorbu kalusu a tvorbu somatických embryí hormony kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D) a kyselina trichlorfenoxyoctová (2,4,5-T). Další růstové regulátory, jako kinetin, 4-chlorfenoxyoctová kyselina (CPA) a 1-naftyloctová kyselina (NAA), také podporují tvorbu kalusu. Pro úspěšný průběh procesu somatické embryogeneze je kritická správná koncentrace hormonů a také doba, po kterou jsou jimi rostliny ošetřeny.

Zisk regenerovaných rostlin vojtěšky za využití tohoto postupu jako první představili Saunders a Bingham (1972). Regenerace probíhala přes kalus, explantáty byly připraveny z nezralých prašníků, z děložních lístků, z úseků mezi nody

a z hypokotylových částí semenáčků. Explantáty byly kultivovány na Blaydes médiu s přidavkem různých kombinací kinetinu, kyseliny 1-naftyloctové (NAA) a kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D).

Další publikovaný postup pro regeneraci vojtěšky byl podle Kao a Michayluk (1980). Jako explantáty byly využity mezofylové protoplasty odvozené z buněk mladých listů vojtěšky. Regenerace za pomoci protoplastů jako explantátů byla rozvedena i v řadě dalších studií (Lu *et al.*, 1982; Atanassov a Brown, 1984; Dijak a Brown, 1987). Kromě kalusových kultur a protoplastů může být vojtěška regenerována také například z buněk rostoucích v suspenzních kulturách (McCoy a Bingham, 1977).

Embryogenní potenciál regenerovatelných genotypů vojtěšky není závislý na typu explantátu a somatická embryogeneze může být indukována z jakékoliv části rostliny. Obvykle se při transformaci vojtěšky využívají dobře regenerovatelné genotypy, jako je kultivar Regen-SY (Bingham, 1989) nebo Regen-SY27 (Austin *et al.*, 1995). Praktická část této diplomové práce je založena na transformaci rostlin vojtěšky (*Medicago sativa* L.) kultivar Regen-SY. Transformace byla zprostředkována *Agrobacterium tumefaciens*. Rostliny byly regenerovány z kalusu odvozeného z mladých listů podle protokolu od Samac a Austin-Phillips (2006).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Použité chemikálie

- 1000x Gamborg B5 médium směs vitamínů (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- 1000x Nitsch & Nitsch směs vitamínů (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- 100x Schenk & Hildebrant směs vitamínů (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- 3',5'-Dimethoxy-4'-hydroxyacetophenone - Acetosyringon (SIGMA-ALDRICH)
- 96% ethanol (Lihovar Kojetín, Tereos TTD, a.s.)
- 96% ethanol (Penta)
- Adenin (SIGMA-ALDRICH)
- Agarosa (SIGMA-ALDRICH)
- Buffer P1 (QIAGEN)
- Buffer P2 (QIAGEN)
- Buffer P3 (QIAGEN)
- Destilovaná voda
- dNTP MIX 20 mM (Thermo Fisher Scientific)
- EDTA (SIGMA-ALDRICH)
- Fosfinotricin (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- Gamborg B5 médium základní směs solí (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- Gellan Gum (Alfa Aesar)
- Gene Ruler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)
- Glycerol (SIGMA-ALDRICH)
- HCl (SIGMA-ALDRICH)
- Chlornan sodný (SIGMA-ALDRICH)
- Isopropanol (Penta)
- Kinetin (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- KNO₃ (SIGMA-ALDRICH)
- KOH (SIGMA-ALDRICH)
- Kyselina 2,4-dichlorofenoxyoctová (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- Kyselina octová (SIGMA-ALDRICH)
- LB Broth Miller (SIGMA-ALDRICH)

- LB Broth with agar Miller (SIGMA-ALDRICH)
- LD 6x loading dye (Thermo Fisher Scientific)
- L-glutamin (SIGMA-ALDRICH)
- L-glutathion (SIGMA-ALDRICH)
- L-prolin (SIGMA-ALDRICH)
- L-serin (SIGMA-ALDRICH)
- MES (SIGMA-ALDRICH)
- MgCl₂ (SIGMA-ALDRICH)
- MgSO₄ · 7H₂O (Aplichem)
- Midori Green (Nippon Genetics)
- Murashige & Skoog základní směs solí (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- Myoinositol (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- NaOH (SIGMA-ALDRICH)
- PCR Buffer 5x (Thermo Fisher Scientific)
- PCR H₂O (RNase/DNase free) (SIGMA-ALDRICH)
- Pepton (SIGMA-ALDRICH)
- Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific)
- Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Fisher Scientific)
- Primer GFP-Fw (Eurofins Genomics)
- Primer g-MMK2_Ct_R (Eurofins Genomics)
- Primer g-MMK2_Ct_F (Eurofins Genomics)
- Rifampicin (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- RNase A (Thermo Fisher Scientific)
- Sacharosa (SIGMA-ALDRICH)
- Schenk & Hildebrant základní směs solí (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- Spectinomycin (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- Ticarcillin (DUCHEFA BIOCHEMIE)
- Tris báze (SIGMA-ALDRICH)
- Tween 20 (SIGMA-ALDRICH)
- YEB *Agrobacterium* Growth Medium (Bioworld, UK)

3.1.2 Použité přístroje

- Analytické váhy XA 110/2X (RADWAG)
- Autokláv Sterivap HP IL (MMM Group)
- Centrifuga Scanspeed 1730R (Labogene)
- Elektroforetická vana Mini-Sub Cell GT Cell (Bio-Rad)
- Elektromagnetická míchačka MSH-420 (BOECO Germany)
- Fytotronová komora (WEISS Gallenkamp)
- Chladničky laboratorní (Electrolux, Space Plus, Gorenje, Liebherr)
- Konfokální laserový mikroskop s rotujícím diskem Cell Observer SD Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Německo)
- Laboratorní předvážky S1502 (BEL-Engineering)
- Laminární box (MERCIO)
- Mikrocentrifuga Spectrafuge™ 24D Digital Lab (Labnet)
- Mikrovlnná trouba MGE21 (HITACHI)
- NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific)
- Objektiv EC Plan-Neofluar 10x/0.30 M27 (Carl Zeiss, Německo)
- Objektiv EC Plan-Neofluar 40x/1,30 Oil DIC M27 (Carl Zeiss, Německo)
- Objektiv Plan-Apochromat 20x/0,8 M27 (Carl Zeiss, Německo)
- Orbitální inkubátor s třepačkou ES-20 (Biosan)
- pH metr stolní PC 2700 (Eutech Instruments)
- Spektrofotometr SmartSpec Plus (Bio-Rad)
- T100 Thermal Cycler (Bio-Rad)
- Vizualizátor Gel Doc EZ Gel Documentation System (Bio-Rad)
- Vortex MIXER (Labnet International, Inc.)
- Zdroj elektroforetické aparatury PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad)

3.1.3 Použitý software

- Excel 2010 (Microsoft Office)
- ImageLab Software (Bio-Rad)
- PowerPoint 2010 (Microsoft Office)
- Word 2010 (Microsoft Office)

- ZEN 3.1 blue edition (Carl Zeiss, Německo)
- ZEN black edition (Carl Zeiss, Německo)

3.1.4 Použité roztoky a média

Zásobní roztok aminokyselin

6,65 g	glutamin
0,83 g	serin
0,083 g	L-glutathion
0,004 g	adenin

V kádince vše smícháno a doplněno do 250 ml pomocí dH₂O, poté sterilizováno filtrací přes 0,2µm bakteriologický filtr. Uchováváno v lednici při teplotě 4 °C.

Zásobní roztok kinetinu (0,1 mg.ml⁻¹)

1 mg	kinetin
0,01 ml	1M NaOH

Přeneseno do 15ml centrifugační zkumavky, vortexováno, poté doplněno do 10 ml pomocí dH₂O a následně opět vortexováno. Sterilizováno filtrací přes 0,2µm bakteriologický filtr. Uchováváno v mrazícím boxu při -20 °C.

Zásobní roztok kyseliny 2,4-D (2,4-dichlorofenoxyoctové, 1.0 mg.ml⁻¹)

10 mg	2,4-D
0,05 ml	96% etanol
0,8 ml	H ₂ O
0,15 ml	1M NaOH

Přeneseno do 15ml centrifugační zkumavky, vortexováno, poté doplněno do 10 ml pomocí dH₂O a následně opět vortexováno. Sterilizováno filtrací přes 0,2µm bakteriologický filtr. Uchováváno v mrazícím boxu při -20 °C.

Roztoky pro sterilizaci listů *Medicago sativa*

Sterilizační roztok 1

40 ml	H ₂ O
40 µl	Tween 20

Sterilizováno filtrací přes 0,2µm bakteriologický filtr.

Sterilizační roztok 2

36 ml	H ₂ O
4 ml	10% chlornan sodný
40 µl	Tween 20

Sterilizováno filtrací přes 0,2µm bakteriologický filtr.

Tris-acetátový pufr (TAE, 50x koncentrovaný zásobní roztok)

121 g	Tris báze
28,55 ml	kyselina octová
50 ml	EDTA
421,45 ml	milliQ H ₂ O

pH upraveno na hodnotu 7,8.

1M Tris-HCl

12,1 g	Tris báze
100 ml	milliQ H ₂ O

pH 8 (upraveno pomocí 1M a 0,1M HCl), sterilizováno filtrací přes 0,2µm membránový filtr.

Kokultivační médium pro transientní transformaci

0,098 g	MES
0,5 ml	1M MgCl ₂
50 µl	150mM acetosyringon

Doplněno do 50 ml pomocí dH₂O, pH 5,6 (upraveno pomocí 1M a 0,1M KOH), sterilizováno filtrací přes 0,2µm membránový filtr.

YEB médium

16,3 g.l ⁻¹	YEB <i>Agrobacterium</i> Growth Medium
------------------------	--

Doplněno do 1 l pomocí dH₂O, pH 7,2 (upraveno pomocí 0,1M a 1M KOH), sterilizováno filtrací přes 0,2µm membránový filtr.

SH médium

3,2 g.l ⁻¹	Schenk & Hildebrant základní směs solí
30 g.l ⁻¹	sacharosa

0,5 g.l⁻¹ MES

Doplněno MiliQ H₂O, pH 5,7 (upraveno pomocí 0,1M a 1M KOH), sterilizováno autoklávováním. Po sterilizaci a vychlazení (55 °C) asepticky přidáno:

10 ml.l⁻¹ 100x Schenk & Hildebrant směs vitamínů (sterilní)

B5H médium

3,1 g.l⁻¹ Gamborg's B5 základní směs solí

0,5 g.l⁻¹ KNO₃

0,25 g.l⁻¹ MgSO₄ · 7H₂O

0,5 g.l⁻¹ prolin

30 g.l⁻¹ sacharosa

4,5 g.l⁻¹ Gellan Gum

Doplněno MiliQ H₂O, pH 5,7 (upraveno pomocí 0,1M a 1M KOH), sterilizováno autoklávováním. Po sterilizaci a vychlazení (55 °C) asepticky přidáno:

1.0 ml.l⁻¹ 1000x Gamborg's směs vitamínů (sterilní)

30 ml.l⁻¹ zásobní roztok aminokyselin

1 mg.l⁻¹ 2,4-D

0,1 mg.l⁻¹ kinetin

B5*Hatb*T/C médium

Příprava viz B5H médium. Navíc asepticky přidáno:

500 mg.l⁻¹ ticarcillin

10 mg.l⁻¹ fosfinotricin

B50*atb*T/C médium

3,1 g.l⁻¹ Gamborg's B5 základní směs solí

0,5 g.l⁻¹ KNO₃

0,25 g.l⁻¹ MgSO₄ · 7H₂O

0,5 g.l⁻¹ prolin

30 g.l⁻¹ sacharosa

4,5 g.l⁻¹ Gellan Gum

Doplněno MiliQ H₂O, pH 5,7 (upraveno pomocí 0,1M a 1M KOH), sterilizováno autoklávováním. Po sterilizaci a vychlazení (55 °C) asepticky přidáno:

1.0 ml.l⁻¹ 1000x Gamborg's směs vitamínů (sterilní)

30 ml.l ⁻¹	zásobní roztok aminokyselin
500 mg.l ⁻¹	ticarcillin
10 mg.l ⁻¹	fosfinotricin

MMST/C médium

4,3 g.l ⁻¹	Murashige & Skoog základní směs solí
0,1 g.l ⁻¹	myoinositol
30 g.l ⁻¹	sacharosa
4,5 g.l ⁻¹	Gellan Gum

Doplněno MiliQ H₂O, pH 5,7 (upraveno pomocí 0,1M a 1M KOH), sterilizováno autoklávováním. Po sterilizaci a vychlazení (55 °C) asepticky přidáno:

1 ml.l ⁻¹	1000x Nitsch & Nitsch směs vitamínů
500 mg.l ⁻¹	ticarcillin

MMSatbT/C médium

Příprava viz MMST/C médium. Navíc asepticky přidán herbicid:

10 mg.l ⁻¹	fosfinotricin
-----------------------	---------------

MS médium

4,3 g.l ⁻¹	Murashige & Skoog základní směs solí
30 g.l ⁻¹	sacharosa
4,5 g.l ⁻¹	Gellan Gum

Doplněno MiliQ H₂O, pH 5,7 (upraveno pomocí 0,1M a 1M KOH), sterilizováno autoklávováním. Po sterilizaci a vychlazení (55 °C) asepticky přidáno:

500 mg.l ⁻¹	ticarcillin
------------------------	-------------

Agarosový gel

0,6 g	agarosa
60 ml	1x TAE

Rozvařeno, po ochlazení na 55 °C přidáno:

2,5 µl	Midori Green
--------	--------------

3.1.5 Rostlinný materiál

- *Medicago sativa* divoký typ, kultivar Regen-SY (RSY)
- *Nicotiana benthamiana*

3.1.6 Bakteriální materiál

- *Agrobacterium tumefaciens*, kmen GV3101

3.1.7 Plazmidy

- Plazmid pB7m34GW,0 nesoucí konstrukt *proMMK2::GFP:cMMK2* a gen rezistence vůči spektinomycinu (bakterie) a fosfotricinu (rostliny)
- Plazmid pB7m34GW,0 nesoucí konstrukt *35S::GFP:cMMK2* a gen rezistence vůči spektinomycinu (bakterie) a fosfotricinu (rostliny)
- Plazmid pB7m34GW,0 nesoucí konstrukt *AtUBQ10::GFP:cMMK2* a gen rezistence vůči spektinomycinu (bakterie) a fosfotricinu (rostliny)

Plazmidy s danými konstrukty byly připraveny a poskytnu vedoucím diplomové práce, panem Mgr. Dominikem Novákem, Ph.D.

3.2 Metody

3.2.1 Příprava tekutého LB média

V 1 l destilované vody bylo rozmícháno 25 g LB Broth a bylo upraveno pH na 7,2. Směs byla sterilizována autoklávováním.

3.2.2 Příprava pevného LB média

V 1 l destilované vody bylo rozmícháno 40 g LB Broth with agar Miller. Směs byla sterilizována autoklávováním. Po sterilizaci bylo médium vychlazeno na 55 °C a poté bylo v laminárním boxu asepticky přidán rifampicin (50 µg.ml⁻¹) a spectinomycin (100 µg.ml⁻¹). Takto připravené médium bylo rozlito na kruhové Petriho misky po 25 ml.

3.2.3 Příprava SH média

Byla přichystána plastová kádinka o objemu 1 l, misky na navážky a navažovací lžičky. Do kádinky bylo naváženo 3,2 g.l⁻¹ Schenk & Hildebrant základní směsi solí, 30 g.l⁻¹ sacharosy a 0,5 g.l⁻¹ MES. Bylo přidáno 800 ml MiliQ vody. Do kádinky bylo vloženo magnetické míchátko a kádinka byla umístěna na magnetickou míchačku. Směs byla míchána do rozpuštění všech nutrientů. Následně bylo změřeno pH pomocí pH metru a upraveno na hodnotu 5,7 pomocí 1M a 0,1M KOH. Médium bylo doplněno do objemu 990 ml, rozlito do skleněných nádob a umístěno do autoklávu s uvolněnými uzávěry ke sterilizaci.

Po sterilizaci bylo médium vychlazeno na 55 °C a poté bylo v laminárním boxu přidáno 10 ml.l⁻¹ 100x Schenk & Hildebrant sterilní směsi vitamínů.

3.2.4 Příprava B5H a B5HatbT/C média

Byla přichystána plastová kádinka o objemu 1 l, misky na navážky a navažovací lžičky. Do kádinky bylo naváženo 3,1 g.l⁻¹ Gamborg's B5 základní směsi solí, 0,5 g.l⁻¹ KNO₃, 0,25 g.l⁻¹ MgSO₄ · 7H₂O, 0,5 g.l⁻¹ prolinu, 30 g.l⁻¹ sacharosy a 4,5 g.l⁻¹ Gellan Gumu. Bylo přidáno 800 ml MiliQ vody. Do kádinky bylo vloženo magnetické míchátko a kádinka byla umístěna na magnetickou míchačku. Směs byla míchána

do rozpuštění všech nutrientů. Následně bylo změřeno pH pomocí pH metru a upraveno na hodnotu 5,7 pomocí 1M a 0,1M KOH. Médium bylo doplněno do objemu 967 ml, rozlito do skleněných nádob a umístěno do autoklávu s uvolněnými uzávěry ke sterilizaci.

Po sterilizaci bylo médium vychlazeno na 55 °C a poté bylo v laminárním boxu přidáno 1,0 ml.l⁻¹ 1000x Gamborg's směsi vitamínů, 30 ml.l⁻¹ zásobního roztoku aminokyselin, 1 mg.l⁻¹ 2,4-D (250 µl zásobního roztoku na 250 ml média) a 0,1 mg.l⁻¹ kinetinu (250 µl zásobního roztoku na 250 ml média).

Při přípravě B5*Hatb*T/C média bylo postupováno stejně. V laminárním boxu navíc po sterilizaci autoklávováním a ochlazení na 55 °C přidáno 500 mg.l⁻¹ ticarcillinu a 10 mg.l⁻¹ selekčního herbicidu fosfinotricinu.

3.2.5 Příprava B50*atb*T/C média

Byla přichystána plastová kádinka o objemu 1 l, misky na navážky a navažovací lžičky. Do kádinky bylo naváženo 3,1 g.l⁻¹ Gamborg's B5 základní směsi solí, 0,5 g.l⁻¹ KNO₃, 0,25 g.l⁻¹ MgSO₄ · 7H₂O, 0,5 g.l⁻¹ prolinu, 30 g.l⁻¹ sacharosy a 4,5 g.l⁻¹ Gellan Gumu. Bylo přidáno 800 ml MiliQ vody. Do kádinky bylo vloženo magnetické míchátko a kádinka byla umístěna na magnetickou míchačku. Směs byla míchána do rozpuštění všech nutrientů. Následně bylo změřeno pH pomocí pH metru a upraveno na hodnotu 5,7 pomocí 1M a 0,1M KOH. Médium bylo doplněno do objemu 968 ml, rozlito do skleněných nádob a umístěno do autoklávu s uvolněnými uzávěry ke sterilizaci.

Po sterilizaci bylo médium vychlazeno na 55 °C a poté bylo v laminárním boxu přidáno 1,0 ml.l⁻¹ 1000x Gamborg's směsi vitamínů, 30 ml.l⁻¹ zásobního roztoku aminokyselin, 500 mg.l⁻¹ ticarcillinu a 10 mg.l⁻¹ selekčního herbicidu fosfinotricinu.

3.2.6 Příprava MMST/C a MMS*atb*T/C média

Byla přichystána plastová kádinka o objemu 1 l, misky na navážky a navažovací lžičky. Do kádinky bylo naváženo 4,3 g.l⁻¹ Murashige & Skoog základní směsi solí, 0,1 g.l⁻¹ myoinositolu, 30 g.l⁻¹ sacharosy a 4,5 g.l⁻¹ Gellan Gumu. Bylo přidáno 800 ml MiliQ vody. Do kádinky bylo vloženo magnetické míchátko a kádinka byla umístěna na magnetickou míchačku. Směs byla míchána do rozpuštění všech nutrientů. Následně bylo změřeno pH pomocí pH metru a upraveno na hodnotu 5,7 pomocí

1M a 0,1M KOH. Médium bylo doplněno do objemu 998 l, rozlito do skleněných nádob a umístěno do autoklávu s uvolněnými uzávěry ke sterilizaci.

Po sterilizaci bylo médium vychlazeno na 55 °C a poté byl v laminárním boxu přidán 1 ml.l⁻¹ 1000x Nitsch & Nitsch směsi vitamínů a 500 mg.l⁻¹ ticarcillinu.

Při přípravě MMSatbT/C média bylo postupováno stejně. V laminárním boxu navíc po sterilizaci autoklávováním a ochlazení na 55 °C přidáno 10 mg.l⁻¹ selekčního herbicidu fosfinotricinu.

3.2.7 Příprava MS média

Byla přichystána plastová kádinka o objemu 1 l, misky na navážky a navažovací lžičky. Do kádinky bylo naváženo 4,3 g.l⁻¹ Murashige & Skoog základní směsi solí, 30 g.l⁻¹ sacharosy a 4,5 g.l⁻¹ Gellan Gumu. Bylo přidáno 800 ml MiliQ vody. Do kádinky bylo vloženo magnetické míchátko a kádinka byla umístěna na magnetickou míchačku. Směs byla míchána do rozpuštění všech nutrientů. Následně bylo změřeno pH pomocí pH metru a upraveno na hodnotu 5,7 pomocí 1M a 0,1M KOH. Médium bylo doplněno do objemu 1 l, rozlito do skleněných nádob a umístěno do autoklávu s uvolněnými uzávěry ke sterilizaci. V laminárním boxu navíc po sterilizaci autoklávováním a ochlazení na 55 °C přidáno 500 mg.l⁻¹ ticarcillinu.

3.2.8 Transformace *Agrobacterium tumefaciens*

Zmražená kultura *Ag. tumefaciens* GV3101, uchovávaná v glycerolu v mikrozkuhavce Eppendorf, byla rozpuštěna na ledu a byly přidány 3 µl plazmidové DNA. Seznam použitých plazmidů viz Tab. 1. Směs byla ponechána inkubovat na ledu po dobu 35 minut. Poté byla mikrozkuhavka se směsí přenesena do tekutého dusíku na dobu 5 minut. Následně byla směs ponechána 15 minut při pokojové teplotě. Poté bylo ke směsi přidáno 400 µl LB média a byla ponechána inkubovat na třepačce (28 °C, 2 hodiny, 220 RPM).

Sterilně bylo připraveno 50 ml agarového LB média, do něj bylo přidáno 50 µl rifampicinu (zásobní roztok 50 mg.ml⁻¹) a 50 µl selekčního antibiotika spectinomycinu (zásobní roztok 100 mg.ml⁻¹). Médium bylo rozlito do dvou Petriho misek po 25 ml.

Tab. 1 Seznam plazmidů s konstrukty použitých k transformaci *Ag. tumefaciens*

Plazmid	Konstrukt	Rezistence (bakterie)	Rezistence (rostlina)
pB7m34GW,0	<i>proMMK2::GFP:cMMK2</i>	Spectinomycin	Fosfinitricin
pB7m34GW,0	<i>35S::GFP:cMMK2</i>	Spectinomycin	Fosfinitricin
pB7m34GW,0	<i>AtUBQ10::GFP:cMMK2</i>	Spectinomycin	Fosfinitricin

Směs kultivovaná na třepačce byla stočena pomocí centrifugy (3000 G, 3 minuty). V laminárním boxu byly odlity $\frac{3}{4}$ supernatantu. Ve zbývající $\frac{1}{4}$ byl pelet rozmíchán pomocí pipety. Následně byla bakteriální suspenze rozetřena na agarová média pomocí sterilní hokejky. Petriho misky byly ponechány kultivovat obráceně (48-96 hodin, 28 °C).

Jako další krok byly bakteriální kolonie pomocí mikrobiologické kličky přeneseny do zkumavek s 5 ml tekutého LB média s přidavkem 5 μ l rifampicinu (zásobní roztok 50 mg.ml⁻¹) a 5 μ l spectinomycinu (zásobní roztok 100 mg.ml⁻¹). Bakteriální suspenze byla ponechána kultivovat na třepačce přes noc (28 °C, 220 RPM). Ze získané noční kultury transformovaného *Ag. tumefaciens* bylo odebráno 400 μ l a ty byly smíchány s 50% glycerolem v poměru 1:1. Zásobní kultura byla vortexována a zmrazena pomocí tekutého dusíku a uchovávána v mrazícím boxu při -80 °C.

3.2.9 Izolace plazmidové DNA

Prvním krokem byla homogenizace a lýze buněk. Noční kultura získaná po transformaci *Ag. tumefaciens* GV3101 byla centrifugována při pokojové teplotě (3000 G, 5 minut). Supernatant byl odlit, k peletu bylo přidáno 250 μ l pufru P1 s obsahem RNasy A (1000x) a směs byla rozmíchána pomocí pipety a přenesena do mikrozkuhavky Eppendorf. Poté bylo přidáno 250 μ l pufru P2, mikrozkuhavka Eppendorf byla opatrně převracována (cca 10x) a poté byla směs inkubovaná při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Následně bylo přidáno 250 μ l přechlazeného pufru P3. Mikrozkuhavka Eppendorf byla opět opatrně promíchána převrácením (asi 10x) a směs byla následně inkubovaná na ledu po dobu 5 minut.

Pro izolaci DNA byla směs stočena pomocí centrifugy (13000 G, 21 °C, 10 minut). Supernatant byl přenesen do nové mikrozkuhavky Eppendorf a do něj bylo přidáno 700 μ l isopropanolu a po promíchání necháno inkubovat po dobu 5 minut při pokojové

teplotě. Došlo k vysrážení plazmidové DNA. Směs byla stočená pomocí centrifugy při pokojové teplotě (13000 G, 21 °C, 10 minut). Supernatant byl slit a byl přidán 1 ml předchlazeného (4 °C) 75% ethanolu. Směs byla inkubována 10 minut a poté opět stočená pomocí centrifugy při pokojové teplotě (7500 G, 21 °C, 2 minuty). Ethanol byl poté slit a pelet byl ponechán ke krátkému vysušení na vzduchu. Následně byl pelet rozpuštěn v 30 µl RNase/DNase free H₂O. Koncentrace plazmidové DNA byla změřena pomocí nanodropu. Skladováno při -20 °C.

3.2.10 Kultivace *Agrobacterium tumefaciens* pro transientní transformaci

Kultura *Ag. tumefaciens* GV3101, nesoucí požadovaný konstrukt a uchovávaná zmražená v glycerolu, byla vytažena a nechána na ledu, aby rozmrzla. V laminárním boxu byly připraveny označené sterilní zkumavky, do kterých bylo přeneseno 6 ml LB média. Do média byl přidán rifampicin (zásobní roztok 50 mg.ml⁻¹) a spektinomycin (zásobní roztok 100 mg.ml⁻¹) v poměru 1:1000. Byl odebrán 1 ml média pro pozdější použití jako slepý vzorek (odečtení absorbance média). Do zbylých 5 ml média bylo přidáno 30 µl *Ag. tumefaciens* z glycerolového inokula.

Zkumavky byly umístěny na třepačku a nechány inkubovat přes noc (28 °C, 220 RPM). Zásobní vzorek glycerolového inokula byl opět zamražen pomocí tekutého dusíku a uchován v mrazáku (-80 °C).

U namnožených bakteriálních kultur, kultivovaných ve zkumavkách, byla změřena optická hustota při vlnové délce 600 nm (OD₆₀₀). Jako slepý vzorek bylo využito LB médium s příslušnými antibiotiky. Po naměření absorbance byla bakteriální kultura naředěna na OD₆₀₀ = 0,4 do kokultivačního média, obsahujícího 150µM acetosyringon. Bakteriální suspenze byla následně inkubována ve tmě při pokojové teplotě po dobu 2 hodin.

3.2.11 Transientní transformace listů *Nicotiana benthamiana*

Rostliny *Nicotiana benthamiana* s dobře vyvinutými listy staré 6 týdnů byly předem zalaty vodou, aby došlo k otevření průduchů na spodní straně listů.

Bakteriální suspenze byla nasáta do injekční stříkačky a pomalu vtlačována ze spodní strany listů přes průduchy do mezofylu listu. Stejně bylo postupováno s negativní kontrolou (kokultivační médium bez bakterií). Pomocí fixu byla na listech

vyznačena infiltrovaná plocha. Rostlina byla přikryta černým igelitem a ponechána na temném místě 16 hodin. Následující den byly rostliny přeneseny do fytotronu a byl odstraněn igelit. Mikroskopování bylo provedeno 3 dny po transformaci.

3.2.12 Sterilizace listů *Medicago sativa*

Pro somatickou embryogenezi byly využity mladé lístky vojtěšky (*Medicago sativa* L. kultivar RSY) z 2.-5. nodu. Lístky byly odebrány do 50ml plastových zkumavek s kohoutkovou vodou. V laminárním boxu byly lístky přeneseny do plastové zkumavky se 40 ml 70% ethanolu na dobu 5-10 sekund. Poté byly lístky přeneseny do plastové zkumavky se sterilizačním roztokem 1 na promytí od ethanolu na dobu 1 minuty. Poté byly lístky přeneseny do zkumavky se sterilizačním roztokem 2 na dobu 1,5 minuty. Zkumavkou bylo jemně mícháno. Poté byly lístky promyty ve třech kruhových Petriho miskách se sterilní kohoutkovou vodou.

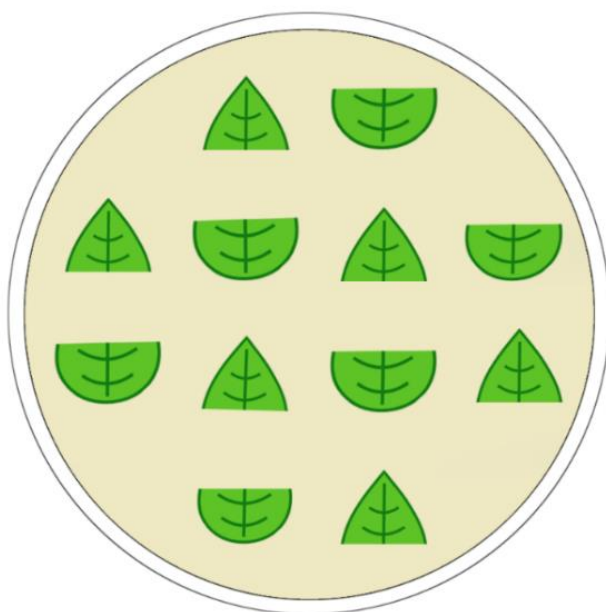
3.2.13 Kultivace *Agrobacterium tumefaciens* pro stabilní transformaci

Do 50ml plastové zkumavky bylo přidáno 15 ml YEB média s přidáním rifampicinu (50 mg.ml^{-1}) a spektinomycinu (100 mg.ml^{-1}) v poměru 1:1000. Z glycerolového inokula bylo přeneseno do média 50 μl kultury *Ag. tumefaciens* GV3101 nesoucího požadovaný konstrukt. Suspenze se dala inkubovat na třepačku přes noc (28 °C, 210 RPM).

Následující den byla změřena optická hustota při vlnové délce OD_{600} a bakteriální kultura byla následně stočená pomocí centrifugy (3000 G, 3 minuty). Kultura byla naředěna do 3 ml YEB média tak, aby se výsledné OD_{600} po přidání k 12 ml SH média pohybovalo v rozmezí hodnot 0,6-0,8.

3.2.14 Stabilní transformace rostliny *Medicago sativa*

Sterilizované lístky vojtěšky (*Medicago sativa* L.) byly od sebe odděleny v laminárním boxu a byl jim odříznut řapík. Poté byly příčně rozpůleny a přeneseny do 50ml plastové zkumavky s 12 ml SH média. Následně byly přidány 3 ml připravené



Obr. 6 Rozmístění explantátů na agarovém médiu v Petriho misce.

bakteriální kultury *Ag. tumefaciens*. Bylo ponecháno kultivovat ve vodorovné poloze na třepačce ve tmě (21 °C, 30 minut, 20 RPM).

V laminárním boxu byly inokulované explantáty umístěny na agarová B5H média pro kokultivace a indukci tvorby kalusu. Na jedno médium bylo umístěno 12 explantátů (Obr. 6). Média s explantáty na Petriho miskách byly přikryty filtračním papírem a kultivována ve fytotronu (24 °C, fotoperioda 16/8, 6-7 dní).

Po 6-7 dnech byly na explantátech pozorovány narostlé kolonie *Ag. tumefaciens*. Explantáty byly v laminárním boxu přeneseny do 50ml zkumavky s 25 ml sterilní H₂O. Zkumavka byla 10-20x převrácena, aby byly bakterie z explantátů co nejvíce odstraněny. Poté byly explantáty přeneseny do druhé zkumavky s 25 ml čisté sterilní H₂O a zkumavka byla 5x převrácena. Explantáty byly přeneseny na filtrační papír, aby došlo k odstranění přebytečné vody, a následně byly umístěny na B5HatbT/C médium pro selekci transformovaných pletiv a indukci tvorby kalusu. Média s explantáty byly kultivovány ve fytotronu (24 °C, fotoperioda 16/8, 2-3 týdny).

Po 2-3 týdnech byl pozorován vývoj kalusů. Kalusy byly přemístěny na B50atbT/C média pro indukci tvorby embryí. Média s kalusy byly kultivovány ve fytotronu (24 °C, fotoperioda 16/8, 3 týdny).

Zformovaná tmavě zelená embrya byla přenesena na MMSatbT/C médium pro vývoj rostliny. Embrya byla zčásti jemně zatlačena do média. Média s embryi byly umístěny do fytotronu a kultivovány (24 °C, fotoperioda 16/8, 2-3 týdny).

Regenerované malé rostlinky byly umístěny do kultivačních boxů s MMST/C médiem a kultivovány (24 °C, fotoperioda 16/8). Po vytvoření kořenového systému byly rostlinky přeneseny na MS média a byly odebrány kořenové špičky pro mikroskopii. Když byly rostliny dostatečně vyvinuté, byly přesazeny do půdy v květináči a ponechány růst do fytotronu (24 °C, fotoperioda 16/8).

3.2.15 Izolace DNA z rostlin pro genotypování

Na led byly připraveny malé PCR mikrokumavky Eppendorf. Jejich počet odpovídal počtu vzorků spolu s pozitivní a negativní kontrolou. Do každé mikrokumavky Eppendorf bylo pipetou přeneseno 40 µl Dillution Bufferu, z každé rostlin byl odebrán mladý zdravý lístek a z něj byl uřezán kus o velikosti 2 mm x 2 mm. Lístek byl v Dillution Bufferu rozmělněn pomocí špičky na pipety. To bylo provedeno pro každý vzorek. Poté se vzorky nechaly stát na ledu po dobu 1 hodiny. Následně se vzorky stočily pomocí mikrocentrifugy a supernatant byl přenesen do nových mikrokumavek. Takto připravené vzorky byly použity pro PCR reakci.

3.2.16 PCR

Metody PCR bylo využito pro ověření úspěšné transformace *Ag. tumefaciens* plazmidy kódujícími fluorescenčně značenou mitogen-aktivovanou proteinkinasy MMK2 pod kontrolou nativního a konstitutivního promotoru a PCR metody bylo také využito pro ověření stabilní integrace genů fluorescenčně značené mitogen-aktivované proteinkinasy MMK2 pod kontrolou nativního a konstitutivního promotoru do genomu rostlin vojtěšky (*Medicago sativa* L.). Pro PCR reakce byly využity specifické primery (Tab. 2 , Tab. 3).

Tab. 2 Primery použité při PCR pro ověření přítomnosti plazmidové DNA v *Ag. tumefaciens*

Přední („forward“) primer	Zpětný („reverse“) primer
MMK2_Ct_F	MMK2_Ct_R
5' ATGTCTGTTGAATCAGCTGA 3'	5' ATTAATTGGTGGATCAGGATTGA 3'

Tab. 3 Primery použité při PCR reakci pro genotypování rostlin, sloužící k ověření úspěšnosti stabilní transformace *Medicago sativa*

Přední („forward“) primer	Zpětný („reverse“) primer
GFP_Fw	MMK2_Ct_R
5'ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA 3'	5'ATTAATTGGTGGATCAGGATTGA 3'

Na ledu byly přichystány malé PCR mikrozkušavky Eppendorf. Jejich počet odpovídal počtu ověřovaných vzorků spolu s pozitivní a negativní kontrolou. Byl připraven PCR mix smícháním všech příslušných složek (Tab. 4 a 5). PCR mix byl pipetou přenesen do mikrozkušavek a byl přidán příslušný DNA templát. Při ověření přítomnosti plazmidové DNA v *Ag. tumefaciens* byly jako pozitivní kontrola použity naředěné plazmidy využitě k transformaci. Jako negativní kontrola byla použita PCR H₂O. Při genotypování *M. sativa* byly jako pozitivní kontrola použity ředěné plazmidy využitě k transformaci. Jako negativní kontrola byl použit Dillution Buffer.

Tab. 4 PCR mix pro ověření přítomnosti plazmidové DNA v *Ag. tumefaciens*

Složka	Množství (μl)
PCR H ₂ O	2,3
PCR Buffer 2x	5
Primer F	1
Primer R	1
Phire polymeráza II	0,2
DNA	0,5

Tab. 5 PCR mix pro genotypování rostlin *Medicago sativa*

Složka	Množství (μl)
PCR H ₂ O	5,1
PCR Buffer 5x	2
Primer F	1
Primer R	1
dNTPs	0,2
Phire polymeráza II	0,2
DNA	0,5

Tab. 6 Nastavení podmínek PCR reakce pro ověření přítomnosti plazmidové DNA v *Ag. tumefaciens*

Krok	Teplota	Čas	Cykly
Počáteční denaturace	98 °C	5 min	1
Denaturace	98 °C	5 s	
Nasednutí primerů	60,1 °C	5 s	40
Extenze	72 °C	30 s	
Finální extenze	72 °C	1 min	1
Inkubace	4 °C	∞	

Tab. 7 Nastavení podmínek PCR reakce pro genotypování rostlin *Medicago sativa*

Krok	Teplota	Čas	Cykly
Počáteční denaturace	98 °C	5 min	1
Denaturace	98 °C	5 s	
Nasednutí primerů	63,5 °C	5 s	35
Extenze	72 °C	40 s	
Finální extenze	72 °C	1 min	1
Inkubace	4 °C	∞	

Obsah mikrozkušavek byl opatrně promíchán. Mikrozkušavky byly umístěny do thermocycleru, byl nastaven příslušný program (Tab. 6 a 7) a thermocycler byl spuštěn.

3.2.17 Agarosová elektroforéza

Pro agarosovou elektroforézu byl používán 1% agarosový gel. Do Erlemayerovy baňky bylo naváženo 0,6 g agarosy a přidáno 60 ml pufru 1x TAE. Směs byla vložena do mikrovlnné trouby a vařena po dobu 2-3 minut. Směs byla kontrolována a promíchávána, dokud nevznikl homogenní roztok. Po ochlazení směsi na 55 °C bylo přidáno 2,5 µl vizualizačního barviva Midori Green. Byla připravena a vyrovnána forma na gel s hřebínkem. Do ní byl roztok nalit a ponechán ztuhnout po dobu 25-30 minut při 21 °C.

Ztuhlý gel byl přenesen do elektroforetické vany a zalit pufrem 1x TAE. Do první jamky bylo nanášeno 5 µl markeru GeneRuler™. K produktům PCR byly přidány 2 µl DNA Loading Dye 6x. Poté byly vzorky nanášeny do jednotlivých jamek po 10 µl. Elektroforetická aparatura byla následně zapojena do zdroje a spuštěna (80 V, 40 minut).

Po proběhnuté elektroforézy byl gel vizualizován pomocí Vizualizátoru Gel Doc EZ Gel Documentation System a programu ImageLab.

3.2.18 Mikroskopické snímání

Epidermální buňky listů *Nicotiana benthamiana*, transientně transformované konstruktem *proMMK2::GFP::cMMK2*, byly snímány za využití konfokálního laserového mikroskopu s rotujícím diskem Cell Observer SD Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Německo) vybaveného objektivy Plan-Apochromat 20x/0.8 M27 (Carl Zeiss, Německo) a EC Plan-Neofluar 10x/0.30 M27 (Carl Zeiss, Německo). Pro excitaci bylo použito světlo o vlnové délce 488 nm, emisní filtr propouštěl světlo o vlnové délce 509 nm.

Epidermální buňky listů *Nicotiana benthamiana*, transientně transformované konstrukty *35S::GFP::cMMK2* a *AtUBQ10::GFP::cMMK2*, byly snímány konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem LSM 710 Axio Imager 2 (Carl Zeiss, Německo), vybaveným objektivy Plan-Apochromat 20x/0.8 M27 (Carl Zeiss, Německo) a EC Plan-Neofluar 10x/0.30 M27 (Carl Zeiss Německo). Na excitaci byl použit laser o vlnové délce 488 nm a emisní filtr propouštěl světlo v rozmezí od 493 nm do 582 nm.

Kořeny transgenních semenáčků vojtěšky byly snímány konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem LSM 710 Axio Imager (Carl Zeiss, Německo), vybaveným objektivem EC Plan-Neofluar 10x/0.30 M27 (Carl Zeiss, Německo). Na excitaci byl použit laser o vlnové délce 488 nm a emisní filtr propouštěl světlo v rozmezí od 493 nm do 598 nm. Snímání pro všechny vzorky proběhlo za identických podmínek (počet z-rovin, intenzity laseru, citlivosti snímače), aby bylo možné porovnat intenzitu fluorescence proteinu GFP-MMK2 pod kontrolou různých promotorů v jednotlivých rostlinách.

Intenzita fluorescenčního signálu byla měřena u snímků kořenů stabilně transformovaných semenáčků vojtěšky pomocí programu ZEN 3.1 blue edition (Carl

Zeiss, Německo). U každého snímku bylo nasnímáno 12 jednotlivých z-rovin, které byly spojeny pomocí funkce Orthogonal Projection, čímž byl vytvořen jeden 2-D obrázek. Byly změřeny profily intenzity fluorescence a byly vytvořeny grafy intenzity v programu Excel (Microsoft Office).

4 VÝSLEDKY

V následující kapitole jsou prezentovány a popsány veškeré výsledky získané během experimentů v rámci praktické části této diplomové práce.

V první části bylo metodou chladového šoku transformováno *Ag. tumefaciens* GV3101 plazmidy nesoucími konstrukty kódující fluorescenčně značený fúzní protein GFP-MMK2. Jednalo se o konstrukt *proMMK2::GFP:cMMK2* pod kontrolou nativního promotoru a konstrukty *35S::GFP:cMMK2* a *AtUBQ10::GFP:cMMK2* vedené konstitutivními promotory. Dále bylo popsáno ověření úspěšnosti transformace *Ag. tumefaciens* GV3101. Ověření bylo provedeno izolací plazmidové DNA a následným využitím metody PCR s použitím primerů, které byly specifické k sekvenci kódující *MMK2*.

Následujícím krokem po ověření přítomnosti rekombinantních plazmidů v *Ag. tumefaciens* bylo provedení transientní transformace listů *Nicotiana benthamiana* za účelem ověření funkčnosti těchto konstruktů v rostlinné buňce v heterologním systému. Výsledky transientní transformace byly pozorovány a snímány pomocí konfokální laserové skenovací mikroskopie a konfokální mikroskopie s rotujícím diskem.

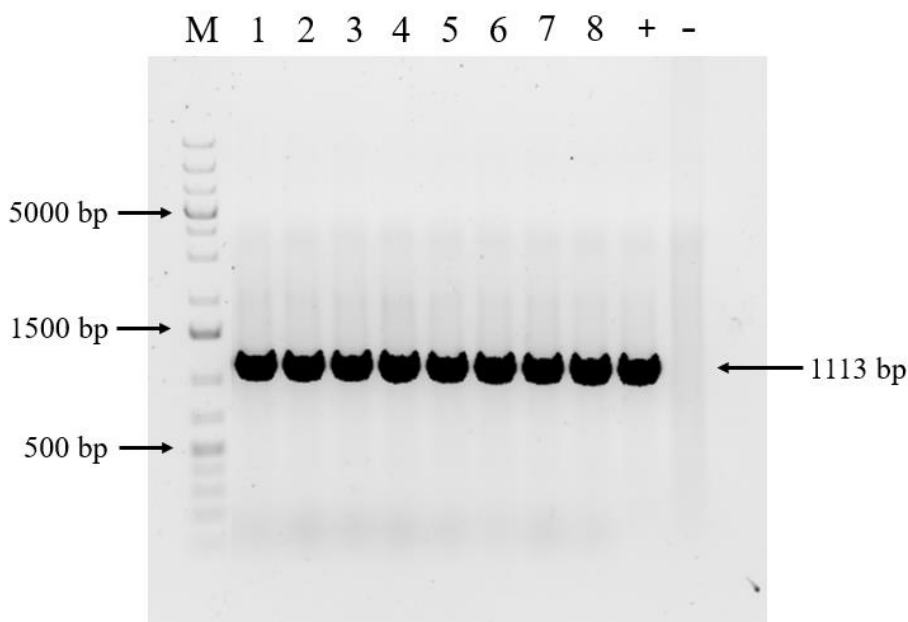
Po ověření funkčnosti konstruktů bylo přistoupeno ke stabilní transformaci. Rostliny vojtěšky (*Medicago sativa* L.) byly transformovány dříve popsanými konstrukty za využití *Ag. tumefaciens* GV3101 a následně byly regenerovány procesem somatické embryogeneze. Regenerované rostliny byly selektovány na základě rezistence k fosfinitricinu a poté na základě fluorescenčního signálu za využití konfokální mikroskopie. Zároveň byly taky porovnány intenzity signálu GFP-MMK2 proteinu mezi jednotlivými konstrukty, které ukazují sílu jednotlivých promotorů. Jako poslední krok byla ověřena integrace genů, kódujících fluorescenčně značené fúzní proteiny GFP-MMK2, do transformovaných rostlin za využití PCR.

4.1 Transformace *Agrobacterium tumefaciens* a její ověření

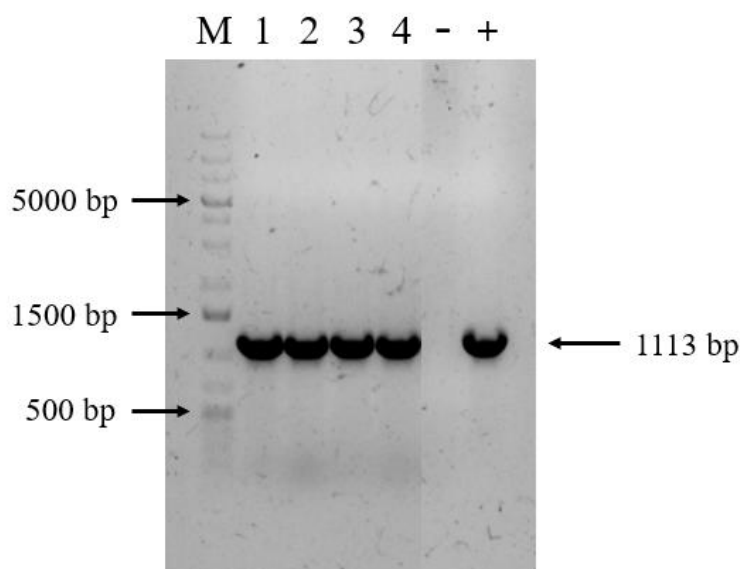
Bakterie *Ag. tumefaciens* GV3101 byly transformovány plazmidy nesoucími konstrukty GFP fluorescenčně značené mitogen-aktivované proteinkinasy MMK2 (Tab. 1). Každý z těchto konstruktů byl pod kontrolou odlišného promotoru. Jednalo se o nativní promotor *proMMK* (1536 bp předcházející kódující sekvenci *MMK2*),

konstitutivní promotor CaMV (Cauliflower mosaic virus) 35S a konstitutivní ubiquitonový promotor AtUBQ10 z rostliny *Arabidopsis thaliana*. Konstrukty byly připraveny N-terminální fúzí genu *GFP* k *cMMK2* (cDNA) pomocí MultiSite Gateway technologie. Transformace chemokompetentních *Ag. tumefaciens* GV3101 byla provedena pomocí chladového šoku.

Pro ověření úspěšnosti transformace byla z kultur transformovaných bakterií *Ag. tumefaciens* izolovaná plazmidová DNA, která sloužila jako templát pro následující PCR reakce. Metodou PCR byla ve vzorcích izolované plazmidové DNA ověřena přítomnost rekombinantních plazmidů, nesoucích konstrukty *proMMK2::GFP:cMMK2*, *35S::GFP:cMMK2* a *AtUBQ10::GFP:cMMK2* (Obr. 7, 8). Pro tuto PCR byly využity primery odpovídající hraničním sekvencím *MMK2*. U všech vzorků byly na elektroforeogramu pozorovány produkty PCR v oblasti 1113 bp (odečteno podle použitého standardu), barvené pomocí Midori Green, což odpovídá velikosti fragmentu definovaného použitými primery. Pro pozitivní kontroly byly využity jako templáty PCR reakce ředěné rekombinantní plazmidy, které byly dříve použity k transformaci *Ag. tumefaciens*. Pro negativní kontrolu byla jako templát použita PCR H₂O.



Obr. 7 Elektroforeogram PCR produktů z plazmidové DNA pro ověření úspěšnosti transformace *Ag. tumefaciens* **1-4** kolonie *Ag. tumefaciens* transformované konstruktem *AtUBQ10::GFP:cMMK2*, **5-8** kolonie *Ag. tumefaciens* transformované konstruktem *35S::GFP:cMMK2*. M - standart molekulové hmotnosti (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder), + pozitivní kontrola, - negativní kontrola. Očekávaná velikost PCR fragmentu je 1113 bp.



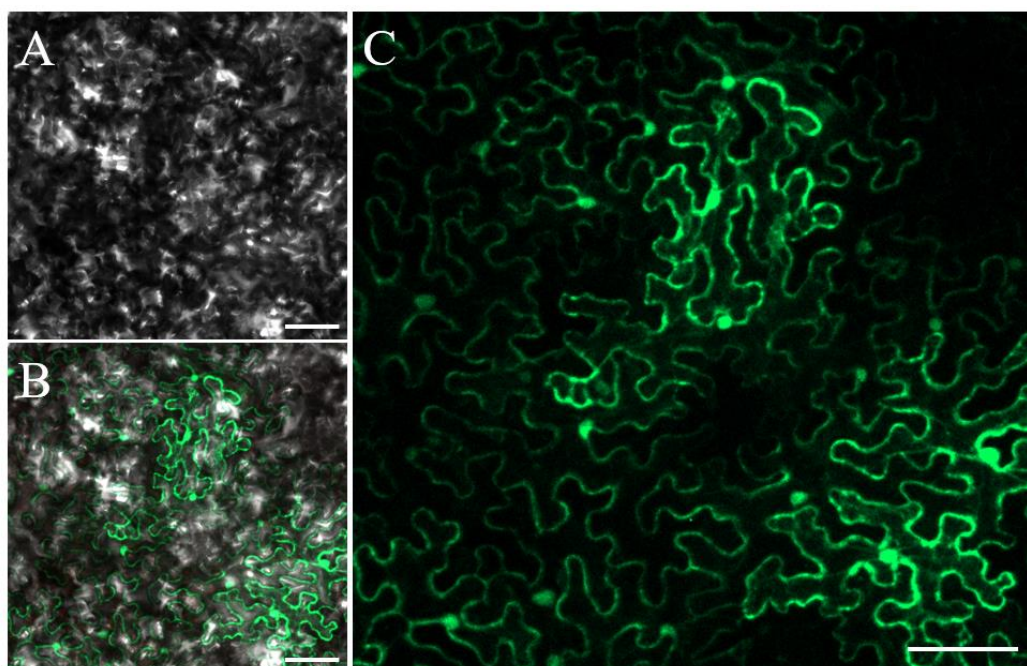
Obr. 8 Elektroforeogram PCR produktů z plazmidové DNA pro ověření úspěšnosti transformace *Ag. tumefaciens*. 1-4 kolonie *Ag. tumefaciens* transformované konstruktem *proMMK2::GFP:cMMK2*. M - standart molekulové hmotnosti (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder), + pozitivní kontrola, - negativní kontrola. Očekávaná velikost PCR fragmentu je 1113 bp.

4.2 Transientní transformace listů *Nicotiana benthamiana*

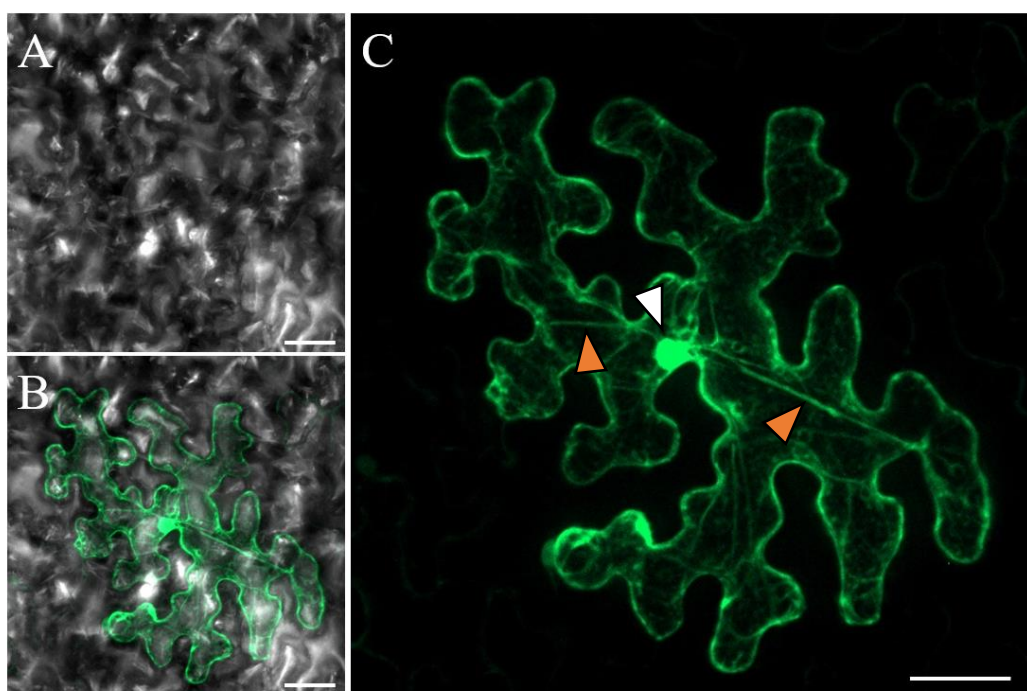
Transientní transformace je dočasná transformace buněk, při které nedochází k integraci vnesené DNA do genomu. Tato metoda byla využita pro ověření funkčnosti využívaných konstruktů.

Pro transientní transformaci byly využity dobře vyvinuté listy rostliny *Nicotiana benthamiana*. Listy byly infiltrovány připravenými suspenzemi s transformovanými bakteriemi *Ag. tumefaciens*, které nesly požadované konstrukty *proMMK2::GFP:cMMK2* (kolonie 1, Obr. 8), *35S::GFP:cMMK2* (kolonie 5, Obr. 7) a *AtUBQ10::GFP:cMMK2* (kolonie 1, Obr. 7). Epidermální buňky listů *Nicotiana benthamiana* byly mikroskopovány 3. den po infiltraci.

Epidermální buňky listů *Nicotiana benthamiana*, transientně transformované *Ag. tumefaciens* nesoucím konstruktem *proMMK2::GFP:cMMK2*, byly snímány pomocí konfokálního laserového mikroskopu s rotujícím diskem (Obr. 9, 10). Z nasnímaných jednotlivých z-rovin byla vytvořena ortogonální projekce a byl upraven kontrast obrázků.

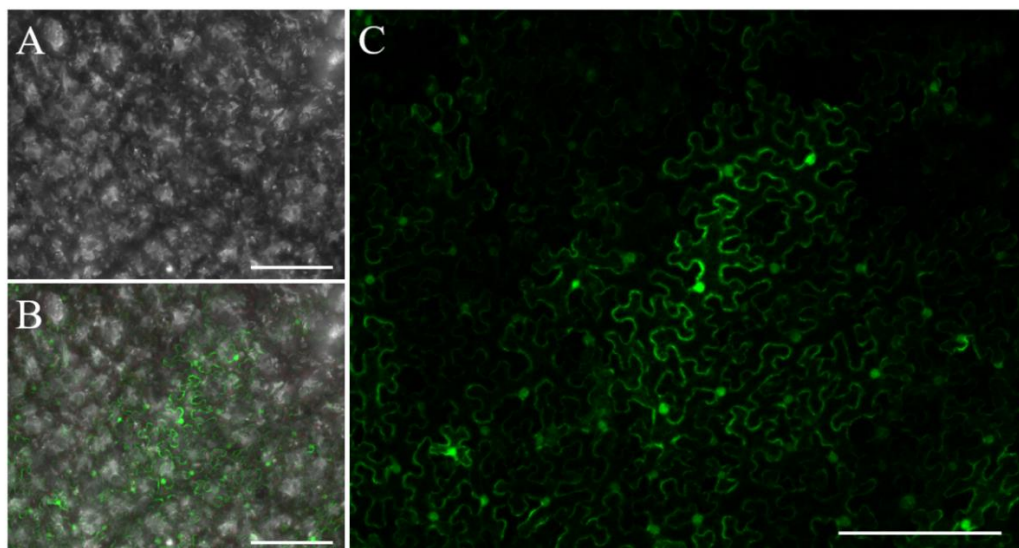


Obr. 9 Transientně transformované epidermálních buňky listu *Nicotiana benthamiana* konstruktem *proMMK2::GFP:cMMK2*, přehledový obrázek. A procházející světlo, B sloučení kanálů procházející světlo a GFP, C kanál GFP. Měřítko 100 μm .

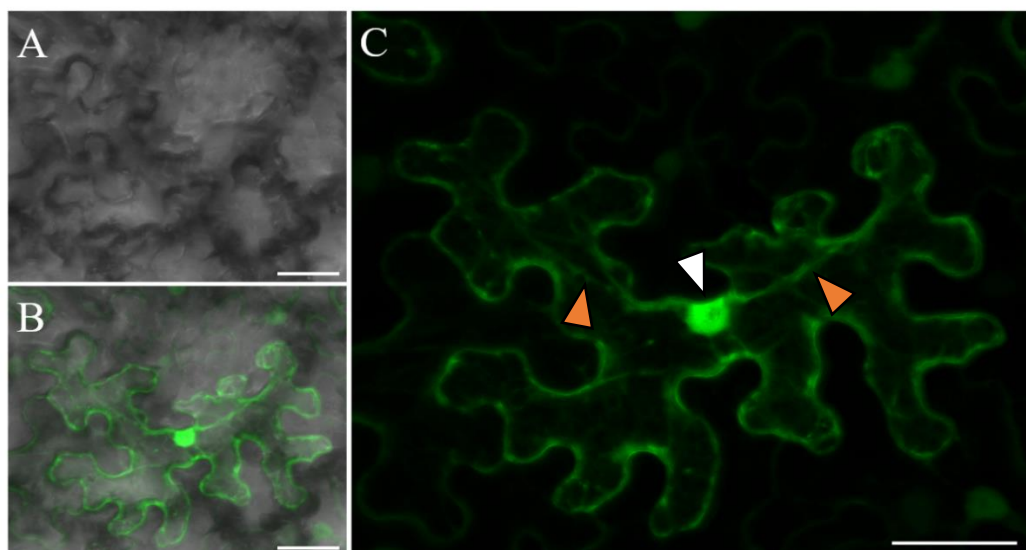


Obr. 10 Transientně transformované epidermálních buňky listu *Nicotiana benthamiana* konstruktem *proMMK2::GFP:cMMK2*. A procházející světlo, B sloučení kanálů procházejícího světla a GFP, C kanál GFP. GFP-MMK2 protein lokalizován v jádře (bílá šipka), na cytoplazmatických pásech (oranžové šipky) a také v blízkosti plazmatické membrány. Měřítko 50 μm .

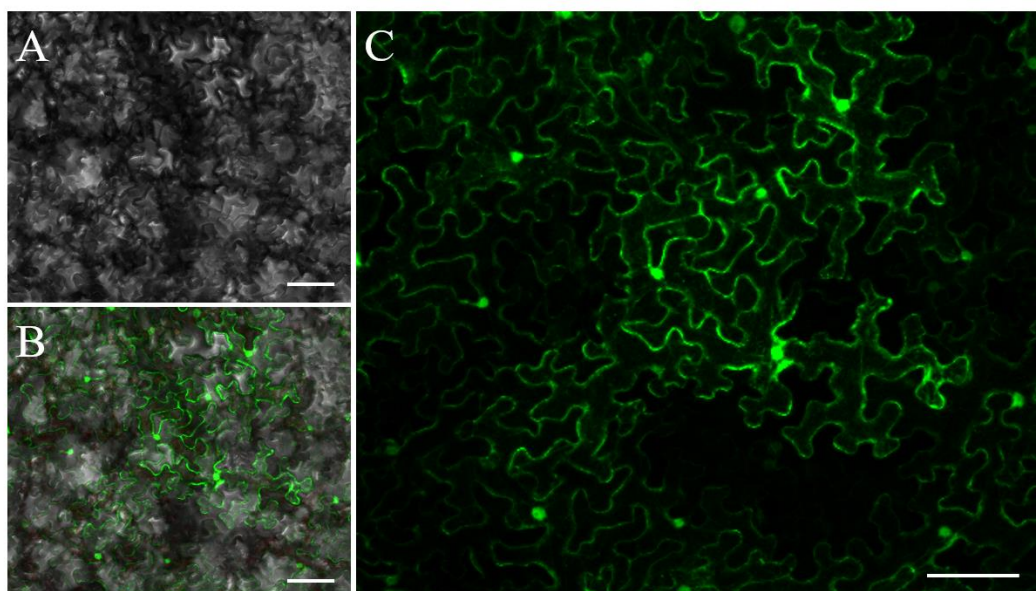
Epidermální buňky listů *Nicotiana benthamiana*, transientně transformované *Ag. tumefaciens* nesoucím konstrukty *35S::GFP:cMMK2* a *AtUBQ10::GFP:cMMK2* (každý konstrukt byl transformován zvlášť), byly snímány konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem (Obr. 11, 12, 13, 14). Z nasnímaných jednotlivých z-rovin byla vytvořena ortogonální projekce a byl upraven kontrast obrázků.



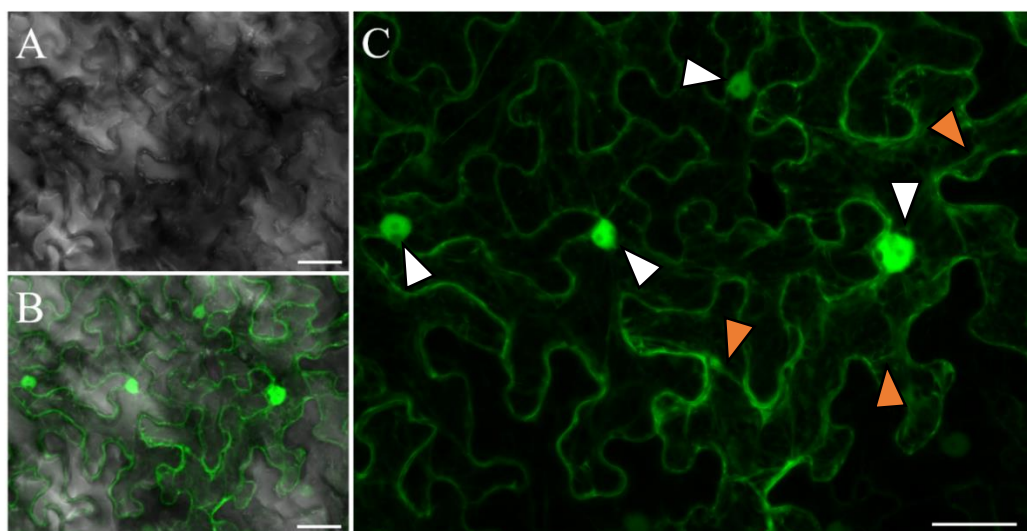
Obr. 11 Transientně transformované epidermálních buňky listu *Nicotiana benthamiana* konstruktem *35S::GFP:cMMK2*, přehledový obrázek. **A** procházející světlo, **B** sloučení kanálů procházející světlo a GFP, **C** kanál GFP. Měřítko 200 μm .



Obr. 12 Transientně transformované epidermálních buňky listu *Nicotiana benthamiana* konstruktem *35S::GFP:cMMK2*. **A** procházející světlo, **B** sloučení kanálů procházející světlo a GFP, **C** kanál GFP. GFP-MMK2 protein lokalizován v jádře (bílá šipka), na cytoplazmatických pásech (oranžové šipky) a také v blízkosti plazmatické membrány. Měřítko 40 μm .



Obr. 13 Transientně transformované epidermálních buňky listu *Nicotiana benthamiana* konstruktem *AtUBQ10::GFP:cMMK2*, přehledový obrázek. A procházející světlo, B sloučení kanálů procházející světlo a GFP, C kanál GFP. Měřítko 100 μm .



Obr. 14 Transientně transformované epidermálních buňky listu *Nicotiana benthamiana* konstruktem *AtUBQ10::GFP:cMMK2*. A procházející světlo, B sloučení kanálů procházející světlo a GFP, C kanál GFP. GFP-MMK2 protein lokalizován v jádře (bílé šipky), na cytoplazmatických pásech (oranžové šipky) a také v blízkosti plazmatické membrány. Měřítko 40 μm .

Všechny tři ověřované konstrukty byly exprimované v epidermálních buňkách listů *Nicotiana benthamiana*. U každého byl pozorován signál GFP fluorescenčně značeného fúzního proteinu MMK2. Tento signál byl u všech konstruktů shodně pozorován v oblastech kolem plazmatické membrány, v jádře a na cytoplazmatických pásech.

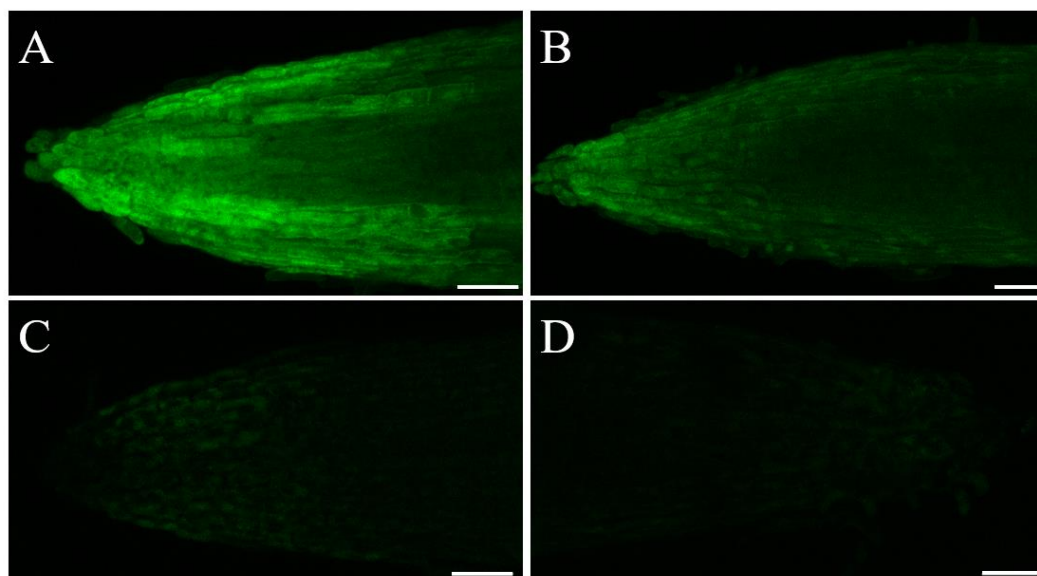
4.3 Stabilní transformace rostliny *Medicago sativa*

Přenos genů fluorescenčně značené proteinkinasy MMK2 do rostliny vojtěšky (*Medicago sativa* L.) byl zprostředkován nepřímou metodou transformace za využití *Ag. tumefaciens* jako přenašeče. Bakterie *Ag. tumefaciens* GV3101 byly transformovány plazmidy, nesoucími konstrukt pod kontrolou nativního promotoru *proMMK2::GFP:cMMK2* a konstrukty pod kontrolou konstitutivních promotorů *35S::GFP:cMMK2* a *AtUBQ10::GFP:cMMK2* (Tab. 1). Úspěšnost transformace *Ag. tumefaciens* byla předem ověřena pomocí PCR. Funkčnost konstruktů byla ověřena pomocí transientní transformace listů *Nicotiana benthamiana*.

Pro stabilní transformaci byly vybrány zdravé mladé listy vojtěšky kultivaru Regen-SY (RSY). Listy byly sterilizovány a následně transformovány podle protokolu od Samac a Austin-Phillips (2006). Pro transformaci byly využity stejné kolonie *Ag. tumefaciens* jako pro transientní transformaci. Selektce transformovaných buněk a pletiv byla provedena přidáním selekčního herbicidu fosfínotricinu do kultivačních médií. Transformované buňky byly rezistentní vůči tomuto herbicidu. Regenerace rostlin probíhala za využití procesu somatické embryogeneze.

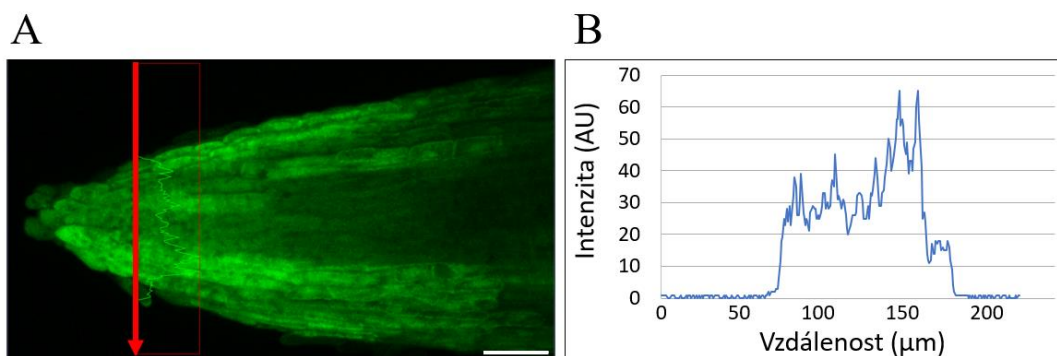
4.3.1 Selektce transgenních rostlin pomocí konfokální mikroskopie

Regenerované rostliny byly dále vyselektovány pomocí pozorování konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem. U 4 rostlin transformovaných konstruktem *proMMK2::GFP:cMMK2*, 2 rostlin transformovaných konstruktem *AtUBQ10::GFP:cMMK2* a 4 rostlin transformovaných konstruktem *35S::GFP:cMMK2*, rezistentních vůči fosfínotricinu, byl pozorován fluorescenční signál fúzního proteinu GFP-MMK2. Pozorovány byly kořenové špičky transgenních rostlin a taky divokého typu RSY. V práci jsou uvedeny reprezentativní obrázky pro jednotlivé transgenní linie a divoký typ RSY (Obr. 15). Snímání a zpracování mikroskopického obrazu probíhalo za totožných podmínek. Vyhodnoceny byly ortogonální projekce, vytvořené z jednotlivých z-rovin.

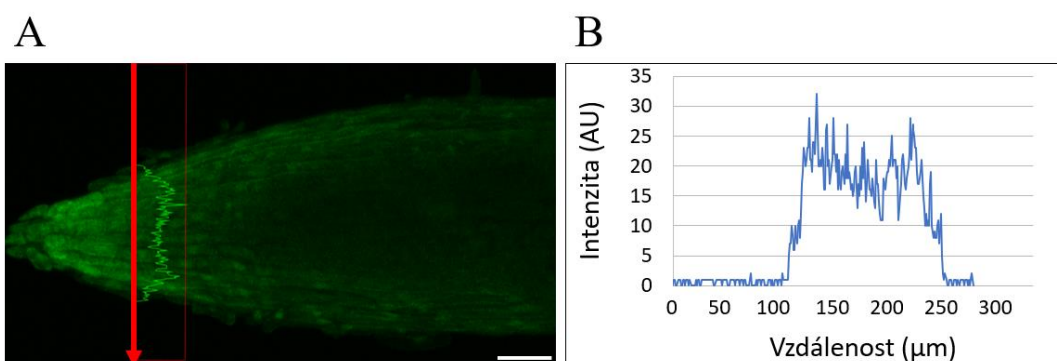


Obr. 15 GFP-MMK2 fluorescenční signál v kořenových špičkách rostlin vojtěšky (*Medicago sativa* L.) stabilně transformovaných konstrukty: A *35S::GFP:cMMK2*, B *AtUBQ10::GFP:cMMK2*, C *proMMK2::GFP:cMMK2*, a také divokého typu D RSY. Mikroskopováno konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem. Měřítko 50 μ m.

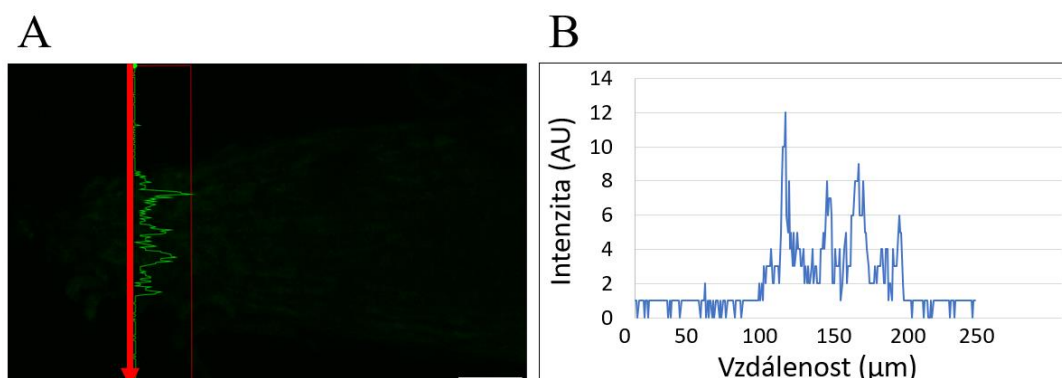
Následně byly změřeny a porovnány intenzity fluorescenčního signálu rostlin transformovaných jednotlivými konstrukty pod kontrolou různých promotorů (Obr. 16, 17, 18). Měření byla provedena v kolumele, kde sejevila exprese jako nejsilnější. Z výsledků měření je patrné, že nejsilnější signál byl pozorován u rostlin transformovaných konstrukty pod kontrolou konstitutivního promotoru *35S::GFP:cMMK2*, kdy nejvyšší pík intenzity dosáhl až hodnoty 65 (AU). Naopak velmi slabý signál byl pozorován u rostlin transformovaných konstruktem pod kontrolou nativního promotoru *proMMK2::GFP:cMMK2*, kdy nejvyšší pík intenzity dosahoval maximálně hodnoty 12 (AU). Pro kontrolní měření byla využita kontrolní linie rostliny vojtěšky (*Medicago sativa* L.), kultivar RSY, kde intenzita signálu dosahovala maximálně hodnoty 9 (AU). Vzhledem nepřítomnosti fluorescenčního GFP proteinu může být tato hodnota signálu považována za nespecifický šum, vzniklý během snímání (Obr. 19). Za účelem porovnání intenzity fluorescence GFP-MMK2 proteinu pod kontrolou různých promotorů v jednotlivých rostlinách byly naměřené hodnoty kvůli lepší přehlednosti zarovnané na ose vzdálenosti (osa x) a byly vneseny do grafu (Obr. 20).



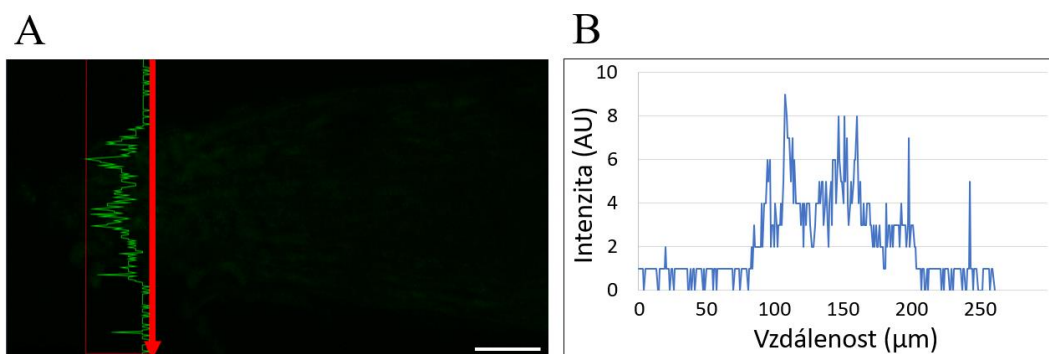
Obr. 16 Měření intenzity fluorescenčního signálu v kořenových špičkách vojtěšky (*Medicago sativa* L.) transformované konstruktem *35S::GFP:cMMK2*. **A** Referenční snímek pro měření intenzity fluorescenčního signálu, červená šipka značí směr měření. Měřítka 50 μm. **B** Graf závislosti intenzity fluorescenčního signálu na vzdálenosti.



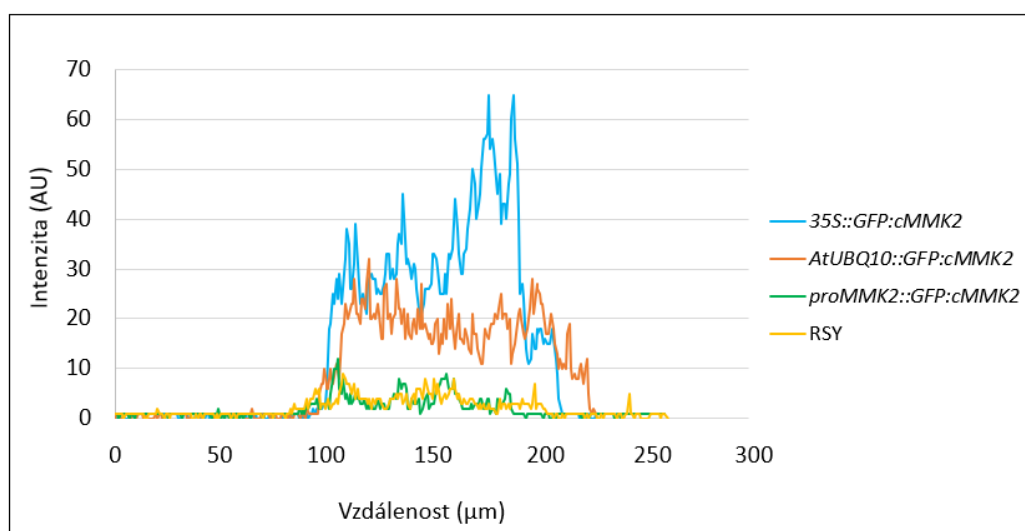
Obr. 17 Měření intenzity fluorescenčního signálu v kořenových špičkách vojtěšky (*Medicago sativa* L.) transformované konstruktem *AtUBQ10::GFP:cMMK2*. **A** Referenční snímek pro měření intenzity fluorescenčního signálu, červená šipka značí směr měření. Měřítka 50 μm. **B** Graf závislosti intenzity fluorescenčního signálu na vzdálenosti.



Obr. 18 Měření intenzity fluorescenčního signálu v kořenových špičkách vojtěšky (*Medicago sativa* L.) transformované konstruktem *proMMK2::GFP:cMMK2*. **A** Referenční snímek pro měření intenzity fluorescenčního signálu, červená šipka značí směr měření. Měřítka 50 μm. **B** Graf závislosti intenzity fluorescenčního signálu na vzdálenosti.



Obr. 19 Měření intenzity fluorescenčního signálu v kořenech semenáčku vojtěšky (*Medicago sativa* L.), kontrolní linie RSY. **A** Referenční snímek pro měření intenzity fluorescenčního signálu, červená šipka značí směr měření. Měřítko 50 μm . **B** Graf závislosti intenzity fluorescenčního signálu na vzdálenosti.



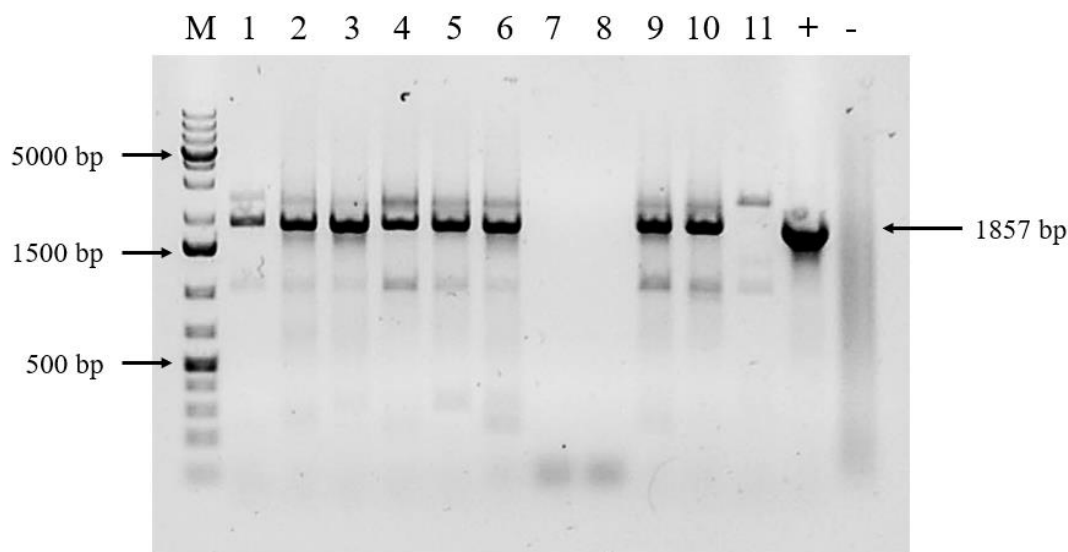
Obr. 20 Graf porovnání profilů intenzity fluorescence GFP-MMK2 proteinu naměřených v kořenových špičkách transgenních rostlin vojtěšky (*Medicago sativa* L.) transformovaných konstrukty *35S::GFP:cMMK2*, *AtUBQ10::GFP:cMMK2*, *proMMK2::GFP:cMMK2* a kontrolní linie RSY.

4.3.2 Ověření přítomnost fúzních genů v transformovaných rostlinách *Medicago sativa*

Pro ověření úspěšnosti transformace rostlin vojtěšky (*Medicago sativa* L.) byla izolována DNA z listů regenerovaných rostlin, která sloužila jako templát pro PCR reakci. Zvolené primery definovaly oblast DNA, odpovídající fúznímu genu *GFP:cMMK2*. Z celkových 10 regenerovaných rostlin byla prokázána přítomnost

fúzního genu *GFP:cMMK2* v genomu vojtěšky u 8 rostlin. Elektroforeogram PCR produktů (Obr. 21) byl negativní pro rostliny č. 7 a 8, které byly transformované konstruktem *35S::GFP:cMMK2*, u ostatních rostlin byla přítomnost fúzního genu *GFP:cMMK2* prokázána.

Celkem byly tedy připraveny a ověřeny 4 rostliny vojtěšky s expresí *GFP:cMMK2* pod kontrolou nativního promotoru, 2 rostliny s expresí *GFP:cMMK2* pod kontrolou *AtUBQ10* promotoru a 2 rostliny s expresí *GFP:cMMK2* pod kontrolou *35S* promotoru.



Obr. 21 Elektroforeogram PCR produktů pro ověření úspěšnosti transformace rostlin vojtěšky (*Medicago sativa* L.) genem *GFP:cMMK2* pod kontrolou různých promotorů. Rostliny 1-4 byly transformované konstruktem *proMMK2::GFP:cMMK2*. Rostliny 5-6 byly transformované konstruktem *AtUBQ10::GFP:cMMK2*. Rostliny 7-10 byly transformované konstruktem *35S::GFP:cMMK2*. Rostlina 11 je kontrolní linie RSY. M - standart molekulové hmotnosti (GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder), + pozitivní kontrola, - negativní kontrola, očekávaná velikost PCR fragmentů je 1857 bp.

5 DISKUZE

V praktické části této diplomové práce byl popsán proces transformace zemědělsky prospěšné rostliny vojtěšky (*Medicago sativa* L.). Cílem transformace byla integrace konstruktů, kódujících fluorescenčně značenou mitogen-aktivovanou proteinkinasu MMK2, do genomu rostlin a získání stabilně transformovaných rostlin pomocí somatické embryogeneze.

Prvním krokem k získání transgenních rostlin byla transformace bakterií *Ag. tumefaciens*, které sloužily jako vektor pro *Agrobacterium*-zprostředkovanou transformaci. *Ag. tumefaciens* bylo transformováno konstrukty *proMMK2::GFP::cMMK2*, *35S::GFP::cMMK2* a *AtUBQ10::GFP::cMMK2*, které byly vloženy do expresního plazmidu pB7m34GW,0 (Karimi *et al.*, 2005). Tyto konstrukty byly připraveny N-terminální fúzí genu zeleného fluorescenčního proteinu GFP k *cMMK2* pod kontrolou různých promotorů. Prvním byl nativní promotor *proMMK* (1536 bp předcházející kódující sekvenci *MMK2*). Dalším byl konstitutivního promotor CaMV (Cauliflower mosaic virus) 35S. Promotor 35S je nejvyužívanějším konstitutivním promotorem pro expresi transgenů ve dvouděložných rostlinách. Silná exprese transgenů pod jeho kontrolou byla popsána v řadě pletivových typů vojtěšky (Thomas *et al.*, 1994; Samac *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2019). Posledním použitým promotorem byl konstitutivní ubiquitinový promotor *AtUBQ10* z rostliny *Arabidopsis thaliana*, taktéž úspěšně využívaný u vojtěšky (Wolabu *et al.*, 2020) a také u modelové rostliny *Medicago truncatula* (Ivanov a Harrison, 2014); Zhang *et al.*, 2019).

Plazmidy nesoucí dané konstrukty byly vneseny do *Ag. tumefaciens* pomocí metody chladového šoku. Úspěšnost transformace *Ag. tumefaciens* byla ověřena pomocí PCR. Z kultury transformovaných bakterií byla izolována plazmidová DNA a za využití navržených primerů byl namnožen 1113 bp velký *MMK2* PCR fragment. Takto bylo ověřeno, že získané kultury *Ag. tumefaciens* byly úspěšně transformovány plazmidy nesoucí požadované konstrukty.

Za účelem ověření funkčnosti konstruktů v rostlinných buňkách byly provedeny transientní transformace dobře vyvinutých listů rostliny *Nicotiana benthamiana* agroinfiltrací. Transientní transformace je dočasná transformace buněk, při které nedochází k integraci cizorodé DNA do jádra. Vnesený konstrukt vedený pod promotorem je v rostlinných buňkách exprimován jen po omezenou dobu, není replikován a po čase je z buňky zcela odbourán. Tato metoda je vhodná pro testování

konstruktů díky její nízké časové náročnosti a jednoduchému provedení (Křenek *et al.*, 2015). *Nicotiana benthamiana* je hojně využívána pro transientní transformaci, především díky její náchylnosti vůči širokému spektru rostlinných patogenů a díky vysoké účinnosti její transformace (Schob *et al.*, 1997; Goodin *et al.*, 2002). Pozorování exprese konstruktů v epidermálních buňkách agroinfiltrovaných částí listů *Nicotiana benthamiana* bylo provedeno 3. den po transformaci za využití konfokálního laserového skenovacího mikroskopu a konfokálního laserového mikroskopu s rotujícím diskem. Všechny tři ověřované konstrukty byly úspěšně exprimované v epidermálních buňkách a bylo možno pozorovat signál přítomné GFP fluorescenčně značené MAP kinasy MMK2. Signál byl pozorován v jádře, v oblastech kolem cytoplazmatické membrány a cytoplazmatických vláken.

Hlavním cílem praktické části této diplomové práce byla stabilní transformace rostlin vojtěšky. Pro transformaci byl využit kultivar Regen-SY (RSY), který je oproti divokému typu lépe regenerovatelný z pletivových kultur (Bingham, 1989). Stabilní transformace byla provedena podle protokolu od Samac a Austin-Phillips (2006) a využívala *Ag. tumefaciens* jako přenašeč plazmidového vektoru. Tento protokol byl založen na poznatcích získaných postupným studiem metod transformace a regenerace vojtěšky z pletivových kultur (Saunders a Bingham, 1972; Mitten *et al.*, 1984; Brown a Atanassov, 1985; Matheson *et al.*, 1990; Samac, 1995). Rostliny byly regenerovány procesem somatické embryogeneze. Jako explantáty byly využity mladé lístky, u kterých bylo po *Agrobacterium*-zprostředkované transformaci vlivem hormonálního složení kultivačních médií indukováno neorganizované buněčné množení a tvorba kalusu vlivem hormonálního složení kultivačních médií. Pro selekci transformovaných buněk a pletiv bylo v médiích využito selekční herbicid fosfinotricin (D'Halluin *et al.*, 1990, Montague *et al.*, 2007), vůči němuž byla do buněk spolu s *GFP:MMK2* vnesena rezistence. Následně byla z kalusů indukovaná tvorba somatických embryí úpravou složení kultivačních médií. Ze získaných embryí byly získány transgenní rostliny, obdobně jako v práci Hrbáčková *et al.* (2021). Regenerované rostliny byly selektovány pomocí fluorescenční mikroskopie a úspěšnost transformace byla následně ověřena pomocí PCR genotypování namnožením 1857 bp velkého *GFP-MMK2* PCR fragmentu z izolované rostlinné DNA.

Výsledkem praktické části byl získání stabilně transformovaných linií vojtěšky geny GFP fluorescenčně značené mitogen-aktivované proteinkinasy MMK2 pod kontrolou nativního a konstitutivního promotoru. Mikroskopické pozorování kořenů semenáčků

transgenních rostlin nám umožnilo měření intenzity signálu GFP-MMK2 v kolumele a tím i porovnání intenzity exprese mezi konstrukty. Nejsilnější fluorescenční signál byl naměřen u linie transformované konstruktem *35S::GFP:cMMK2*, poté u linie transformované konstruktem *AtUBQ10::GFP:cMMK2*. Velmi slabý signál byl naopak naměřen u linie transformované konstruktem *proMMK2::GFP:cMMK2*, který byl pod kontrolou nativního promotoru. Z výsledků vyplývá, že nativní exprese *MMK2* genu by mohla být vývojově nebo pletivově specifická, a proto nebyl fluorescenční signál GFP-MMK2 u těchto linií téměř pozorován, přestože byla pomocí PCR prokázána přítomnost fúze genů kódujících tento protein. Pro ověření by však bylo třeba dalších experimentů a metod, jako například qPCR, kterou pro sledování exprese transgenů ve vojtěšce využili například Guertler *et al.* (2019) nebo Stritzler *et al.* (2019). Metoda qPCR by mohla být využita pro porovnání míry exprese transgenů pod vedením různých promotorů a míry exprese *MMK2* v kontrolní linii RSY. Vhodné by bylo také využití metody western blot pro detekci fúzních proteinů GFP-MMK2 v transformovaných rostlinách za využití protilátek specifických k *MMK2* a porovnání abundance fúzního proteinu GFP-MMK2 v transgenních rostlinách a proteinu *MMK2* v kontrolní linii RSY (Jonak *et al.*, 1995; Cardinale *et al.*, 2000, Cardinale *et al.*, 2002, Ouaked *et al.*, 2003).

Identifikace jednotlivých komponentů MAP kinasových signálních drah, zkoumání jejich funkce, lokalizace a jejich interakcí s dalšími signálními molekulami a substráty je důležité pro studium mechanismů odpovědi rostlin na biotický a abiotický stres. Fluorescenční značení MAP kinasy *MMK2*, zprostředkované zeleným fluorescenčním proteinem GFP, umožní studium její funkce a lokalizace v zemědělsky významné vojtěšce. Dosud je o funkci *MMK2* známo jen velmi málo informací. Má roli v signálních drahách účastnících se odpovědi na stres z těžkých kovů. Publikováno bylo její zapojení do odpovědi na stres z měďnatých a kadmiových iontů, ačkoliv dosud nejsou známe veškeré komponenty vedoucí k tomuto zapojení (Jonak *et al.*, 2004). Je také předpokládána role *MMK2* v signálních drahách účastnících se odpovědi na biotický stres. Aktivace *MMK2* byla pozorována při inkubaci s kvasinkovými elicitory Pep13, chitinem a β -glukanem (Cardinale *et al.*, 2000; Cardinale *et al.*, 2002). *MMK2* je zároveň orthologem *MPK4* z rostliny *Arabidopsis thaliana*. *MPK4* je MAP kinasa, která je lokalizovaná v jádře a cytoplazmě a má v *Arabidopsis thaliana* významnou roli v odpovědi na stres z patogenů (Desikan *et al.*, 2001; Andreasson *et al.*, 2005; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2007; Jeena *et al.*, 2015).

To vede k dalšímu předpokladu většího zapojení MMK2 do rostlinné odpovědi na biotický stres. Byla také popsána role MPK4 v tvorbě buněčné přepážky při cytokinezi buněk *Arabidopsis thaliana* (Kosetsu *et al.*, 2010) a také její vliv na aktivitu proteinu MAP65-1, účastníčího se organizace kortikálních mikrotubulů epidermálních buněk *Arabidopsis thaliana* (Beck *et al.*, 2010). Na základě předpokládané funkční podobnosti MMK2 a MPK4 je odhadováno zapojení MMK2 také do těchto buněčných dějů.

Biotický stres je jedním z významných faktorů ovlivňujících pěstování vojtěšky (Hrbáčková *et al.*, 2020). Má silný efekt na její vývoj a úrodnost. Biotechnologické metody vedoucí k dosažení rezistence rostlin proti patogenům mohou ovlivnit odolnost rostlin, snížení množství celosvětově užívaných pesticidů a zvýšení výnosu a kvality produkovaných plodin (Kudapa *et al.*, 2013). Odvození nebo vytvoření tolerantních druhů plodin vůči nejen biotickým, ale i abiotickým stresovým podmínkám, je zásadní pro udržitelnost zemědělství v budoucnosti (Farooq a Siddique, 2017). Pochopení mechanismů funkce signálních drah, odpovídajících za rostlinné odpovědi na tyto stresové podmínky, je klíčové pro další rozvoj biotechnologických metod (Bevan *et al.*, 2017). Zkoumání signálních drah ve vojtěšce může také pomoci hlubšímu pochopení symbiotického vztahu vojtěšky a prospěšných rhizobiálních bakterií, fixujících vzdušný dusík, vedoucímu k přirozenému obohacování zemědělské půdy dusíkatými sloučeninami (Doyle a Luckow, 2003; Triboi a Tribouy-Blondel, 2014).

6 ZÁVĚR

V teoretické části této diplomové práce byla vypracovaná literární rešerše, zabývající se obecnou charakteristikou vojtěšky (*Medicago sativa* L.) a jejího zemědělského využití, významem a funkcí mitogen-aktivovaných proteinkinás a možnostmi transformace vojtěšky v oblasti genového inženýrství.

Vojtěška patří mezi nejvýznamnější zemědělské plodiny. Má velké zastoupení v celkovém množství celosvětově pěstovaných píceň, zejména kvůli jejímu nutričně hodnotnému složení. Velký význam má také v osevním postupu. Svým kořenovým systémem zkvalitňuje a zkypruje zemědělskou půdu. Její schopnost vstoupit do symbiózy s rhizobiálními bakteriemi a fixovat vzdušný dusík způsobuje, že ve velké míře zúrodňuje své okolí. Tento přirozený způsob obohacování půdy má potenciál nahradit využívání zemědělských hnojiv s obsahem dusíku, pro které se hledá alternativa, vzhledem k jejich negativnímu dopadu na životní prostředí. S ohledem na tyto skutečnosti je kladen důraz na studium fyziologie vojtěšky a signálních drah, zprostředkávajících odpovědi rostliny na externí podněty.

Tato práce se zabývala MAP kinasovou signální dráhou, hrající důležitou roli v přenosu signálů v rostlině. Má velký význam v rostlinné odpovědi na biotický a abiotický stres. V teoretické části byly popsány její základní mechanismy a její úloha a zástupci ve vojtěšce. Zvláštní důraz byl kladen na MAP kinasu MMK2, u které je, kromě úlohy v odpovědi na abiotický stres, předpokládána také její role v odpovědi na biotický stres.

V praktické části diplomové práce byly realizovány experimenty s cílem získat stabilně transformované rostliny vojtěšky, které produkují GFP fluorescenčně značenou MAP kinasu MMK2. K tomu byla využita *Agrobacterium*-zprostředkovaná transformační metoda. *Ag. tumefaciens* bylo transformováno konstrukty *35S::GFP:cMMK2*, *proMMK2::GFP:cMMK2* a *AtUBQ10::GFP:cMMK2*, kódujícími fluorescenčně značenou MMK2. Funkčnost konstruktů byla ověřena provedením transientní transformace listů *Nicotiana benthamiana*. Všechny konstrukty úspěšně exprimovaly fluorescenčně značenou MMK2.

Po ověření konstruktů byla provedena stabilní transformace vojtěšky a rostliny byly regenerovány procesem somatické embryogeneze, byly získány transgenní rostliny a byla pozorována fluorescence GFP-MMK2 proteinu v kořenových špičkách. Integrace genů fluorescenčně značené mitogen-aktivované proteinkinasy MMK2 byla následně ověřena pomocí PCR genotypování.

7 LITERATURA

citace článků:

- Andreasson E., Jenkins T., Brodersen P., Thorgrimsen S., Petersen N.H., Zhu S., Qiu J.L., Micheelsen P., Rocher A., Petersen M., Newman M.A., Bjorn Nielsen H., Hirt H., Somssich I., Mattsson O., Mundy J. (2005): The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *The EMBO Journal* **24(14)**, 2579-2589.
- Atanassov A., Brown D.C.W. (1984): Plant regeneration from suspension culture and mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **3**, 149-162.
- Baltes N.J., Gil-Humanes J., Voytas D.F. (2017): Genome engineering and agriculture: opportunities and challenges. *Progress in molecular biology and translational science* **149**, 1-26.
- Bates G., Gaynor J., Shekhawat N. (1983): Fusion of plant protoplasts by electric fields. *Journal of Plant Physiology* **72(4)**, 1110–3.
- Beck M., Komis G., Müller J., Menzel D., Šamaj J. (2010): *Arabidopsis* Homologs of Nucleus- and Phragmoplast-Localized Kinase 2 and 3 and Mitogen-Activated Protein Kinase 4 Are Essential for Microtubule Organization. *The Plant Cell* **22(3)**, 755–771.
- Bevan M. (1984): Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic acids research* **12(22)**, 8711-8721.
- Bevan M.W., Chilton M.D. (1982): T-DNA of the *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **16**, 357-384.
- Bevan M.W., Uauy C., Wulf B.B., Zhou J., Krasileva K., Clark, M.D. (2017): Genomic innovation for crop improvement. *Nature* **543**, 346–354.
- Bhatia S., Bera T., Dahiya R., Bera T., Bhatia S., Bera T. (2015): Classical and nonclassical techniques for secondary metabolite production in plant cell culture. *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, 231-291.
- Bigéard J., Hirt H. (2018): Nuclear signaling of plant MAPKs. *Frontiers in plant science* **9**, 469.
- Bingham E. (1991): Registration of alfalfa hybrid Regen-SY germplasm for tissue culture and transformation. *Crop Science* **31**, 1098–1118.
- Bolton E.T., McCarthy B.J. (1962): A general method for the isolation of RNA complementary to DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **48(8)**, 1390.
- Bora K.S., Sharma A. (2011): Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: a review. *Pharmaceutical biology* **49(2)**, 211-220.
- Boulton T.G., Nye S.H., Robbins D.J., Ip N.Y., Radzlejewska E., Morgenbesser S.D., Yancopoulos G.D. (1991): ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* **65(4)**, 663-675.
- Braun A. C. (1947): Thermal studies on the factors responsible for tumor initiation in crown gall. *American Journal of Botany* **34**, 234–240.
- Brown D.C.W., Atanassov A. (1985): Role of genetic background in somatic embryogenesis in *Medicago*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **4**, 111–122.
- Brown N. A., Gardner F.E. (1936): Galls produced by plant hormones, including a hormone extracted from *Bacterium tumefaciens*. *Phytopathology* **26**, 708-713.
- Bögre L., Calderini O., Binarova P., Mattauch M., Till S., Kiegerl S., Jonak C., Pollaschek C., Barker P., Huskisson N.S., Heribert H., Heberle-Bors E. (1999): A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *The Plant Cell* **11**, 101-113.
- Bögre L., Ligterink W., Heberle-Bors E., Hirt H. (1996): Mechanosensors in plants. *Nature* **383**, 489–490.
- Bögre L., Ligterink W., Meskiene I., Barker P.J., Heberle-Bors E., Huskisson N.S., Hirt H. (1997): Wounding induces the rapid and transient activation of a specific MAP kinase pathway. *The Plant Cell* **9**, 75–83.

- 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**(47), 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**(3), 703-711.
- Clough S.J., Bent, A.F. (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**, 735-743.
- Colcombet J., Hirt H. (2008): Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal* **413**(2), 217-226.
- Cren M., Kondorosi A., Kondorosi E. (1995): NoIR controls expression of the *Rhizobium meliloti* nodulation genes involved in the core Nod factors synthesis. *Molecular biology* **5**, 733-747.
- D'Halluin K., Botterman J., De Greef W. (1990): Engineering of herbicide-resistant alfalfa and evaluation under field conditions. *Crop Science* **30**, 866-871
- Dai S., Zheng P., Marmey P., Zhang S., Tian W., Chen S., Fauquet C. (2001): Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Molecular Breeding* **7**(1), 25-33.
- de Framond A.J., Barton K.A., Chilton M.D. (1983): Mini-Ti: a new vector strategy for plant genetic engineering. *Biotechnology* **1**(3), 262-269.
- DeCleene M., DeLey, J. (1976): The host range of crown gall. *The Botanical Review* **42**, 389-466.
- Desikan R., Hancock J.T., Ichimura K., Shinozaki K., Neill S.J. (2001): Harpin induces activation of the *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiology* **126**(4), 1579-1587.
- Dhanasekaran, D. N., Kashef K., Lee C. M., Xu H., Reddy E. P. (2007): Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene* **26**(22), 3185-3202.
- Dijak M., Brown D.C.W. (1987): Patterns of direct and indirect embryogenesis from mesophyll protoplasts of *Medicago sativa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **9**(2), 121-130.
- Dóczi R., Ökrész L., Romero A. E., Paccanaro A., Bögre L. (2012): Exploring the evolutionary path of plant MAPK networks. *Trends in plant science* **17**(9), 518-525.
- Doyle J J., Luckow M.A. (2003): The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology* **131**, 900-910.
- Ely C.M., Oddie K.M., Litz J.S., Rossomando A.J., Kanner S.B., Sturgill, T.W., Parsons S.J., (1990): A 42-kDa tyrosine kinase substrate linked to chromaffin cell secretion exhibits an associated MAP kinase activity and is highly related to a 42-kDa mitogen-stimulated protein in fibroblasts. *Journal of Cell Biology* **110**, 731-742
- Feilner T., Hultschig C., Lee J., Meyer S., Immink R.G., Koenig A., Possling A., Seitz H., Beveridge A., Scheel D., Cahill J.S., Lehrach H., Kreutzberger J., Kersten B. (2005): High throughput identification of potential *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase substrates. *Molecular & Cell Proteomics* **4**, 1558-68.
- Fischer H.M. (1994): Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiological reviews* **58**(3), 352-386.
- Fronzes R., Christie P.J., Waksman G. (2009): The structural biology of type IV secretion systems. *Nature Reviews Microbiology* **7**, 703-714.
- Gage D.J. (2004): Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**, 280-300.
- Gelvin S.B. (2003): *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and molecular biology reviews* **67**(1), 16-37.
- Gelvin, S. B. (1998). *Agrobacterium* VirE2 proteins can form a complex with T strands in the plant cytoplasm. *Journal of Bacteriology* **180**(16), 4300-4302.
- Gielen J., Terryn N., Villarroel R., Van Montagu M. (1999): Complete nucleotide sequence of the T-DNA region of the plant tumour-inducing *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiC58. *Journal of experimental botany* **50**, 1421-1422.

- Goodin M. M., Dietzgen R. G., Schichnes D., Ruzin S., Jackson A. O. (2002): pGD vectors: Versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves. *The Plant Journal* **31**, 375-383.
- Guertler P., Grohmann L., Naumann H., Pavlovic M., Busch U. (2019): Development of event-specific qPCR detection methods for genetically modified alfalfa events J101, J163 and KK179. *Biomolecular detection and quantification* **17**, 100076.
- Harrison M.J., Choudhary A.D., Dubery I., Lamb C.J., Dixon R.A. (1991): Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). 8. Cis-elements and trans-acting factors for the quantitative expression of a bean chalcone synthase gene promoter in electroporated alfalfa protoplasts. *Plant molecular biology* **16(5)**, 877-890.
- Hawkins C., Yu L. X. (2018): Recent progress in alfalfa (*Medicago sativa* L.) genomics and genomic selection. *The Crop Journal* **6(6)**, 565-575.
- 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.
- Howe L.R., Leever S.J., Gómez N., Nakielny S., Cohen P., Marshall C.J. (1992): Activation of the MAP Kinase Pathway by the Protein Kinase raf. *Cell* **71**, 335-342.
- Hrbáčková M., Dvořák P., Takáč T., Tichá M., Luptovčíak I., Šamajová O., Šamaj, J. (2020): Biotechnological Perspectives of Omics and Genetic Engineering Methods in Alfalfa. *Frontiers in Plant Science* **11**, 592.
- 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.
- Choudhary A.D., Kessmann H., Lamb Ch.J., Dixon R.A. (1990): Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) IV. Expression of defense gene constructs in electroporated suspension cell protoplasts. *Plant Cell Reports* **9**, 42-46.
- Christie P.J. (2004): Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochimica et Biophysica Acta* **1694**, 219-234.
- Ibáñez F., Wall L., Fabra A. (2016): Starting points of plant-bacteria nitrogen-fixing symbioses: intercellular invasion of the roots. *Journal of Experimental Botany* **68**, 1905-1918.
- Ishihama N., Yoshioka H. (2012): Post-translational regulation of WRKY transcription factors in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **15**, 431-437.
- Ivanov S., Harrison M.J. (2014): A set of fluorescent protein-based markers expressed from constitutive and arbuscular mycorrhiza-inducible promoters to label organelles, membranes and cytoskeletal elements in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal* **80(6)**, 1151-1163.
- Jeena D., Baunthiyal M., Pandey D., Gupta A.K. (2015): ATMPK4 and ATMPK6 transcript and protein profiling in *Arabidopsis thaliana* plants challenged with zeatin and *Alternaria brassicae*. *Journal of Plant Pathology & Microbiology Journal* **14(3)**, 97-112.
- Jonak C., Kiegerl S., Hirt H., Lloyd C., Chan J. (1995): MMK2, a novel alfalfa MAP kinase, specifically complements the yeast MPK1 function. *Molecular and General Genetics* **248(6)**, 686-694.
- 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* **93(20)**, 11274-11279.
- Jonak C., Nakagami H., Hirt H. (2004): Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant physiology* **136(2)**, 3276-3283.
- Jonak C., Páy A., Bögre L., Hirt H., Heberle-Bors E. (1993): The plant homolog of MAP kinase is expressed in a cell cycle-dependent and organ specific manner. *The Plant Journal* **3**, 611- 617.

- Kang J., Zhang Q., Jiang X., Zhang T., Long R., Yang Q., Wang Z. (2019): Molecular Cloning and Functional Identification of a Squalene Synthase Encoding Gene from Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *International Journal of Molecular Sciences* **20(18)**, 4499.
- Kao K.N., Michayluk M.R. (1980): Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa. *Z Pflanzenphysiol* **96(2)**, 135–141.
- Karimi M., De Meyer B., Hilson P. (2005): Modular cloning in plant cells. *Trends in Plant Science* **10**, 103–105.
- Keshavareddy G., Kumar A.R.V., Ramu V.S. (2018): Methods of plant transformation - a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* **7(7)**, 2656-2668.
- Keshet Y., Seger R. (2010): The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods in Molecular Biology* **661**, 3- 38.
- Kiegerl S., Cardinale F., Siligan C., Gross A., Baudouin E., Liwosz A., Meskiene I. (2000): SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. *The Plant Cell* **12(11)**, 2247-2258.
- Klein T.M., Wolf E.D., Wu R., Sanford J.C. (1987): High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* **327**, 70-73.
- Komis G., Novák D., Ovečka M., Šamajová O., Šamaj J. (2018): Advances in imaging plant cell dynamics. *Plant physiology* **176(1)**, 80-93.
- Kosetsu K., Matsunaga S., Nakagami H., Colcombet J., Sasabe M., Soyano T., Machida Y. (2010): The MAP kinase MPK4 is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **22(11)**, 3778-3790.
- Kosturkova G. (1993): Expression of foreign genes following electroporation of *Medicago* protoplasts. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **7(2)**, 43-46.
- Křenek P., Šamajová O., Luptovčíak I., Doskočilová A., Komis G., Šamaj J. (2015): Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. *Biotechnology Advances* **33(6)**, 1024-1042.
- Kudapa H., Ramalingam A., Nayakoti S., Chen X., Zhuang W.J., Liang X., Varshney R.K. (2013): Functional genomics to study stress responses in crop legumes: progress and prospects. *Functional Plant Biology* **40(12)**, 1221-1233.
- Lacroix B., Citovsky V. (2019): Pathways of DNA transfer to plants from *Agrobacterium tumefaciens* and related bacterial species. *Annual review of phytopathology* **57**, 231-251.
- Lacroix B., Li J., Tzfira T., Citovsky V. (2006): Will you let me use your nucleus? How *Agrobacterium* gets its T-DNA expressed in the host plant cell. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **84**, 333-345.
- Levine M. (1947): The growth of normal plant tissue in vitro as effected by chemical carcinogens and plant growth substances. The culture of the carrot tap root meristem. *American Journal of Botany* **37**, 445–452
- Liu Z. H., Zhang H.M., Li G.L., Guo X.L., Chen S.Y., Liu G.B., Zhang Y.M. (2011): Enhancement of salt tolerance in alfalfa transformed with the gene encoding for betaine aldehyde dehydrogenase. *Euphytica* **178(3)**, 363-372.
- Liu J., Nannas N.J., Fu F.F., Shi J., Aspinwall B., Parrott W.A., Dawe R.K. (2019): Genom-scale sequence disruption following biolistic transformation in rice and maize. *Plant Cell* **31**: 368–383.
- Lu C., Vasil I.K., Ozias-Akins P. (1982): Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. *Theoretical and Applied Genetics* **62(2)**, 109-112.
- Matheson S.L., Nowak J., MacLean N.L. (1990): Selection of regenerative genotypes from highly productive cultivars of alfalfa. *Euphytica* **45(2)**, 105-112.
- McCoy T.J., Bingham E.T. (1977): Regeneration of diploid alfalfa plants from cells grown in suspension culture. *Plant Science Letters* **10(1)**, 59-66.
- Mitten D.H., Sato S.J., Skokut T.A. (1984): *In vitro* regenerative potential of alfalfa germplasm sources. *Crop Science* **24**, 943–945.
- Montague A., Ziauddin A., Lee R., Ainley W.M., Strommer J. (2007): High-efficiency phosphinothricin-based selection for alfalfa transformation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **91(1)**, 29-36.

- Morrison D.K. (2012): MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **4(11)**, a011254.
- Munnik T., Ligterink W., Meskiene I., Calderini O., Beyerly J., Musgrave A., Hirt, H. (1999): Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress. *The Plant Journal* **20(4)**, 381-388.
- Nakagami H., Kiegerl S., Hirt H. (2004): OMTK1, a novel MAPKKK, channels oxidative stress signaling through direct MAPK interaction. *Journal of Biological Chemistry* **279(26)**, 26959-26966.
- Nester E.W., Gordon M.P., Amasino R.M., Yanofsky M.F. (1984): Crown gall: a molecular and physiological analysis. *Annual Review of Plant Physiology* **35**, 387-413.
- Nilsson O., Olsson O. (1997): Getting to the root: the role of the *Agrobacterium rhizogenes* rol genes in the formation of hairy roots. *Physiologia Plantarum* **100(3)**, 463-473.
- Ouaked F., Rozhon W., Lecourieux D., Hirt, H. (2003): A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *The EMBO Journal* **22(6)**, 1282-1288.
- Ovečka M., Takáč T., Komis G., Vadovič P., Bekešová S., Doskočilová A., Smékalová V., Luptovčiak I., Šamajová O., Schweighofer A., Meskiene I., Jonak C., Křenek P., Lichtscheidl I., Skultety L., Hirt H., Šamaj J. (2014): Salt-induced subcellular kinase relocation and seeding susceptibility caused by overexpression of *Medicago* SIMKK in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **65(9)**, 2335-2350.
- Păcurar D.I., Thordal-Christensen H., Păcurar M.L., Pamfil D., Botez C., Bellini C. (2011): *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **76(2)**, 76-81.
- Pearson G., Robinson F., Beers Gibson T., Xu B.E., Karandikar M., Berman K., Cobb M.H. (2001): Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews* **22(2)**, 153-183.
- Pereira L.F., Erickson L. (1995): Stable transformation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) by particle bombardment. *Plant cell reports* **14**, 290-293.
- Rafińska K., Pomastowski P., Wrona O., Górecki R., Buszewski B. (2016): *Medicago sativa* as a source of secondary metabolites for agriculture and pharmaceutical industry. *Phytochemistry Letters* **20**, 520-539.
- Rakoczy-Trojanowska M. (2002): Alternative methods of plant transformation – a short review. *Cellular & Molecular Biology Letters* **7(3)**, 849–58.
- Ramaiah S.M., Skinner D.Z. (1997): Particle bombardment: A simple and efficient method of alfalfa (*Medicago sativa* L.) pollen transformation. *Current Science* **73**, 674-682.
- Raman M., Chen W., Cobb M.H. (2007): Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* **26(22)**, 3100-3112.
- Rashmi R., Manisha Sarkar V. (1997): Cultivation of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Ancient science of life* **17(2)**, 117.
- Reinert J. (1985): Morphogenese and ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Carotten, *Naturwissenschaft* **45**, 344-355.
- Rivera A.L., Gómez-Lim M., Fernández F., Loske A.M. (2012): Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews* **9**, 308-345.
- Samac D.A. (1995): Strain specificity in transformation of alfalfa by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **43**, 271–277.
- Samac D.A., Tesfaye M., Dornbusch M., Saruul P., Temple S.J. (2004): A comparison of constitutive promoters for expression of transgenes in alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic research* **13(4)**, 349-361.
- Sanford J. C. (1990): Biolistic plant transformation. *Physiologia Plantarum* **79(1)**, 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(1)**, 27-37.
- Sangwan V., Örvar 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(5)**, 629-638.

- Saunders J.W., Bingham E.T. (1972): Production of alfalfa plants from callus tissue. *Crop Science* **12**(6), 804-808.
- Schob H., Kunz C., Meins F. Jr. (1997): Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: a simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing. *Molecular and General Genetics* **256**, 581-585.
- Smékalová V., Doskočilová A., Komis G., Šamaj J. (2014): Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology advances* **32**(1), 2-11.
- Smith E.F., Townsend C.O. (1907): A plant-tumor of bacterial origin. *Science* **25**, 671-673.
- Stachel S.E., Nester, E.W. (1986): The genetic and transcriptional organization of the vir region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *The EMBO journal* **5**(7), 1445-1454.
- Steward F.C. (1985): Growth and development of cultivated cells. III. Interpretations of the growth from free cell to carrot plant. *American Journal of Botany* **45**, 708-709.
- Suarez-Rodriguez M.C., Adams-Phillips L., Liu Y., Wang H., Su S.H., Jester P.J., Krysan P.J. (2007): MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in *Arabidopsis* plants. *Plant physiology* **143**(2), 661-669.
- Suri S.S., Dhindsa R.S. (2008): A heat-activated MAP kinase (HAMK) as a mediator of heat shock response in tobacco cells. *Plant, cell & environment* **31**(2), 218-226.
- Šamajová O., Komis G., Šamaj J. (2013a): Emerging topics in the cell biology of mitogen-activated protein kinases. *Trends in Plant Science* **18**(3), 140-148.
- 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**(1), 118-128.
- Tang L., Cai H., Zhai H., Luo X., Wang Z., Cui L., Bai X. (2014): Overexpression of Glycine soja WRKY20 enhances both drought and salt tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **118**(1), 77-86.
- 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.
- Thomas J.C., Wasmann C.C., Echt C., Dunn R.L., Bohnert H.J., McCoy T.J. (1994): Introduction and expression of an insect proteinase inhibitor in alfalfa *Medicago sativa* L. *Plant Cell Reports* **14**(1), 31-36.
- Thorpe T.A. (2007): History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology* **37**, 169-180.
- Tichá M., Illésová P., Hrbáčková M., Basheer J., Novák D., Hlaváčková K., Šamaj J. *et al.* (2020): Tissue culture, genetic transformation, interaction with beneficial microbes, and modern bio-imaging techniques in alfalfa research. *Critical Reviews in Biotechnology* **40**(8), 1265-1280.
- Tohidfar M., Zare N., Jouzani G.S., Eftekhari S.M. (2013): *Agrobacterium*-mediated transformation of alfalfa (*Medicago sativa*) using a synthetic *cry3a* gene to enhance resistance against alfalfa weevil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **113**(2), 227-235.
- Treisman R. (1996): Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Current Opinion in Cell Biology* **8**, 205-215.
- Turgut-Kara N., Ari S. (2010): The optimization of voltage parameter for tissue electroporation in somatic embryos of *Astragalus chrysochlorus* (*Leguminosae*). *African Journal of Biotechnology* **9**(29), 4584-4588.
- Valentine L. (2003): *Agrobacterium tumefaciens* and the plant: the David and Goliath of modern Genetics. *Plant Physiology* **133**, 948-955.
- van Larebeke N., Genetello C., Schell J., Schilperoort R.A., Hermans A.K., Hernalsteens J.P., Van Montagu M. (1975): Acquisition of tumour-inducing ability by non-oncogenic agrobacteria as a result of plasmid transfer. *Nature* **255**, 742-743.
- Weeks J.T., Ye J., Rommens C.M. (2008): Development of an *in planta* method for transformation of alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic Research* **17**, 587-597.
- Wolabu T.W., Cong L., Park J.J., Bao Q., Chen M., Sun J., Wang, Z. Y. *et al.* (2020): Development of a highly efficient multiplex genome editing system in outcrossing tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Frontiers in plant science* **11**, 1063.

- Yadav N.S., Vanderleyden J., Bennett D.R., Barnes W.M., Chilton M.D. (1982): Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **79**, 6322-6326.
- Yoo S. D., Cho Y. H., Tena G., Xiong Y., Sheen, J. (2008): Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C₂H₄ signalling. *Nature* **451**, 789-795.
- Zaïdi I., Ebel C., Touzri M., Herzog E., Evrard J.L., Schmit A.C., Hanin M. (2010): TMKP1 is a novel wheat stress responsive MAP kinase phosphatase localized in the nucleus. *Plant molecular biology* **73**(3), 325-338.
- Zambryski P., Joos H., Genetello C., Leemans J., Van Montagu M., Schell J. (1983): Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *The EMBO journal* **2**(12), 2143-2150.
- Zambryski P.C. (1992): Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **43**, 465-490.
- Zhang W. J., Wang T. (2015): Enhanced salt tolerance of alfalfa (*Medicago sativa*) by *rstB* gene transformation. *Plant Science* **234**, 110-118.
- Zhang X., Han L., Wang Q., Zhang C., Yu Y., Tian J., Kong, Z. (2019): The host actin cytoskeleton channels rhizobia release and facilitates symbiosome accommodation during nodulation in *Medicago truncatula*. *New Phytologist* **221**(2), 1049-1059.
- Zimmerman J. L. (1993). Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The Plant Cell* **5**(10), 1411.
- Zimmermann U., Vienken J. (1982): Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *The Journal of Membrane Biology* **67**, 165-182.

citace knih:

- Alberts B., Johnson A.D, Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P. (2015): *Molecular Biology of the Cell*, 6th ed., Garland Science, New York, 1464 stran.
- Farooq M., Siddique K.H. (2017): *Innovations in dryland agriculture*. 1st ed., Springer, 571 stran.
- Komis G., Šamaj J. (2014): *Plant MAP Kinases. Methods and Protocols*. 1st ed., Springer, Berlin, 266 stran.
- Snustad D.P., Simmons M.J., Relichová J., Doškař J., Fajkus J., Hořin P., Relichová J. (2009): *Genetika*. 1st ed., Masarykova univerzita, Brno, 894 stran.
- Spohn M., Spohn R., Golte-Bechtle M. (2015): *Co tu kvete? Originální průvodce přírodou*. 1st ed., Knižní klub, Praha, 496 stran.

citace knih (nebo jejích částí) s editorem:

- Austin S., Bingham E.T., Mathews D.E., Shahan M.N., Will J., Burgess R.R. (1995): Production and field performance of transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) expressing alpha-amylase and manganese-dependent lignin peroxidase. In *The Methodology of Plant Genetic Manipulation: Criteria for Decision Making. Developments in Plant Breeding 3* (Cassells A.C., Jones P.W ed.), Springer, Dordrecht, 381-393.
- Barnes D. K. (1980): Alfalfa. In *Hybridization of Crop Plants* (Coffman W. R., Herrera R. M., Fehr W. R., Hadley H. H. ed.), American Society of Agronomy - Crop Science Society of America, USA, 177-187.
- Bent A. (2006): *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method. In *Agrobacterium protocols* (Wang K. ed.), 2nd ed., Humana Press, 87-104.
- Braun A.C. (1982): A history of the crown gall problem. In *Molecular biology of plant tumors*. (Kahl G., Schell J.S ed.), Academic Press, 155-210.
- Dudits, D., Györgyey, J., Bögre, L., Bakó, L. (1995): Molecular biology of somatic embryogenesis. In *In vitro embryogenesis in plants* (Thorpe T.A. ed.), Springer, Dordrecht, 267-308.

- Christie P.J. (2004): The *Agrobacterium* ti plasmids. In *Plasmid Biology* (Funnell B.E. ed.), ASM Press, 455-472.
- Samac D.A., Austin-Phillips S. (2006): Alfalfa (*Medicago sativa* L.). In *Methods of Molecular biology. Agrobacterium protocols* 343 (Wang K ed.), Humana Press, New Jersey, 301-311.
- Triboi E., Triboi-Blondel A.M. (2014): Towards sustainable, self-supporting agriculture: biological nitrogen factories as a key for future cropping systems. In *Soil as World Heritage* (Dent D. ed.), Springer, Dordrecht, 329–342.
- Veronesi F., Brummer E.C., Huyghe C. (2010): Alfalfa. In *Fodder Crops and Amenity Grasses* 5 (Boller B., Posselt U.K., Veronesi F. ed.), Springer, New York, 395-437.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2,4,5-T	kyselina trichlorfenoxyoctová
2,4-D	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
<i>Ag. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AU	arbitrary unit
B5 médium	Gamborg B5 médium
B50 médium	Gamborg B5 médium pro indukci tvorby embryí
B5H médium	Gamborg B5 médium pro indukci tvorby kalusu
<i>BADH</i>	betainaldehyddehydrogenasa
<i>bar</i>	bialaphos resistance
bp	párů bází
CaMV	Cauliflower mosaic virus
CAT	chloramfenikolacetyltransferasa
CDK	cyklin-dependentní proteinkinasy
CPA	4-chlorfenoxyoctová kyselina
<i>cry3a</i>	<i>cry3A</i> delta endotoxin
DEAE	diethylaminoethyl
dH ₂ O	destilovaná H ₂ O
dNTPs	deoxynukleosidtrifosfáty
dsT-DNA	dvouvláknová transferová DNA
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ERK	extracelulárně regulované kinasy
GFP	zelený fluorescenční protein
GUS	β-glucuronidasa
HAMK	heat-activated MAP kinase
LB médium	lysogen broth médium
<i>M. sativa</i>	<i>Medicago sativa</i>
MAP kinasa	mitogen-aktivovaná proteinkinasa
MAPK kinasa	mitogen-aktivovaná proteinkinasa kinasa
MAPK	mitogen-aktivovaná proteinkinasa
MAPKK kinasa	mitogen-aktivovaná proteinkinasa kinasa kinasa
MAPKK	mitogen-aktivovaná proteinkinasa kinasa
MAPKKK	mitogen-aktivovaná proteinkinasa kinasa kinasa
MES	2-(N-morfolino)ethan sulfonová kyselina

MMK1	<i>Medicago</i> MAP kinasa 1
MMK2	<i>Medicago</i> MAP kinasa 2
MMK3	<i>Medicago</i> MAP kinasa 3
MPK3	mitogen-aktivovaná proteinkinasa 3
MPK4	mitogen-aktivovaná proteinkinasa 4
MPK6	mitogen-aktivovaná proteinkinasa 6
NAA	kyselina 1-naftyloctová
<i>nod</i>	nodulační gen
Nod faktor	nodulační faktor
<i>NTPII</i>	neomycinfosfotransferasa II
OD ₆₀₀	optická hustota při vlnové délce 600 nm
OMTK1	oxidative stress-activated MAP triple-kinase 1
<i>pat</i>	phosphinothricin N-acetyltransferasa
PCR	polymerázová řetězová reakce
PEG	polyethylenglykolová metoda
Pep13	peptidoglykan 13
ROS	reaktivní formy kyslíku
<i>rstB</i>	<i>Rhizobium</i> salt tolerance B
RSY	kultivar Regen-SY
SAMK	stress-activated MAP kinase
SH médium	Schenk & Hildebrant médium
SIMK	stress-induced MAP kinase
SIMKK	stress-induced MAP kinase kinase
ssT-DNA	jednovláknová transferová DNA
TAE	tris-acetátový pufr
T-DNA	transferová DNA
<i>Ti</i> plazmid	tumor-indukující plazmid
v/v	objem na objem
<i>vir</i> geny	geny virulence
vir oblast	oblast virulence
Vir	proteiny virulence
w/v	hmotnost na objem
w/w	hmotnost na hmotnost
YEB médium	yeast extract beef médium