UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Oddělení buněčné biologie

Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum



Fenotypová analýza transgenních linií vojtěšky (*Medicago sativa*) exprimujících markery cytoskeletu v interakci s *Rhizobium*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

| Autor: | Bc. Lucie Adamczyková |
|-------------------|--|
| Studijní program: | N0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství |
| Specializace: | Biotechnologie a genové inženýrství |
| Forma studia: | Prezenční |
| Vedoucí práce: | Mgr. Olga Šamajová, Dr. |
| Rok: | 2021 |

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Byla jsem seznámena 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

Bc. Lucie Adamczyková

Velké poděkování patří vedoucí mé diplomové práce Mgr. Olze Šamajové, Dr. za odborné vedení, cenné rady a nemalou pomoc při zpracování této diplomové práce. Také bych ráda poděkovala konzultantce mé diplomové práce Mgr. Michaele Tiché, Ph.D. za trpělivost, pomoc a čas, který mi v laboratoři a při zpracování práce věnovala. Poděkování patří také všem zaměstnancům Oddělení buněčné biologie Centra regionu Haná, kteří mi byli vždy ochotni poradit. Na závěr bych ráda poděkovala i vedoucímu oddělení prof. RNDr. Jozefu Šamajovi, DrSc., za umožnění práce v laboratoři a využití veškerého vybavení. Tato práce byla podpořena studentským projektem IGA_PrF_2020_025.

Bibliografická identifikace

| Jméno a příjmení autora | Bc. Lucie Adamczyková |
|-------------------------|---|
| Název práce | Fenotypová analýza transgenních linií vojtěšky |
| | (Medicago sativa) exprimujících markery cytoskeletu |
| | v interakci s Rhizobium |
| Typ práce | Diplomová |
| Pracoviště | Oddělení buněčné biologie CRH |
| Vedoucí práce | Mgr. Olga Šamajová, Dr. |
| Rok obhajoby práce | 2021 |

Abstrakt

Nedostatek rostlinami využitelného dusíku v půdě je velký limitující faktor, který silně ovlivňuje schopnost fotosyntézy a normálního metabolismu. Rostliny z čeledi bobovitých, do které se řadí i vojtěška setá, si během evoluce vytvořily symbiotický vztah s bakteriemi rodu *Rhizobium*. Jedná se o mutualistický vztah, kdy rostliny bakteriím poskytují uhlíkaté sloučeniny, které bakterie využívají pro svůj metabolismus. Bakterie zase rostlinám dodávají dusík ve formě, jakou dokážou využít např. při biosyntéze aminokyselin. Na správný průběh symbiózy má vliv rostlinný cytoskelet. Ten je velmi dynamický, umožňuje zatočení kořenového vlásku okolo bakterií a pomáhá při prorůstání infekčního vlákna a uvolňování infekčních kapek s bakteriemi do buněk nodulu.

Jedním z cílů této diplomové práce byl *in silico* design a samotná příprava nových tubulinových markerů metodou molekulárního klonování Golden Gate. Dalším cílem bylo provedení fenotypové analýzy transgenních linií vojtěšky. Byly srovnávány stabilní transgenní linie nesoucí konstrukty *35S::tagRFP:TUA6* (pro mikrotubuly) a *35S::FABD2:GFP* (pro aktin) s kontrolní linií RSY. Byl sledován fenotyp kořenového systému a po aplikaci symbiotických bakterií také vývoj nodulů. Posledním cílem mé diplomové práce byla analýza rostlinného cytoskeletu v raných fázích interakce vojtěšky s bakteriemi *Sinorhizobium meliloti*.

| Klíčová slova | Fenotypová | analýza, | Medicago | sativa, | cytoskelet, |
|---------------|--------------|-----------|-------------|---------|-------------|
| | symbióza, kl | onování G | olden Gate, | markery | cytoskeletu |
| Počet stran | 108 | | | | |
| Počet příloh | 2 | | | | |
| Jazyk | Český | | | | |

Bibliographical identification

| Autor's first name | and | Bc. Lucie Adamczyková |
|--------------------------|-----|---|
| surname | | |
| Title | | Phenotypic analysis of alfalfa (Medicago sativa) |
| | | transgenic lines expressing cytoskeletal markers in |
| | | interactions with Rhizobium |
| Type of thesis | | Diploma |
| Department | | Cell biology CRH |
| Supervisor | | Mgr. Olga Šamajová, Dr. |
| The year of presentation | l | 2021 |
| | | |

Abstract

The lack of plant usable nitrogen in the soil is one of the major limiting factor that strongly affects the ability of photosynthesis and normal plant metabolism. Plants belonging to the Fabaceae family, including alfalfa, developed a symbiotic relationship with bacteria of the genus *Rhizobium* during evolution. Plants provide sugar compounds from photosynthesis that can be used by bacteria in a mutualistic relationship. In exchange bacteria supply plants with fixed nitrogen which can be used for example in the biosynthesis of amino acids. The process of symbiosis is affected by the plant cytoskeleton. It is very dynamic and allows the root hair to curl around bacteria, helps the infectious thread to grow through the root hair and to release infectious droplets with bacteria into cells of the nodule.

One goal of this diploma thesis was *in silico* design and the preparation of new tubulin markers by the method of molecular cloning using Golden Gate method. Next goal was a phenotypic analysis of transgenic alfalfa lines. Lines stably transferred with *35S::tagRFP:TUA6* (tubulin marker) and *35S:: FABD2:GFP* (actin marker) constructs were compared with the control line RSY. Phenotypes of root systems and development of nodules were analyzed. The last goal of my diploma thesis was the analysis of the plant cytoskeleton in the early stages of the interaction between alfalfa and bacteria *Sinorhizobium meliloti*.

| Keywords | Phenotypic analysis, Medicago sativa, cytoskeleton, |
|----------------------|--|
| | symbiosis, Golden Gate cloning, cytoskeletal markers |
| Number of pages | 108 |
| Number of appendices | 2 |
| Language | Czech |

OBSAH

| 1 2 | ÚVOD TEORETICKÝ ÚVOD | 10 11 |
|--|---|--|
| 2.1 2.2 2.3 | Vojtěška setá <i>Sinorhizobium meliloti</i> Proces symbiózy | 11 12 13 |
| 2.3.1 2.3.2 2.3.3 | Prvotní interakce symbiontů Vznik infekčního vlákna Vniknutí rhizobií do primordia nodulu a jejich diferenciace na bakter | 13 14 oidy |
| 2.3.4 | Morfologie hlízky | 15 16 |
| 2.4 | Dynamika cytoskeletu během symbiózy | 17 |
| 2.4.1 2.4.2 2.4.3 2.4.4 | Cytoskelet během prvotních interakcí symbiontů Cytoskelet během růstu infekčního vlákna Cytoskelet během uvolnění infekčních kapek a tvorby symbiosomů Cytoskelet v maturovaném nodulu | 18 19 21 22 |
| 2.5 | MAPK signaling | 23 |
| 2.5.1 2.5.1.1 2.5.1.2 2.5.1.3 2.5.2 2.5.3 2.5.4 | MAPKs signaling u <i>M. sativa</i> MAP3K u <i>M. sativa</i> MAP2K u <i>M. sativa</i> MAPK u <i>M. sativa</i> Hormony během symbiózy u <i>M. sativa</i> a <i>M. truncatula</i> MAPK signaling během symbiózy u <i>M. sativa</i> a <i>M. truncatula</i> MAPK signaling a cytoskelet | 25 26 27 29 30 31 34 |
| 2.6 | Princip a využití Golden Gate klonování | 35 |
| 3 | MATERIÁL A METODY | 41 |
| 3.1 | Materiál | 41 |
| 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.1.6 3.1.7 3.1.8 | Chemikálie Použité restrikční endonukleasy Použité primery Přístrojové vybavení Software Roztoky a média Kity Biologický materiál. | 41 42 42 43 44 44 49 49 |
| 3.2 | Metody | 52 |
| 3.2.1 3.2.2 3.2.3 3.2.4 3.2.4.1 3.2.4.2 | Příprava kultivačních médií Sterilizace listů <i>M. sativa</i> Somatická embryogeneze <i>M. sativa</i> Fenotypová analýza transgenních linií <i>M. sativa</i> Měření přírůstku primárního kořene somatických embryí <i>M. sativa</i> Inokulace rostlin s <i>S. meliloti</i> a hodnocení počtu nodulů | 52 52 53 53 53 |
| 3.2.5 | Klonování Golden Gate | 54 |
| 3.2.5.1 | Plán klonování markerů α TUBULINU-6 | 54 |

| 3.2.5.2 | Plán klonování rezistence na herbicid fosfinotricin | 55 |
|--------------|--|---------------------|
| 3.2.5.3 | Příprava elektrokompetentních buněk <i>E. coli</i> DH5α | 56 |
| 3.2.5.4 | Příprava chemokompetentních buněk E. coli DH5α | 56 |
| 3.2.5.5 | Izolace plasmidové DNA z bakteriálních konzerv | 57 |
| 3.2.5.6 | Domestikace sekvencí AtTUA6 a tagRFP-T | 57 |
| 3.2.5.7 | PCR amplifikace promotoru EF1α a genu kódujícího marker EGFP | 58 |
| 3.2.5.8 | Gelová elektroforéza a izolace DNA z agarosového gelu | 58 |
| 3.2.5.9 | Příprava modulů úrovně 0 | 59 |
| 3.2.5.10 | Transformace elektrokompetentních buněk | 60 |
| 3.2.5.11 | Transformace chemokompetentních buněk | 60 |
| 3.2.5.12 | Kultivace bakterií a selekce kolonií nesoucí požadovaný konstrukt | 60 |
| 3.2.5.13 | Ověřování připravených konstruktů restrikčním štěpením | 61 |
| 3.2.5.14 | Golden Gate klonování modulů úrovně 1 | 62 |
| 3.2.6 | Konfokální laserová skenovací mikroskopie s Airyscanem | 62 |
| 4 | VÝSLEDKY | 63 |
| 4.1 | Příprava cytoskeletálních markerů Golden Gate klonováním | 63 |
| 4.1.1 | Ověřovaní modulů z kitů "MoClo Tool" a "MoClo Plant Parts" restrik | cčním |
| | štěpením izolované plasmidové DNA | 63 |
| 4.1.2 | Domestikace sekvencí AtTUA6 a tagRFP-T | 64 |
| 4.1.3 | PCR amplifikace promotoru <i>pEF1α</i> a genu <i>EGFP</i> | 67 |
| 4.1.4 | Ověření modulů úrovně 0 restrikčním štěpením | 68 |
| 4.1.5 | Ověření modulů úrovně 1 restrikčním štěpením | 70 |
| 4.2 | Somatická embryogeneze M. sativa | 74 |
| 4.3 | Fenotypová analýza transgenních linií M. sativa exprimující ma | rkery |
| 4.0.1 | | /6 |
| 4.3.1 | Mereni prirustku hlavniho korene | /6 |
| 4.3.2 | V yhodnoceni poctu lateralnich korenu | /9 |
| 4.3.3 | v ynodnoceni poctu vytvorených nodulu | 80 |
| 4.4 | s Sinorhizobium meliloti | <i>sativa</i> 81 |
| 5 | DISKUZE | 85 |
| 6 | ZÁVĚR | 89 |
| 7 | SEZNAM LITERATURY | 90 |
| 8 | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK | 101 |
| 9 | PŘÍLOHY | 103 |
| Příloha č 1. | – Mapy klonovaných modulů úrovně 0 | 103 |
| Příloha č 2 | – Mapy klonovaných modulů úrovně 1 | 105 |
| | | |

CÍLE PRÁCE

- Vypracování literární rešerše na téma interakce cytoskeletu a MAPK signalingu u vojtěšky v interakci s prospěšnými mikroorganismy z rodu *Rhizobium*.
- 2. In silico design jednotlivých konstruktů pro cytoskeletální markery.
- 3. Klonování konstruktů pro cytoskeletální markery metodou Golden Gate.
- 4. Fenotypová analýza transgenních linií vojtěšky (*Medicago sativa*) exprimujících markery cytoskeletu.
- 5. *In vivo* pozorování cytoskeletu u vojtěšky v ranných fázích interakce vojtěšky s *Rhizobiem*.

1 ÚVOD

Medicago sativa je víceletá bylina, která se řadí mezi velmi důležité zemědělské plodiny. Především díky její nutriční hodnotě je využívaná jako krmivo pro hospodářská zvířata. Je zdrojem mnoha vitamínů, minerálních látek a esenciálních aminokyselin. Má také bohatý kořenový systém a žije v symbióze s dusík fixujícími bakteriemi (např. *Sinorhizobium meliloti*). Rostliny žijící v této symbióze mají dostatek dusíku, který je důležitý pro správný průběh fotosyntézy a syntézu některých aminokyselin. Díky tomu je *M. sativa* také využívaná jako předplodina, protože obohacuje půdu o dusík i pro následující zemědělské plodiny (Radović *et al.*, 2009).

Během symbiózy dochází k vytvoření kořenových hlízek (nodulů), ve kterých se nachází dusík fixující bakterie. V nodulech je zajištěno vhodné prostředí pro enzym nitrogenasu, který je nezbytný pro samotnou fixaci. V symbiotickém procesu hraje důležitou úlohu také rostlinný cytoskelet, kdy dochází ke změnám v jeho uspořádání a dynamice během jednotlivých fází symbiózy. Rostlinný cytoskelet je tvořen aktinovými filamenty a mikrotubuly a oba tyto biopolymery sehrávají důležitou úlohu v symbiotickém procesu. Podílí se například na zatočení kořenového vlásku okolo bakterie (Perrine-Walker *et al.*, 2014).

Pro vizualizaci cytoskeletu *in vivo* se vyžívají cytoskeletální markery, které by neměly ovlivňovat jeho přirozenou dynamiku. Markery jsou fúzní proteiny, kdy je cytoskeletální protein nebo protein vážící se na cytoskelet fúzován s fluorescenčním proteinem. Vizualizace markeru je umožněna pomocí fluorescenční nebo konfokální mikroskopie. Cílem této práce bylo navrhnout a naklonovat tubulinové markery, které by bylo možné využít mimo jiné i pro *in vivo* studium symbiotických interakcí mezi *M. sativa* a *S. meliloti*. Pro přípravu markerů byla využita účinná metoda molekulárního klonování Golden Gate, která využívá restrikční enzymy typu IIS a T4 DNA ligasu.

Dále byla cílem mé diplomové práce fenotypová analýza transgenních linií *M. sativa* exprimující markery cytoskeletu. Byly srovnávány transgenní linie 35S::tagRFP:TUA6 a 35S::FABD2:GFP s kontrolní linií RSY. Analýza byla zaměřena na kořenový systém, protože právě ten je cílem symbiotických bakterií. U rostlin byla analyzována délka primárního kořene, počet laterálních kořenů a také počet vytvořených nodulů.

2 TEORETICKÝ ÚVOD

2.1 Vojtěška setá

Vojtěška setá (*Medicago sativa* L.), také zvaná alfalfa nebo lucerna, je díky své bohaté nutriční hodnotě jedna z nejvýznamnějších bobovitých rostlin na světě. Jedná se o dvouděložnou bylinu, která se rozmnožuje převážně cizosprášením. Vyskytuje a pěstuje se ve více než 80 zemích světa na téměř 35 milionech hektarů půdy (Radovic *et al.*, 2009). Její geografický původ je z oblasti Středomoří, odkud se rozšířila do dalších oblastí. Bylo vyšlechtěno mnoho kultivarů *M. sativa*, například kultivary rezistentní vůči škůdcům nebo odolné na abiotické stresy, jako je sucho, zvýšená salinita půdy nebo chlad (Lehman *et al.*, 1992).

Genom *M. sativa* je autotetraploidní, má 32 chromozomů (4n=32). Byla také vyšlechtěna diploidní forma *M. sativa* s 16 chromozomy nazývající se CADL (Cultivated Alfalfa at the Diploid Level) (Bingham *et* McCoy, 1979). CADL je díky své diploidní formě vhodný pro genetické studie a biotechnologie.

Jak již bylo zmíněno, *M. sativa* má dobré nutriční složení, z tohoto důvodu se využívá především jako pícnina. Také se vyznačuje vysokou produkcí biomasy, kdy může být sečena několikrát do roka. Je bohatá na obsah proteinů (15-22 %) a přítomnost minerálů a vitaminů. Nejzastoupenějšími jsou vitamíny A, D, E, K, C a některé vitamíny skupiny B (Aganga *et* Tshwenyane, 2003). Z minerálů je to pak fosfor, vápník, sodík, chlór, draslík a mnoho dalších (Scholtz, 2008).

Mimo krmivo pro hospodářská zvířata se využívá například na výrobu bioethanolu, při bioremediaci půd s vysokým obsahem dusíku nebo pro produkci industriálních enzymů jako lignin peroxidasa, alfa-amylasa nebo fytasa (Bauchan, 2006). *M. sativa* má také využití v lidské výživě. Vyrábí se z ní proteinové koncentráty (D'Alviseet *et al.*, 2000), které slouží jako zdroj kvalitních proteinů zejména pro lidi v chudších regionech, kde hrozí podvýživa. Zelené části rostliny mohou být zpracovány do různých pokrmů (Penaset *et al.*, 2009). V Číně byly používány listy vojtěšky pro léčbu chorob trávicího ústrojí nebo artritidy (Mielmann, 2013).

Velice důležitou vlastností *M. sativa* je symbióza s některými bakteriemi z rodu *Sinorhizobium*. Tyto bakterie jsou v nodulech schopné exprimovat enzym nitrogenasu, který je zodpovědný za samotnou fixaci vzdušného dusíku. Proces symbiózy bude podrobně popsán v pozdější kapitole.

2.2 Sinorhizobium meliloti

Bakterie *S. meliloti* je gramnegativní půdní bakterie tyčinkovitého tvaru, která patří do čeledi *Rhizobiaceae*. Je známá pro svou schopnost fixovat vzdušný dusík v symbióze s rostlinami z čeledi bobovitých, zejména s rody *Medicago, Melilotus* a *Trigonella* (Zhao *et al.*, 2012).

Bakterie se dostávají do kořenových buněk pomocí kořenových vlásků a v kortexu rostlinných buněk se diferenciují na formu schopnou fixovat vzdušný dusík (Mergaert *et al.*, 2006).

Genom *S. meliloti* je tvořen jedním cirkulárním chromozomem o velikosti přibližně 3,65 Mb a obsahuje také dva velké symbiotické plasmidy – pSymA a pSymB, které mají velikost 1,3 a 1,6 Mb (Galibert *et al.*, 2001; Reeve *et al.*, 2010). Některé kmeny mohou také obsahovat variabilní počet auxilárních plasmidů, jejichž funkce nebyla plně objasněna (Kuhn *et al.*, 2008). Pro správný průběh symbiózy a tvorbu nodulů jsou potřeba geny jak z cirkulárního chromozomu, tak z obou velkých symbiotických plasmidů. Jedná se například o geny *nod* kódující Nod faktor nebo geny *exo* kódující exopolysacharidy, které jsou rovněž důležité pro primární interakci mezi symbionty (Reeve *et al.*, 2010).

Na cirkulárním chromozomu se nachází hlavně geny, které jsou exprimovány téměř neustále, tzv. housekeeping geny. Jedná se o geny řídící metabolismus, odpovědi na stres, chemotaxi, mobilitu nebo geny nutné pro replikaci, transkripci a translaci (Finan *et al.*, 2001).

Mimo fixace dusíku jsou tyto bakterie schopné také denitrifikace, tedy redukce dusitanů a dusičnanů na oxidy dusíku a N₂. *S. meliloti* obsahuje na jednom chromozomu čtyři geny, kódující enzymy zodpovědné za denitrifikaci. Jedná se o nitrát reduktázu (Nap), nitrit reduktázu (Nir), reduktázu oxidu dusnatého (Nor) a reduktázu oxidu dusného (Nos) (Ruiz *et al.*, 2019). *S. meliloti* může produkovat oxid dusnatý jak volně v půdě, tak v symbiotickém vztahu. Během symbiózy plní oxid dusnatý signální úlohu např. signalizující senescenci nodulu (Cam *et al.*, 2012).

Bakterie *S. meliloti* mohou mít využití i v čističkách odpadních vod. Díky svým denitrifikačním enzymům mohou být využity pro čištění a filtraci pitné vody, kdy je v současné době problém se znečištěním pitné vody hnojivy na bázi dusíku (Chauhan, 2015).

2.3 Proces symbiózy

Vzájemně prospěšný vztah mezi kořeny *M. sativa* a bakteriemi *S. meliloti* je nastaven na principu, že bakterie jsou v nodulech schopny fixovat vzdušný dusík a přeměňovat ho na formy, které jsou pro rostliny využitelné. Na druhou stranu, *M. sativa* poskytuje bakteriím zdroje uhlíku, které mohou využít pro svůj metabolismus. Nejčastěji se jedná o malát, sukcinát nebo fumarát (Portais et al., 1999). Tato symbióza je velice prospěšná a důležitá pro koloběh dusíku v přírodě.

2.3.1 Prvotní interakce symbiontů

Symbióza je iniciována chemickými signály, které probíhají mezi *M. sativa* a volně žijícími *S. meliloti*. V půdách s nízkým obsahem dusíku produkuje kořenový systém rostliny flavonoidy. Jedná se o nízkomolekulární sekundární metabolity, které obsahují benzenová jádra a jsou syntetizována fenylpropanoidovou drahou. Rostliny produkují mnoho různých flavonoidů, ale pro bobovité rostliny jsou typické izoflavonoidy, které jsou tvořeny enzymem isoflavon syntázou. Mezi izoflavonoidy patří diadzein nebo genistein (Liu *et* Murray, 2016). V *M. sativa* je významným flavonoidem metoxychalkon (Dakora *et al.*, 1993) nebo medicarpin, který je syntetizovaný i mimo symbiózu, a to během napadení houbovým patogenem (Guenoune *et al.*, 2001).

Nevyhnutným předpokladem na vnímaní flavonoidů bakteriemi musí být jejích vyloučení rostlinou do rhizosféry. Následně jsou rhizobia přitahována chemotaxí k rostlině a dochází k aktivaci bakteriálního genu *nodD* (Liu *et* Murray, 2016). Produktem genu *nodD* je transkripční aktivátor, který se váže na regulační sekvence dalších *nod* genů, na tzv. nod boxy, a aktivuje tak ostatní *nod* geny (Jiménez-Guerrero *et al.*, 2018). Tyto geny jsou zahrnuty v syntéze a také sekreci Nod faktorů (Spaink *et al.*, 1989).

Nod faktory jsou lipo-chitooligosacharidy, které interagují s rostlinou a mají vliv na další průběh symbiózy, jako je zatočení kořenového vlásku okolo rhizobia nebo také iniciují meristematickou aktivitu v kortikálních buňkách kořene, čímž se formuje primordium nodulu (Xiao *et al.*, 2014). K nodulaci nemůže dojít, pokud bakterie ztratí schopnost produkovat Nod faktory nebo rostlina ztratí schopnost tyto faktory vnímat (Radutoiu *et al.*, 2003). Pro správný proces symbiózy jsou však stejně důležité i flavonoidy. Při potlačení produkce flavonoidů je negativně ovlivněn celý průběh symbiózy (Wasson *et al.*, 2006; Abdel-Lateif *et al.*, 2013). Hostitelská specifita rhizobií je dána chemickou strukturou Nod faktorů, především jejich délkou, substitučními skupinami a stupněm nasycení (Oldroyd *et* Downie, 2008).

Pro percepci Nod fakorů rostlinou jsou podstatné LysM receptory (Smit et al. 2007). Zachycení Nod faktorů receptory spustí Ca2+-dependentní signální dráhu, která dále ovlivňuje spoustu dějů v buňce. Jedná se například o reorganizaci AF (aktinových filament), změny v proudění cytoplasmy, reorientaci endoplasmatického retikula, pohyb jádra nebo změny v buněčné stěně (Lhuissier et al., 2001). Pro spuštění signalizačních dějů stačí velmi malé množství Nod faktoru, některé publikace uvádějí, že je jedná o koncentraci 10⁻¹² M (Lerouge et al., 1990; Heidstra et al., 1994). U M. sativa dojde k rapidnímu nárustu koncentrace Ca²⁺ iontů již po 3 minutách od percepce Nod faktoru (Felle et al., 1999). Dochází k aktivaci aniontových kanálků a k efluxu Cl⁻. Díky tomu dochází k depolarizaci plasmatické membrány a akumulaci Ca²⁺ iontů ve špičce kořenového vlásku (Downie et Walker, 1999). Signální dráha zahrnující receptorové kinázy způsobí oscilaci Ca^{2+} v nukleoplasmě. Je aktivován komplex sestávající z Ca²⁺/kalmodulin-dependentní protein kinázy a transkripčního aktivátoru CYCLOPS (CCaMK-CYCLOPS komplex; Yano et al., 2008; Zipfel et Oldroyd, 2017), který u rostliny způsobí indukci exprese některých specifických genů, zvaných časné noduliny - ENODs (Oldroyd et Downie, 2008).

2.3.2 Vznik infekčního vlákna

Jednotlivá rhizobia jsou přichycena z boku kořenového vlásku (Obr. 1) a následně dochází k anizotropnímu růstu kořenového vlásku, který zapříčiní jeho zatočení a vytvoření těsné smyčky obklopující bakterii. Formuje se infekční kapsa, která je tvořena



Obr. 1 Interakce kořenového vlásku s *Rhizobium* a následná tvorba infekční kapsy, pre-infekčního a infekčního vlákna. Dpi = dny po inokulaci (upraveno podle Laplaze *et al.*, 2015).

těsně naskládanými buněčnými stěnami zatočeného kořenového vlasku (Breakspear et al., 2014).

Předtím, než se začne formovat infekční vlákno v kořenovém vlásku, dojde k zdvojnásobení velikosti jádra a k jeho přesunu blíže k infekční kapse. Také se tvoří preinfekční vlákno – tzv. cytoplasmatický most, který se tvoří mezi buněčnými stěnami rostlinné buňky (Obr. 1). Toto vlákno předurčuje cestu, kterou bude následně infekční vlákno procházet (Timmers *et al.*, 1999; Fournier *et al.*, 2008).

V místě zachycení bakterie dojde u rostlinných buněk k invaginaci buněčné stěny a cytoplasmatické membrány a v těchto místech začne prorůstat infekční vlákno. V jeho špičce se bakteriální buňky aktivně dělí (Gage, 2002). Infekční vlákno roste polárně, přes celý kořenový vlásek až do primární kůry kořene, kde vznikne primordium nodulu (Oldroyd *et al.*, 2011). Tvorba a prodlužování infekčního vlákna je závislá na bakteriálních exopolysacharidech, v *S. meliloti* je to například sukcinoglykan (EPS 1) (Brewin, 2004). Mutanti, kteří nejsou schopni biosyntézy sukcinoglykanu jsou sice zachyceni kořenovým vláskem, ale nejsou schopni iniciovat tvorbu infekčního vlákna (Cheng *et* Walker, 1998).

Tvorba funkčního infekčního vlákna je také závislá na hostiteli. Hostitelský gen *LIN* je důležitý pro správné pokračování symbiózy – pro tvorbu primordia nodulu a jeho morfogenezi. Mutanti tohoto genu jsou schopni zachytit rhizobia kořenovými vlásky, ale selhává tvorba infekčního vlákna (Kuppusamy *et al.*, 2004). Také správná funkce LysM receptoru na povrchu kořenového vlásku je podstatná pro tvorbu funkčních infekčních vláken (Arrighi *et al.*, 2006).

Během symbiózy dochází také ke změnám v hladinách fytohormonů, především auxinů. Pomocí ARF (auxin-response faktor) jsou během symbiózy aktivovány některé auxin odpovědné geny, například gen ARF16. U mutantů tohoto genu dochází k defektům během infekce. Signalizace pomocí auxinů je nezbytná pro správný průběh symbiózy, především v počátečním stádiu infekce (Spaepen *et* Vanderleyden, 2011; Laplaze *et al.*, 2015).

2.3.3 Vniknutí rhizobií do primordia nodulu a jejich diferenciace na bakteroidy

Bakterie vnikají do buněk vyvíjejícího se primordia ve formě infekčních kapek procesem podobným endocytóze. Infekční kapky se tvoří na konci infekčního vlákna, které může být rozvětvené (Zhang *et al.*, 2019). Tyto infekční kapky nejsou obaleny buněčnou stěnou

hostitele, ale pouze jeho cytoplasmatickou membránou a tvoří symbiosom (Brewin, 2004). Cytoplasmatická membrána, která odděluje bakterie od cytoplasmy hostitelské buňky, se začíná diferencovat a označuje se dále jako peribakteroidní membrána (PBM) (Limpens *et al.*, 2009). Pro vývoj symbiosomu na funkční formu je třeba t-SNARE protein SYP132A (Pan *et al.*, 2016). Také synaptogaminy Syt1, Syt2 a Syt3 u *Medicago truncatula* jsou důležité během tvorby symbiosomu (Gavrin *et al.*, 2017).

V symbiosomech dochází k diferenciaci bakterií na bakteroidy, což je forma, která je schopná fixovat vzdušný dusík a je závislá na přísunu živin od hostitele (Gibson *et al.*, 2008). V příjmu živin hraje důležitou úlohu PBM (Bolaños *et al.*, 2004; Limpens *et al.*, 2009), protože se v ní nachází specializované kanálky, kterými prostupují živiny. Existují také speciální transportéry pro amoniak, který je transportován z nodulu do cytoplasmy rostlinné buňky (White *et al.*, 2007).

Aby docházelo k fixaci dusíku, musí být zajištěno prostředí s nízkým obsahem atmosférického kyslíku. Nitrogenasa, což je hlavní enzym účastnící se fixace dusíku, je na přítomnost vyšší koncentrace kyslíku citlivá. Mikroaerofilní prostředí je zajištěno pomocí hostitelské rostliny, která kontroluje propustnost kyslíku buňkami nodulu pomocí difúzní bariéry (Ott et al., 2005; Gibson et al., 2008). Pro zajištění nízké koncentrace kyslíku je také důležitý leghemoglobin. Jedná se o molekulu, která se podobá hemoglobinu u živočichů. Leghemoglobin je produkován hostitelskou rostlinou a pro správné fungování potřebuje kofaktor - hem. Dřívější studie uváděly, že kofaktor syntetizují pouze bakterie (O'Brian et al., 1987), ale později bylo zjištěno, že hem jsou schopny produkovat také samotné rostliny (Santana et al., 1998). V nodulech leghemoglobin snižuje koncentraci volného kyslíku na hodnotu 5-10 nM (Soupène et al., 1995), kdy tato koncentrace dovoluje správné fungování nitrogenasy. Leghemoglobin je také zodpovědný za růžovou barvu nodulu (Gibson et al., 2008). U Glycine max se leghemoglobin skládá z izoforem (A, C1, C2, C3), které jsou kódované různými geny. Také se na struktuře leghemoglobinu podílí minoritní, méně charakterizované izoformy B a D (Fuchsman et Appleby, 1979).

2.3.4 Morfologie hlízky

Histochemická analýza nodulu *M. truncatula* ukázala 3 hlavní zóny nodulu: meristematickou (I), infekční (II) a dusík-fixující zónu (III) (Zhang *et al.*, 2019).

V některých publikacích se uvádí také zóna přechodná (II-III) a senescenční (IV) (Monahan-Giovanelli *et al.*, 2006; Van de Velde *et al.*, 2006).

Meristematická zóna je tvořena buňkami, které jsou malé a obsahují hodně cytoplasmy. V této zóně se neobjevují žádná infekční vlákna. V infekční zóně jsou buňky větší než v meristematické a je možné v této zóně pozorovat infekční vlákna i endocytická rhizobia, která se aktivně dělí. V přechodné zóně se vyskytují bakterie, které se postupně přeměňují na bakteroidy a rostlinné buňky se připravují na fixaci dusíku produkcí leghemoglobinu (Ogden *et al.*, 2017). Zóna III je největší a probíhá v ní především samotná fixace dusíku. Vyskytují se tam již diferenciované bakteroidy a proteiny nutné pro fixaci (Udvardi *et* Poole, 2013). Po přibližně 5 týdnech se u nodulu objevuje senescenční zóna, která se nachází v blízkosti uchycení nodulu na kořeni (Soupène *et al.*, 1995).

Noduly mohou být rozděleny na determinované a nedeterminované. Hlavní rozdíl mezi těmito dvěma typy je ten, že u determinovaných nodulů se meristém diferenciuje a není dále přítomný. Noduly mají kruhový tvar. Tento typ nodulů tvoří například *Glycine max, Lotus japonicus* a *Vicia faba*. Nedeterminovaný typ nodulů se vyznačuje přetrvávajícím meristémem, stále se tvoří nové buňky nodulu. Rostliny tvořící nedeterminovaný typ nodulu jsou *M. sativa, M. truncatula* nebo *Pisum sativum* (Gualtieri *et* Bisseling, 2000). Noduly jsou vyživovány pomocí cévních svazků, a to xylémem a floémem.

2.4 Dynamika cytoskeletu během symbiózy

Je známo, že cytoskelet rostlin je tvořen mikrotubuly (MT) a aktinovými filamenty (AF). MT i AF jsou velmi dynamické struktury, které mohou měnit svou organizaci v závislosti na procesech probíhajících v buňce. Rostlinný cytoskelet reaguje na různé podněty: na světlo, teplotu, růstové regulátory, osmotický stres nebo biotický stres (Kobayashi *et al.*, 1997). AF jsou velmi důležité pro polární růst buňky – růst kořenových vlásků nebo pylové láčky. AF také kontrolují proudění cytoplasmy (Braun *et al.*, 2004; Cárdenas *et al.*, 2005)

Nevyhnutelným předpokladem na uskutečnění dynamických procesů u rostlin je reorganizace cytoskeletu, která probíhá díky depolymerizaci a opětovné polymerizaci MT a AF. Pro reorganizaci jsou důležité aktin-vážicí proteiny a tubulin-vážící proteiny, které mohou kontrolovat míru polymerizace a depolymerizace (Staiger *et* Blanchoin, 2006).

Jak již bylo výše zmíněno, během symbiózy reaguje rostlina na Nod faktory, které aktivují mnoho buněčných procesů. Na Nod faktory reaguje také rostlinný cytoskelet, kdy ke změnám v jeho organizaci dochází během celého symbiotického procesu, od prvotních interakcí s bakteriemi, tvorby a prorůstání infekčního vlákna až k diferenciaci nodulu (Timmers, 2008).

Pro studium dynamických změn cytoskeletu během symbiotických procesů se využívají transgenní rostliny exprimující fluorescenčně značené cytoskeletální proteiny nebo cytoskelet-vážící proteiny. V případě AF se jedná například o rostliny exprimující konstrukt *ABD2:GFP* (Zhang *et al.*, 2019), využívající aktin-vázající doménu pocházející z proteinu fimbrinu fúzovanou se zeleným fluorescenčním proteinem. V případě vizualizace MT se jedná například o konstrukty *GFP:MBD* (mikrotubuly-vážící doména ze savčího proteinu MAP4) (Marc *et al.*, 1998) nebo *EB1:YFP*, kdy EB1 je protein vážící se na plusový konec MT (Straubeet *et al.*, 2003).

Pro studium symbiózy je také důležité pozorovat jednotlivé bakterie, proto byly vyvinuty kmeny fluorescenčně značených bakterií. Kmen *S. meliloti* 2011 byl označen červeným fluorescenčním proteinem (RFP) a byl využit pro studium symbiotických procesů (Liu *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2019).

2.4.1 Cytoskelet během prvotních interakcí symbiontů

V přítomnosti symbiotických bakterií dochází k různým morfologickým změnám na kořenových vláscích. Typické je zatočení kořenového vlásku okolo samotné bakterie o více než 360° (Timmers, 2008).

V kořenových vláscích jsou AF uspořádána v longitudinálních svazcích, které vedou přes celou buňky až ke špičce (Katelaar *et al.*, 2003). V apikální oblasti (zvané apikální dóm) jsou AF velmi jemná a je možné je pozorovat pouze s mikroskopy s vysokým rozlišením (Baluška *et al.*, 2000; Voigt *et al.*, 2005). AF jsou důležitá pro transport vezikul. Vezikuly mohou obsahovat komponenty buněčné stěny, které se akumulují v apikální zóně vlásku a tyto komponenty jsou následně využity pro tvorbu nové buněčné stěny během polárního růstu (Hepler *et al.*, 2001).

V přítomnosti Nod faktorů kořenové vlásky přestávají růst a objevuje se rozšíření ve špičce vlásku. Hladina ROS (reaktivní formy kyslíku), Ca²⁺ a hodnota pH ve vláscích ovlivňuje aktin-vážící proteiny (ABP). Jedná se například o proteiny gelsolin, profilin, vilin nebo aktin-depolymerizující faktor (ADF) (Fan *et al.*, 2004). Aktivované ABP

kontrolují během symbiózy polymerizaci a depolymerizaci AF a zapříčiňují reorganizaci filament, a tedy zatočení kořenového vlásku okolo bakterie. Mutace některého z ABP zásadně ovlivňuje úspěšný průběh symbiózy (Miyahara *et al.*, 2010).

Také MT hrají důležitou roli v počátcích symbiózy. Timmers *et al.* (1999) na pokusech s *M. truncatula* dokázal, že dynamické změny MT jsou důležité pro zatočení vlásku, tvorbu pre-infekčního vlákna a také pro iniciaci růstu infekčního vlákna.

V kořenových vláscích jsou přítomny kortikální MT, které jsou převážně axiálně orientované. Během růstu vlásku kortikální MT nedosahují samotné špičky, ale při zastavení růstu vlásku se MT ve špičce sbíhají (Timmers *et al.*, 2007). Kortikální MT se podílí spolu s AF na polárním růstu vlásku a jsou pro něj esenciální (Bibikova *et al.*, 1999).

Pro většinu bobovitých rostlin, včetně *M. sativa* a *M. truncatula*, je typická přítomnost endoplasmatických MT (EMT) během symbiózy. Tyto EMT se nachází v sub-apexu kořenového vlásku, tvoří síť mezi jádrem a samotnou špičkou (Obr. 2 A) a jsou odpovědné za pozici jádra přibližně 30 µm od špičky vlásku (Sieberer *et al.*, 2002). EMT polymerizují v různých směrech. Po aplikaci Nod faktoru jsou EMT velmi dynamické, tvoří husté svazky a podílí se na zatočení vlásku okolo bakterie (Obr. 2 B, C) (Esseling *et al.*, 2003; Sieberer *et al.*, 2005). Pokud není žádná bakterie zachycena, EMT nejsou potřeba, rozpadají se a zůstávají přítomny pouze kortikální MT (Obr. 2 D) (Perrine-Walker *et al.*, 2014).

2.4.2 Cytoskelet během růstu infekčního vlákna

Když je bakteriální mikrokolonie zachycena v zatočení kořenového vlásku, EMT se stahují z celé kořenové špičky do místa jejího uchycení a jsou v jejím blízkém kontaktu (Obr. 2 E). Výskyt EMT je zajištěna přítomností Nod faktoru. Při prorůstání infekčního vlákna kořenovým vláskem se EMT reorganizují a spojují rostoucí konec infekčního vlákna s jádrem (Obr. 2 F) (Timmers *et al.*, 1999; Perrine-Walker *et al.*, 2014).

Jádro se při prorůstání infekčního vlákna dostává až k bázi kořenového vlásku a zůstává spojeno s EMT po celou dobu jeho růstu. Dojde-li k narušení infekčního vlákna, EMT se začnou rozpadat (Perrine-Walker *et al.*, 2014).

Infekční vlákno samo o sobě není schopné polárního růstu. Rostlinné komponenty, včetně MT, tedy tvoří jakousi "formu", která určuje pozici a šířku infekčního vlákna. Bez těchto komponent je infekční vlákno schopné pouze izodiametrického růstu

(Timmers, 2008). Také jemná AF těsně obklopují infekční vlákno, což potvrdila i 3D rekonstrukce AF během prorůstání infekčního vlákna kořenovým vláskem. Hustota AF, které infekční vlákno a jeho větve obklopují, je velmi vysoká. Aktinový cytoskelet tedy tvoří kanál, který pomáhá organizovat směr růstu infekčního vlákna a je také přítomný v okolí infekčních kapek (Zhang *et al.*, 2019).



Obr. 2 Schéma naznačující chování EMT během interakce s *Rhizobium* (upraveno podle Perrine-Walker *et al.*, 2014). A rhizobii aktivované EMT tvořící svazky ve špičce kořenového vlásku. EMT jsou spojeny s jádrem (šedý ovál), B vlivem Nod faktorů dochází u EMT k dynamickým změnám a dochází ke změně orientace EMT, C svazky EMT zapříčiňují zatočení kořenového vlásku okolo rhizobií, D v případě nezachycení rhizobií dochází k rozpadu EMT, E EMT jsou seskupeny v blízkosti místa uchycení rhizobií a začíná se vytvářet infekční vlákno, F jádro se přemísťuje k bázi kořenového vlásku, EMT spojuje jádro s prorůstajícím infekčním vláknem. EMT jsou aktivní díky stále přítomným Nod faktorům.

2.4.3 Cytoskelet během uvolnění infekčních kapek a tvorby symbiosomů

Infekční kapky, které jsou vypuštěny do hostitelské cytoplasmy, začínají tvořit brzké symbiosomy. Brzké symbiosomy jsou obklopeny hustou sítí jemných AF, které tvoří tzv. "lešení" (Gavrin *et al.*, 2015), což také potvrdila 3D rekonstrukce jemných AF.

V infikované buňce obsahující maturované symbiosomy se aktinový cytoskelet nachází především ve formě krátkých fragmentů a bodů, což značí, že AF konstantně polymerizují a depolymerizují. Aktinový cytoskelet nejspíše slouží pro transport vesikul a výměnu materiálu mezi symbiotickými partnery (Qiu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019).

Také MT je možné pozorovat při vypouštění infekčních kapek z infekčního vlákna. EMT tvoří hustou síť obklopující jednotlivé infekční kapky. U mutanta v genu *Mt*EFD-1 (ethylene-responsive factor required for nodule differentation 1) docházelo k tvorbě zvětšených infekčních kapek (Vernie *et al.*, 2008), okolo kterých byly pozorovány husté svazky EMT.

Při uvolnění bakterií do cytoplasmy hostitelské buňky jsou indukovány rostlinné geny, které kódují nodul-specifické peptidy bohaté na cystein (NCR) (Van de Velde *et al.*, 2010). NCR ovlivňují uvolněné bakterie a jejích diferenciaci na bakteroidy. U mutanta *M. truncatula dnf1-1* (defective in nitrogen fixation) nejsou NCR v infikovaných buňkách správně lokalizované a v zóně fixace dusíku nejsou přítomny diferenciované bakteroidy (Van de Velde *et al.*, 2010). U tohoto mutanta bylo také pozorováno vymizení MT (Kitaeva *et al.*, 2015). Gavrin *et al.* (2015) zjistil, že u tohoto mutanta nejsou přítomny ani AF v okolí symbiosomů.

Při studiu nodulů u *P. sativum* zůstaly v případě mutanta *sym3*, u kterého se rovněž uvolněné bakterie nediferencují na bakteroidy, MT zachované (Borisov *et al.*, 1997). Toto pozorování značí rozdílné molekulární mechanismy, které probíhají během symbiózy u dvou rozdílných druhů - *M. truncatula* a *P. sativum* (Kitaeva *et al.*, 2015).

Další rozdíl mezi těmito dvěma bobovitými rostlinami je v umístění bakteoridů v dusík fixující zóně nodulu. U *M. truncatula* jsou bakteroidy orientovány kolmo k buněčné stěně rostlinné buňky a jsou protáhlého tvaru. Na druhou stranu bakteroidy u *P. sativum* jsou náhodně rozmístěné v dusík fixující zóně a často mají tvar písmene Y (Mergaert *et al.*, 2006; Kitaeva *et al.*, 2015).

2.4.4 Cytoskelet v maturovaném nodulu

V různých částech vyvinutého nodulu je možné pozorovat různou dynamiku rostlinného cytoskeletu. V meristémové zóně nodulu se nachází buňky menší velikosti a obsahují perinukleární sít AF. V buňkách infekční zóny jsou AF kratší, více fragmentované a v buňkách dusík-fixující zóny se nacházejí pouze krátké fragmenty a body AF (Zhang *et al.*, 2019).

V případě MT se v meristémové oblasti nodulu vyskytují endoplasmatické, kortikální i perinukleární MT. Perinukleární MT obklopují jádro a spojují ho s periferií buňky. Kortikální MT nejsou pravidelně uspořádané (Kitaeva *et al.*, 2015), obdobně jako tomu je v meristémové zóně kořene (Baluška *et al.*, 1992). Jak je známo, MT se účastní dělení buněk a v meristémové zóně se vyskytují v různých mitotických figurách, jako například preprofázní svazek, mitotické vřeténko nebo fragmoplast.

V infekční zóně jsou v kolonizovaných buňkách přítomny EMT, které obklopují infekční vlákno. Kortikální MT jsou zde nepravidelně uspořádány. V případě, že v infekční zóně nedojde k uvolnění bakterií z infekčního vlákna, dojde k reorientaci kortikálních MT ve III. zóně. MT se tak v této zóně reorganizují z neuspořádaných vláken na vlákna transverzálně orientované. Dojde-li k uvolnění bakterií až ve III. zóně, transverzálně orientované MT se opět mění na neuspořádané svazky, které jsou typické pro buňky obsahující bakteroidy (Obr. 3). Z tohoto chování kortikálních MT vyplývá, že uvolnění bakterií v infekční zóně nodulu inhibuje vznik transverzálně uspořádaných vláken vláken ve III. zóně (Kitaeva *et al.*, 2015).

Tato myšlenka byla u *M. truncatula* potvrzena využitím mutanta *ipd3*, který tvoří široká infekční vlákna, ze kterých nejsou, až na výjimky, uvolňovány infekční kapky a bakterie tak zůstávají uvnitř vlákna (Tsyganov *et al.*, 1998; Voroshilova *et al.*, 2001). V kolonizovaných buňkách obsahující pouze infekční vlákna byly ve III. zóně pozorovány transverzálně orientované svazky MT. Při vzácném uvolnění bakterií z mutantního infekčního vlákna došlo ve III. zóně k reorganizaci kortikálních MT na nepravidelně uspořádané svazky, podobně jak tomu je v meristematických buňkách.

Organizace kortikálních MT tedy závisí na uvolnění bakterií z infekčního vlákna (Kitaeva *et al.*, 2015).

V dusík fixující zóně se během symbiózy nachází vedle infikovaných buněk také buňky neinfikované. V těchto buňkách jsou kortikální MT transverzálně uspořádané (Kitaeva *et al.*, 2015).



Obr. 3 Uspořádání kortikálních mikrotubulů v ne/infikovaných buňkách nodulu (upraveno podle Kitaeva *et al.*, 2015). V meristematické zóně tvoří kortikální MT neuspořádané svazky. V zóně II zůstávají v neinfikovaných a v kolonizovaných buňkách kortikální MT neuspořádané. V zóně III jsou v případě neinfikovaných nebo kolonizovaných buněk kortikální MT transverzálně uspořádány. Dojde-li k uvolnění bakterií v zóně III, kortikální MT se mění z transverzálně orientovaných MT na neuspořádané svazky.

2.5 MAPK signaling

Rostliny jsou přisedlé organismy a nemohou opustit své stanoviště, musely si proto vyvinout způsob, jak se bránit nepříznivým podmínkám. Pro rychlou reakci na stresové podmínky si vyvinuly způsob, jak rychle a efektivně reagovat na daný podnět a spustit požadovanou odpověď. Jedná se o mitogenem aktivované protein kinázy neboli MAPKs. MAPKs jsou signální proteiny tvořící kaskádovité komplexy, ve kterých dochází k přenosu signálu. Tyto komplexy jsou často tvořeny třemi kinázami: MAP kinázou kinázou kinázou (MAPKKK, MAP3K), MAP kinázou kinázou (MAPKK, MAP2K) a MAP kinázou (MAPK). Jsou odpovědné za přenos extracelulárního signálu do buňky. MAPK kaskády mohou dále aktivovat transkripční faktory, ovlivňovat dynamiku cytoskeletálních proteinů, mají také vliv na vezikulární transport anebo mohou ovlivňovat jiné kinázy (Rodriguez *et al.*, 2010).

Pojmenování kinázy je obecné označení pro enzymy fosfotrasnferázy. Katalytická doména kináz obsahuje ATP vazebné místo. V eukaryotních buňkách se katalytická doména skládá z 250-300 aminokyselin a je složena z 12 subdomén (Hanks *et* Hunter, 1995).

V MAPK kaskádě dochází k reverzibilnímu přenosu fosfátové skupiny z nadřazené MAPK na následující kinázu. Aktivovat MAP3K lze například jinými protein kinázami (Kim *et al.*, 2012), transmembránovými receptory (Lee *et al.*, 2012), receptor-podobnými kinázami (Hord *et al.*, 2008) nebo také GTPasami (Su *et al.*, 2015). Aktivovaná MAP3K dále fosforyluje následující MAP2K na serinovém nebo threoninovém zbytku. Motiv, který MAP3K rozeznávají je S/T-X5-S/T, kdy X může být jakákoli aminokyselina. MAP2K následně dvojitě fosforyluje MAPK na tyrosinu a threoninu. Rozpoznávací motiv je T-X-Y (Rodriguez *et al.*, 2010; Hettenhausen *et al.*, 2014). Aktivovaná kináza může být deaktivována defosforylací, a to díky enzymům fosfatázám.

Interakce mezi jednotlivými komponenty kaskády je často zajištěna přítomností tzv. scaffold proteinu. Zajišťuje fyzickou blízkost jednotlivých kináz a také zabraňuje vzniku kompetentních reakcií.

MAPKs jsou u rostlin aktivovány během tvorby gamet, při embryogenním i postembryogenním vývoji. Jsou aktivní během tvorby kořenů, kořenových vlásků, listů a v případě bobovitých rostlin také během tvorby nodulů (Šamaj *et al.*, 2002; Komis *et al.*, 2018). K jejich aktivaci dochází i během různých stresů. Jedná se například o stres z vysokých nebo nízkých teplot, ROS, UV, sucho, osmotický stres, těžké kovy nebo také patogeny (Opdenakker *et al.*, 2012; Rasmussen *et al.*, 2012; Smékalová *et al.*, 2014; de Zelicourt *et al.*, 2016). MAPKs zprostředkovávají také odpověď na hormonální stimuly, mohou regulovat buněčný cyklus a vývoj (Komis *et al.*, 2011; Šamajová *et al.*, 2013).

U modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* bylo objeveno 110 genů kódující proteiny z MAPK rodiny. Z toho 80 genů kóduje MAP3K, 10 genů kóduje MAP2K a 20 genů kóduje MAPK (de Zelicourt *et al.*, 2016; Raja *et al.*, 2017). MAP3K tvoří největší skupinu a v *A. thaliana* jsou rozděleny do tří podskupin podle podobnosti sekvencí. Jedná

se o podskupiny: MEKK-like kinázy, RAF-like kinázy a ZIK-like kinázy (Danquah *et al.*, 2014).

M. truncatula je modelová rostlina pro studium symbiózy bobovitých rostlin s bakteriemi rodu *Rhizobium*. Je malého vzrůstu, má diploidní genom, krátký životní cyklus, je samosprašná a také poměrně snadno transformovatelná (Young *et al.*, 2011). Její genom je plně osekvenován a díky tomu mohly být pečlivě prostudovány i MAPKs. Neupane *et al.* (2013) zjistil, že v genomu *M. truncatula* je 18 genů pro MAPK a 4 geny kódující MAP2K. Při dalším studiu bylo zjištěno, že se v genomu nachází 73 genů kódují MAP3K, z nichž se 28 řadí do skupiny MEKK, 20 do skupiny RAF a 25 do skupiny ZIK. Velká část těchto kináz je ortologní ke kinázám v *A. thaliana* (Li *et al.*, 2016).

Geny pro MtMAP3K jsou exprimovány v různorodých rostlinných pletivech během různého vývojového stádia, což potvrdila expresní analýza mRNA. Během nodulace je aktivováno 14 MtMAP3K (Li *et al.*, 2016).

2.5.1 MAPKs signaling u M. sativa

U *M. sativa* byly rovněž studovány MAPK kaskády, které v buňce přenáší signál a aktivují různé buněčné odpovědi (Šamajová *et al.*, 2013; Komis *et al.*, 2018). Osekvenovaný genom *M. sativa* je dostupný v databázi (<u>www.alfalfatoolbox.org</u>; Shen *et al.*, 2020), ale pro studium transkriptomu *M. sativa* je stále využívaná blízce příbuzná *M. truncatula* (Tang *et al.*, 2014) nebo vyšlechtěná diploidní forma *M. sativa* – CADL (Fajardo *et al.*, 2016).

OMTK1 je trojitá kináza u *M. sativa*. Také byly studovány MAP2K – SIMKK a PRKK (Nakagami *et a*l., 2004). Známé MAPK u *M. sativa* jsou SIMK, SAMK4, MMK3 a MMK2 (Ichimura *et al.*, 2002).

Uvedené MAPK byly studovány v případě abiotického a biotického stresu a některé také během symbiotických procesů s hlízkovitými bakteriemi. Pro přehlednost jsou jednotlivé kinázy a jejich odpovědi na stres shrnuty v Tab. 1.

| Typ a název kinázy | Stres | |
|--------------------|---|--|
| МАРЗК | | |
| OMTK1 | Oxidativní stres | |
| MAP2K | | |
| SIMKK | Stres z těžkých kovů, solný stres, biotický stres | |
| PRKK | Biotický stres | |
| МАРК | | |
| MMK2 | Stres z těžkých kovů, biotický stres | |
| MMK3 | Oxidativní stres, biotický stres, stres z těžkých kovů | |
| SAMK | Stres z těžkých kovů, stres z nízkých teplot, poranění, sucho | |
| SIMK | Biotický stres | |
| HAMK | Stres z vysokých teplot | |

Tab. 1 Souhrnná tabulka ukazující MAP3K, MAP2K a MAPK u *M. sativa* a jejich odpovědi na stres. Upraveno podle Šamajová *et al.* (2013).

2.5.1.1 MAP3K u M. sativa

Známou trojitou MAP kinázou je v případě *M. sativa* OMTK1 (oxidative stress-activated mitogen-activated protein triple-kinase 1) (Nakagami *et al.*, 2004). Při studiu protoplastů *M. sativa* bylo zjištěno, že OMTK1 vykazuje kinázovou aktivitu a způsobuje buněčnou smrt (Obr. 4). Po aplikaci různých stresových faktorů nebo hormonů se ukázalo, že pouze oxidativní stres aktivuje tuto trojitou kinázu. Konkrétně byla aktivována peroxidem vodíku (H₂O₂). OMTK1 dále fosforyluje MAP kinázu MMK3. Zatím není známo, zda OMTK1 aktivuje MMK3 přímo nebo je v kaskádě přítomna nějaká MAP2K (Nakagami *et al.*, 2004).

OMTK1 má také funkci "scaffoldového" proteinu, kdy drží pohromadě signální molekuly důležité pro přenos H₂O₂ signálu vedoucí až k buněčné smrti buňky (Nakagami *et al.*, 2004).



Obr. 4 Schéma znázorňující aktivaci MMK3 vlivem OMTK1. Upraveno podle Nakagami *et al.* (2004). H₂O₂ aktivuje OMTK1, která následně aktivuje MMK3. Není známá MAP2K účastnící se této signální dráhy. Aktivní MMK3 má za následek indukci buněčné smrti u *M. sativa*.

2.5.1.2 MAP2K u M. sativa

Známé MAP2K u *M. sativa* jsou SIMKK (salt-stress-inducible MAP kinase kinase) a PRKK (pathogen-responsive protein kinase kinase). Tyto dvě MAP2K se od sebe velmi odlišují. V primární sekvenci jsou identické pouze z 30 %. Jsou řazeny do odlišných podrodin, mají odlišné substráty a regulační mechanismy (Cardinale *et al.*, 2002). Na druhou stranu obě tyto MAP2K v sekvenci obsahují vedle katalytické domény také putativní MAPK dokovací místo, které je na N konci a je tvořeno sérií bazických a hydrofobních aminokyselin (Ichimura *et al.*, 2002).

Ortologem PRKK v A. *thaliana* jsou MKK1 a MKK2, ortologem SIMKK v A. *thaliana* jsou MKK4 a MKK5 (Tena *et al.*, 2001; Ichimura *et al.*, 2002). V *M. truncatula* má MtMKK5 nejvyšší sekvenční podobnost se SIMKK, kdy je identická z 95 %.

SIMKK stejně jako PRKK reagují na různé patogenní elicitory, jako je např. oligopeptid pep13 z patogena *Phytophthora sojae* (Cardinale *et al.*, 2000).

SIMKK je také aktivována při solném stresu a fosforyluje SIMK, která dále šíří signál a aktivuje různé transkripční faktory (Cardinale *et al.*, 2002). V neaktivním stavu jsou

tyto kinázy lokalizovány v cytoplasmě a v jádře. Po aktivaci solným stresem je většina zásob SIMK i SIMKK přesunuta z jádra do kompartmentů v cytoplasmě (Ovečka *et al.*, 2014). Interakce mezi SIMK a SIMKK je v případě solného stresu velmi specifická, protože nebyla pozorována žádná interakce SIMKK s ostatními MAPKs.

K aktivaci SIMKK může docházet také v přítomnosti ethylenu. Ethylen je rostlinný hormon, který hraje důležitou roli v mnoha vývojových a fyziologických procesech. Histidin proteinová kináza ETR1 funguje jako ethylenový receptor (Obr. 5). Tato receptorová kináza v nepřítomnosti ethylenu aktivuje CTR1. Bylo zjištěno, že CRT1 má podobnou sekvenci s MAP3K patřící do skupiny RAF. CRT1 funguje jako negativní regulátor SIMKK v nepřítomnosti ethylenu. V přítomnosti ethylenu je CTR1 inaktivován a SIMKK není dále inhibována. SIMKK následně fosforyluje SIMK a MMK3. SIMK a MMK3 dále aktivují signální proteiny EIN2/3 (ethylen-insensitive protein 2/3), které pomáhají spouštět expresi ethylen-odpovědných genů. Ethylen odpovědné geny jsou například glutathion S-transferasa 2, ethylen-odpovědný transkripční faktor 1 nebo endochitinasa B (Lecourieux *et al.*, 2003).



Obr. 5 Schéma ukazující MAPK signální dráhu aktivovanou prekurzorem ethylenu ACC (1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina) v rostlinách. Upraveno podle Lecourieux *et al.* (2003). ETR1 funguje jako ethylenový receptor a v jeho nepřítomnosti aktivuje CTR1, který je negativním regulátorem SIMKK, SIMK a MMK3 u *M. sativa* a MPK6/13 u *A. thaliana.* V přítomnosti ethylenu je CTR1 neaktivní a SIMKK tedy není dále inhibována. SIMKK aktivuje SIMK a MMK3, které dále aktivují skrz signální proteiny EIN2/3 ethylen-odpovědné geny.

2.5.1.3 MAPK u M. sativa

SIMK (salt-induced MAPK) je 46 kDa signální protein. Jak již byl zmíněno, je aktivován nadřazenou SIMKK během solného stresu a také během působení prekurzoru ethylenu ACC (1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina; Jagodzik *et al.*, 2018). Ortologem SIMK v *A. thaliana* je MPK6 (Ichimura *et al.*, 2002).

Dále byly u *M. sativa* studovány MAPK, které jsou důležité pro odpověď na stres z vysoké či nízké teploty. Jedná se o HAMK (heat shock-activated MAPK) a dále SAMK (stress-activated MAPK). HAMK je aktivována, jak název napovídá, během stresu z vysokých teplot. Aktivace kinázy je zapříčiněná tzv. fluidizací membrány. Naopak SAMK je aktivována při nízkých teplotách. Pro aktivaci SAMK je také nutná změna v kompaktnosti membrány, kdy dochází k jejímu zpevnění vlivem nízkých teplot (Sangwan *et al.*, 2002). Tyto změny na membráně dále ovlivňují cytoskelet, tok Ca²⁺ a vápník-dependentní protein kinázy (CDPK). V závislosti na teplotním stresu nakonec

dojde k aktivaci SAMK nebo SIMK, které aktivují transkripční faktory (Sangwan *et al.*, 2002). Ortologem SAMK v *A. thaliana* je MPK3 (Ichimura *et al.*, 2002).

V přítomnosti těžkých kovů, jako je například Cu nebo Cd jsou aktivovány čtyři MAPK. Jedná se o SIMK, SAMK, MMK3 a MMK2. Při stresu z těžkých kovů aktivuje SIMKK pouze SIMK a SAMK. Bylo také zjištěno, že SIMKK aktivuje zmíněné MAPK při aplikaci CuCl₂, ale ne v přítomnosti CdCl₂. Pravděpodovně existuje několik odlišných signálních drah reagujících na stres z těžkých kovů u *M. sativa* (Jonak *et al.*, 2004).

MMK3 (*Medicago* MAPK 3) je 44 kDa protein, který je aktivován během různých typů stresů v *M. sativa* (Cardinale *et al.*, 2000). Jak již bylo zmíněno, tato MAPK je aktivována SIMKK v přítomnosti ethylenu. Také je aktivována v reakci na biotický stres, při působení H₂O₂ nebo v přítomnosti těžkých kovů (Cardinale *et al.*, 2002; Lecourieux *et al.*, 2003; Nakagami *et al.*, 2004). Ortologem MMK3 v *A. thaliana* je MPK13 (Ichimura *et al.*, 2002).

Protein MMK3 je detekován během celého buněčného cyklu, ale kinázová aktivita je detekována pouze v pozdější části cyklu, a to během tvorby fragmoplastu, buněčné destičky a v průběhu cytokineze. Buněčná destička je přepážka mezi dceřinnými buňkami, která se tvoří od středu směrem k cytoplasmatické membráně (Staehelin *et* Hepler, 1996). Bylo dokázáno, že MMK3 je důležitá pro regulaci cytokineze (Bögre *et al.*, 1999). Pro aktivitu MMK3 je také nutný intaktní cytoskelet. Při aplikaci látky depolymerizující MT nebyla aktivita MMK3 v telofázi pozorována (Bögre *et al.*, 1999).

Kináza MMK2 (*Medicago* MAPK2, 44 kDa), jejíž ortolog v *A. thaliana* je MPK4, je také aktivována během různých stresů. Jedná se o stres z těžkých kovů nebo biotický stres (Cardinale *et al.*, 2000; Cardinale *et al.*, 2002; Jonak *et al.*, 2004).

2.5.2 Hormony během symbiózy u M. sativa a M. truncatula

Množství vytvořených nodulů je kontrolováno kombinací pozitivní a negativní regulace. Pozitivní regulaci ovlivňují některé hormony – cytokinin a auxin, které jsou důležité pro organogenezi nodulů (Frugier *et al.*, 2008; Suzaki *et al.*, 2012). Cytokininové receptory CRE1 (cytokinin response 1) z *M. truncatula* a LHK1 (lotus histidine kinase 1) z *L. japonicus* jsou důležité pro tvorbu nodulu, protože rostliny s mutantními receptory tvoří pouze velmi omezené množství nodulů (Gonzalez-Rizzo *et al.*, 2006; Murray *et al.*, 2007; Tirichine *et al.*, 2007). Jiné hormony, které jsou často spojeny s obrannými mechanismy rostliny během stresu, negativně ovlivňují signaling Nod faktoru a další průběh infekce symbiotickými bakteriemi. Jedná se o kyselinu salicylovou, ABA, ethylen nebo jasmonát (Ryu *et al.*, 2012). Bylo zjištěno, že ethylen negativně ovlivňuje tvorbu nodulů u *M. truncatula*. Mutantní rostliny necitlivé na ethylen měly po inokulaci rhizobii zvýšený počet nodulů oproti nemutantním rostlinám (Penmetsa *et* Cook, 1997; Oldroyd *et al.*, 2001).

Hormony pomáhají kontrolovat vznik a optimální vývoj nodulů vzhledem k okolním podmínkám, jako je například množství rostlinou využitelného dusíku v půdě (Ryu *et al.*, 2017).

2.5.3 MAPK signaling během symbiózy u M. sativa a M. truncatula

Během symbiotického procesu jsou aktivovány různé MAPK signální dráhy. V *M. sativa* kináza SIMK a jí nadřazená SIMKK regulují růst kořenových vlásků (Šamaj *et al.*, 2002; Berson *et al.*, 2014), které jsou hlavním cílem symbiotických dusík-fixujících bakterií. Pozitivní vliv SIMK na růst kořenových vlásku byl potvrzen při experimentu využívající rostliny *N. benthamiana* nadexprimující tuto kinázu, kdy byly pozorovány delší kořenové vlásky ve srovnání s kontrolními rostlinami (Šamaj *et al.*, 2002).

V epidermálních buňkách kořene je SIMK lokalizována především v jádře. Při růstu kořenových vlásků je SIMK aktivována a přesunuta z jádra do špičky rostoucího kořenového vlásku a nachází se v těsné blízkosti jemných AF. Bylo zjištěno, že při působení inhibitoru aktinu, jako je latrunculin B, dojde k ovlivnění lokalizace a aktivity SIMK, kdy je relokalizována zpět do jádra (Baluška et al., 2000). V případě působení jasplakinolidu, což je cyklický peptid izolovaný z mořské houby *Jaspis johnstoni* působící jako stabilizátor AF, byla pozorována kolokalizace SIMK se svazky AF v cytoplasmě (Bubb *et al.*, 2000). Tyto látky působící na aktinový cytoskelet mají přímý vliv na intracelulární lokalizaci SIMK (Šamaj *et al.*, 2002).

Při subcelulární lokalizaci SIMK v nodulech se ukázalo, že se vyskytuje v blízkosti konce infekčního vlákna a v blízkosti infekčních kapek, které jsou uvolněny v infekční zóně nodulu. V dusík fixující zóně se SIMK vyskytuje v podobě bodových struktur v blízkosti diferencovaných bakteroidů. SIMK se v těchto oblastech vyskytuje v aktivní formě, což potvrdila kolokalizace s využitím anti-SIMK a anti-fosfo-p44/42 specifických protilátek. Z těchto informací lze vyvodit závěr, že pro uvolnění rhizobií z infekčního

vlákna a jejich diferenciaci na bakteroidy je vyžadována aktivace SIMK (Hrbáčková et al., 2020).

V případě *M. sativa* bylo zjištěno, že v SIMKKi liniích se sníženou abundancí fosforylované SIMK (Bekešová *et al.*, 2015) dochází k dřívějšímu zastavení růstu kořenových vlásků, které jsou v konečném důsledku kratší ve srovnání s kontrolními liniemi. Na druhou stranu, v případě, že je SIMK nadexprimována, kořenové vlásky rostou po delší dobu a jsou ve srovnání s kontrolními delší (Hrbáčková *et al.*, 2020).

Bylo zjištěno, že linie nadexprimující SIMK tvoří více infekčních vláken, která se vyskytují v klastrech. Také v případě nodulů byla pozorována tvorba klastrů, ve kterých bylo možné nalézt i více něž 5 plně vyvinutých nodulů v těsné blízkosti. Zvýšené množství infekčních vláken a nodulů tvořících klastry v liniích nadexprimujících SIMK ukazuje, že tato kináza má pozitivní vliv na proces symbiózy a je důležitá pro její správný průběh. SIMKKi linie naopak tvoří méně infekčních vláken, která jsou převážně samostatné a téměř netvoří klastry. Obdobně tomu je i v případě nodulů, kterých je tvořeno méně ve srovnání s linií nadexprimující SIMK (Hrbáčková *et al.*, 2020).

Množství vytvořených nodulů v kořenovém systému je kontrolováno hostitelskou rostlinou a záleží na prostředí, ve kterém se rostlina nachází. Mortier *el al.* (2012) zjistil, že bobovité rostliny tvoří pouze minimální počet nodulů, který je nezbytný pro její správný vývoj v daném prostředí.

Kinázy fosforylují a tím aktivují spoustu proteinů důležitých pro iniciaci a celkový průběh symbiózy. Při fosfoproteomické analýze proteinů získaných z buněk kořenů *M. truncatula* byla objevena fosforylační místa na klíčových proteinech zahrnutých v iniciaci symbiózy. Jedná se o proteiny SKL (sickle), NUP133 (nucleoporin 133) a IPD3 (interacting protein of DMI3). SKL a NUP 133 jsou lokalizovány na jaderné membráně, IPD3 je lokalizováno v nukleoplasmě (Grimsrud *et al.*, 2010).

IPD3 je protein interagující s vápník/kalmodulin-dependentní protein kinázou DMI3, která je důležitá pro transdukci signálu během symbiózy (Lévy *et al.*, 2004). Byla objevena 2 místa fosforylace a 4 potencionální místa fosforylace.

SKL je ortologem EIN2 z *A. thaliana*, účastní se signalizace ethylenem a je negativním regulátorem nodulace (Penmetsa *et al.*, 2008). Protein NUP133 je důležitý pro vývoj nodulu a perinukleární oscilaci vápníku (Kanamori *et al.*, 2006). Fosfoproteomickou analýzou bylo na proteinu SKL nalezeno 6 fosforylačních míst a v případě proteinu NUP133 byla nalezena 2 místa fosforylace (Grimsrud *et al.*, 2010).



Symbiotické interakce

Obr. 6 Schéma ukazující negativní roli MAPK signalingu během raných symbiotických procesů v *M. truncatula*. Upraveno podle Ryu *et al.* (2017). MKK5 je aktivována abiotickým nebo biotickým stresem a přímo aktivuje MPK3/6 fosforylací motivu TEY. MPK3/6 fyzicky interagují s transkripčními faktory NSP1 a ERN1. Dochází k fosforylaci NSP1 a ERN1 a v tomto fosforylovaném stavu jsou neaktivní a negativně regulují proces nodulace. U0126 je MAPK specifický inhibitor.

Naopak signální dráha u *M. truncatula* a *L. japonicus* zahrnující MKK5 a MPK3/MPK6 negativně ovlivňuje symbiotické interakce mezi *M. truncatula* a *S. meliloti* (Obr. 6). Tyto kinázy během působení abiotického i biotického stresu negativně regulují transkripční faktory NSP1 (nodulation signaling pathway 1) a ERN1 (ethylene response factor required for nodulation 1), které jsou důležité pro proces nodulace. Transkripční faktor ERN1 je fosforylován MPK3/6 a ztrácí tak svou aktivitu, která spočívá v regulaci tvorby infekčního vlákna a tvorby primordia nodulu (Chen *et al.*, 2012; Kawaharada *et al.*, 2017; Ryu *et al.*, 2017). Při využití MAPK specifického inhibitoru U0126 (Favata *et al.*, 1998) došlo ke zvýšení počtu nodulů i během působení solného stresu. To naznačuje, že stresem indukované kinázy (MKK5, MPK3/6) jsou zahrnuty v inhibici symbiotických procesů při působení stresu (Ryu *et al.*, 2017).

2.5.4 MAPK signaling a cytoskelet

MAPK signaling má také vliv na organizaci cytoskeletu, a naopak cytoskelet může mít vliv na MAPK signaling.

U *M. sativa* existují, jak již bylo zmíněno, kinázy HAMK a SAMK, které jsou aktivovány při teplotním stresu vlivem změny integrity cytoplasmatické membrány a změnou organizace MT (Sangwan *et al.*, 2002). V závislosti na stavu MT dochází také k aktivaci MMK3 u *M. sativa* a p43^{Ntf6} u *Nicotiana tabacum* (Calderini *et al.*, 1998; Bögre *et al.*, 1999). Obě kinázy jsou aktivovány v pozdní anafázi a v telofázi a jsou lokalizované v oblasti, kde dochází k prolínání plus konců antiparalelních MT (Otegui *et* Staehelin, 2000).

Prostudovanou MAPK signální drahou ovlivňující cytoskelet je NACK-PQR dráha u *N. tabacum*. Tato dráha zahrnuje MAP3K NPK1 (nucleus and phragmoplast localizing kinase 1), dále MAP2K NQK1 a MAPK NRK1 (Nishihama *et al.*, 2001; Soyano *et al.*, 2003; Takahashi *et al.*, 2004). NPK1 je aktivována interakcí s NACK1 a NACK2 kinesin-podobnými proteiny. NACK-PQR komplex působí v oblasti fragmoplastu a reguluje proces cytokinese. Všechny substráty NRK1 nejsou známy, ale bylo zjištěno, že fosforyluje MAP65-1. Tento protein je zahrnut v zesíťování MT a kontroluje tak expanzi fragmoplastu (Nishihama *et al.*, 2002; Sasabe *et* Machida., 2006).

U *A. thaliana* funguje velmi podobný MAPK komplex ovlivňující cytoskeletální proteiny (Obr. 7). Je složen z několika MAP3K, a to z ANP1, ANP2 a ANP3, které patří do rodiny kináz ANP. Tyto MAP3K jsou homologní k NPK1 z *N. tabacum* (Krysan *et al.*, 2002). Dále je součástí MAP2K ANQ1/MKK6, která je homologem NQK1 (Soyano *et al.*, 2003). V komplexu se také nachází kináza MPK13, která je homologem NRK1. Podobnou aminokyselinovou sekvenci jako NRK1 mají také kinázy MPK4, MPK5, MPK11 a MPK12 z *A. thaliana* (Kosetsu *et al.*, 2010). Aktivátorem ANP jsou kinesiny HINKEL/STUD (Tanaka *et al.*, 2004). Substrátem pro fosforylaci proteinem MPK13 jsou členové rodiny proteinů MAP65, stejně jako v případě *N. tabacum* (Beck *et al.*, 2010).

Členové ANP rodiny se mohou navzájem nahradit, což dokázali studie využívající mutanty v jednom z genů pro ANP proteiny (*anp1, anp2* a *anp3*). Dvojití mutanti (*anp1anp2, anp1anp3* nebo *anp2anp3*) už vykazovali fenotyp, kdy byly pozorovány defekty v cytokinezi (Krysan *et al.*, 2002).



Obr. 7 Schéma signální dráhy aktivující protein MAP65 u *A. thaliana*. Upraveno podle Komis *et al.* (2018). Kinesinu-podobné proteiny HINKEDL a STUD aktivují trojitou kinázu ANP. Signál se dále šíří na MAP2K ANQ1/MKK6 a ta následně fosforyluje kinázu MPK4 nebo MPK13. Substrátem MPK4/13 je MAP65, což je MT-vážící protein.

2.6 Princip a využití Golden Gate klonování

Golden Gate klonování (GGC) je metoda molekulárního klonování, která umožňuje zabudování několika inzertů v požadované orientaci do akceptoru, a to v jediné reakci. Tato metoda se také vyznačuje vysokou eficiencí, kdy až 90 % bakteriálních kolonií rostoucích na miskách obsahuje žádaný konstrukt (Engler *et al.*, 2009).

Ke klonování se využívají restrikční enzymy typu IIS BpiI (BbsI), BsaI a Esp3I (BsmBI), které se vyznačují tím, že štěpí DNA mimo rozpoznávací sekvenci. Mohou tak vytvořit ne-palindromické 4bp přesahy, kterých komplementarita se využívá pro vytvoření konstruktů, přičemž jednotlivé části jsou ligovány pomocí T4 DNA ligasy. Klonovací reakce je v podstatě nevratná, protože finální produkt neobsahuje rozpoznávací sekvenci použitého enzymu, a proto nemůže být stejným enzymem opětovně rozštěpen.

Systém klonování je standardizovaný a je tvořen několika úrovněmi. Úroveň 0 představuje základní genetické jednotky ((např. promotory, 5' nebo 3' nepřekládané oblasti, signální peptidy, kódující sekvence genu (CDS), terminátory)). Každý základní genetický modul má přiřazený vlastní pár 4bp přesahů a klonovací vektor (odvozený od vektoru pUC 19). Moduly úrovně 0 mohou být ligovány za vzniku modulu úrovně 1,

který tvoří funkční transkripční jednotku (Obr. 8). Obdobně i moduly úrovně 1 mohou být ligovány za vzniku multigenových konstruktů (úroveň 2, Obr. 9).



Obr. 8 Obecné schéma klonování základních genetických jednotek (úroveň 0) do akceptoru úrovně 1 s využitím enzymu BsaI a T4 ligasy. Ke spojení jednotlivých částí dochází na základě komplementarity 4bp přesahů. Po ligaci vzniká transkripční jednotka. Upraveno podle Marillonnet *et* Werner (2015). Legenda: Pro – promotor; CDS – kódující sekvence; Ter – terminátor; spe^R – rezistence ke spektinomycinu; amp^R – rezistence k ampicilinu; RB/LB – levá/pravá hraniční sekvence, LacZ α – operon kódující β -galaktosidasu.


Obr. 9 Obecné schéma klonování transkripčních jednotek (úrovně 1) do akceptoru úrovně 2 s využitím enzymu BpiI a T4 ligasy. Ke spojení jednotlivých částí dochází na základě komplementarity 4bp přesahů. Po ligaci vzniká multigenový konstrukt. Pro spojení posledního inzertu s akceptorem se využívá koncový linker. Upraveno podle Marillonnet *et* Werner (2015). Legenda: Pro – promotor; CDS – kódující sekvence; Ter – terminátor; L2E – koncový linker 2; kan^R – rezistence ke kanamycinu; RB/LB – levá/pravá hraniční sekvence, CRed – operon kódující kantaxantin.

Klonované sekvence nesmí obsahovat rozpoznávací místa používaných enzymů typu IIS. V opačném případě je nutné tyto sekvence domestikovat. K odstranění jakéhokoli restrikčního místa typu IIS je substituce jednoho nukleotidu dostačující. Domestikace sekvencí se provádí cílenou mutagenezí pomocí PCR s využitím primerů s 5'4bp přesahy, které obsahují požadovanou změnu. Spolu s přesahy jsou na oba konce jednotlivých klonovaných fragmentů umístěny rozpoznávací místa pro enzym BpiI. Pro odstranění míst v rámci kódujících sekvencí je možné připravit mutace bez změny výsledné sekvence proteinu díky degeneraci genetického kódu. Nicméně v případě nekódujících sekvencí (např. promotorů), kde motivy regulační sekvence nemusí být nutně známy, je vhodné později ověřit, zda zavedená mutace neovlivnila genetickou funkci kódovanou danou sekvencí (Engler *et al.*, 2013).

Domestikované sekvence jsou následně ligovány do akceptoru úrovně 0 na základě komplementarity 4bp přesahů. Samotná klonovací reakce probíhá v termocykleru, ve kterém se cyklicky mění teplota mezi 16 °C (optimum pro T4 DNA ligasu) a 37 °C

(optimum pro restrikční endonukleasy). Produkty Golden Gate klonovací reakce jsou dále transformovány do kompetentních bakterií. Sekvence naklonovaných modulů 0 je nutné ověřit pomocí restrikčního štěpení a sekvenování.

Akceptory úrovně 1 se navzájem liší vnějšími tzv. pozičními páry 4bp přesahů, které udávají následnou pozici každé transkripční jednotky ve finálním akceptoru úrovně 2, přičemž možno využít pozice 1 až 6. K dispozici je 7 akceptorů 1 pro zabudování transkripční jednotky do akceptoru 2 v přímé orientaci, a 7 akceptorů pro zabudování v reverzní orientaci. Akceptory 1 pro přímou a reverzní orientaci pro stejnou pozici obsahují stejné 4bp přesahy, které se liší jenom v orientaci. Vnitřní 4bp přesahy nutné pro ligaci modulů úrovně 0 jsou ve všech akceptorech 1 stejné (Engler *et al.*, 2014).

Do akceptoru úrovně 2 je možné najednou naklonovat celkem 6 transkripčních jednotek v předem určeném pořadí. Poslední transkripční jednotka musí být spojena s finálním akceptorem pomocí koncového linkeru. V případě klonování konstruktu obsahujícího více než 6 jednotek, je nutné využít speciální linker, který obsahuje LacZ/CRed operon a jeden pár rozpoznávacích míst pro enzym typu IIS navíc (BsaI nebo Esp3I; Obr. 10). Tento linker tak umožní zabudování dalších transkripčních jednotek za vzniku konstruktu úrovně 2i (Engler *et al.*, 2014; Marillonnet *et* Werne, 2015).

Akceptory jednotlivých úrovní se také liší rezistencí k antibiotiku. Vektory úrovně 0 obsahují rezistenci na spectinomycin, úrovně 1 na ampicilin/karbenicilin a vektory úrovně 2 obvykle na kanamycin. V akceptorech pro úroveň 0 a 1 se také nachází LacZ operon pro modro-bílou selekci bakteriálních kolonií. Během klonování úrovně 0 nebo 1 dochází k vystřižení LacZ operonu, který je nahrazen inzertem, a proto jsou bakteriální kolonie nesoucí požadovaný konstrukt bílé. V případě neúspěšného klonování jsou kolonie zbarveny modře, protože dochází k indukci exprese β-galaktosidasy a ke štěpení barevného substrátu X-Gal. Ve všech prázdných akceptorech pro úroveň 2 se nachází CRed operon kódující geny pro syntézu kantaxantinu. Kantaxantin je ketokarotenoid a způsobuje červené zbarvení kolonií obsahující prázdný vektor (Engler *et al.*, 2009; Marillonnet *et* Werne, 2015; Marillonnet *et* Grützner, 2020).



Obr. 10 Konstrukt úrovně 2 nesoucí linker s LacZ operonem a rozpoznávacími místy enzymu Bsal, díky kterým je možné zabudovat další transkripční jednotky a vytvořit úroveň 2i. Upraveno podle Marillonnet *et* Werner (2015). Legenda: Pro – promotor; CDS – kódující sekvence; Ter – terminátor; kan^R – rezistence ke kanamycinu; RB/LB – levá/pravá hraniční sekvence, LacZ α – operon kódující β -galaktosidasu.

Akceptory pro úroveň 1 a 2 jsou binární - obsahují počátky replikace pro *E. coli* a *A. tumefaciens*, a levou a pravou hraniční sekvenci. Tyto hraniční sekvence původně pochází z Ti plasmidu bakterie *A. tumefaciens*, která má schopnost přenášet část své genetické informace ve formě T-DNA do genomu hostitele, kde může dojít k jejímu přepisu (Gelvin, 2017). Hraniční sekvence tedy slouží k rozpoznání části DNA, která má být za pomoci bakterie *A. tumefaciens* přenesena a inkorporována do genomu rostlin (Mysore *et al.*, 1998).

Standardizované systémy Golden Gate modulů a vektorů byly vyvinuty pro rostliny, houby nebo bakterie *E. coli* (Engler *et al.*, 2014; Agmon *et al.*, 2015; Moore *et al.*, 2016). Dále byla vyvinuta sada modulů a plasmidů využitelných pro široké spektrum gram-negativních bakterií, které jsou fylogeneticky vzdálené od bakterií *E. coli*. Nově vyvinuté moduly obsahují např. *oriT* (počátek přenosu), které jsou důležité pro přenos DNA mezi bakteriemi během konjugace. Díky *oriT* je možné plasmidy namnožit v *E. coli* a poté konjugací přenést do dalších bakterií, např do bakterií rodu *Rhizobium* (Geddes *et al.*, 2019).

Metodou Golden Gate byly připraveny konstrukty úrovně 1 a 2, jejichž exprese byla testována v bakterii *Rhizobium leguminosarum* v prostředí bakteriální kultury a také během symbiotické interakce s kořenovým systémem *Pisum sativum*. Konstrukty s *oriT* byly do *R. leguminosarum* vneseny triparentální konjugací (Figurski *et* Helinski, 1979) a obsahovaly reportérový gen *gusA* (kódující β -glukuronidasu), *celB* (kódující endo-1,4- β - β -glukanasu) nebo gen kódující fluorescentní protein GFP pod kontrolou promotoru genu *nifH* (kódující nitrogenasu), který řídí expresi genů v nodulech během symbiózy (Johnston *et* Beringer, 1975; Geddes *et al.*, 2019). Exprese reportérových genů byla potvrzena, a tím byla ověřena funkčnost nově vyvinutých modulů a vektorů určených pro širší spektrum gram-negativních bakterií (Geddes *et al.*, 2019). Metoda Golden Gate klonování byla využita při přípravě TALE (transcription activator like effectors) a TALEN (TALE nuclease; Zhang *et al.*, 2020). TALE jsou přirozeně produkovány patogenními bakteriemi rodu *Xanthomonas* a fungují jako aktivátory transkripce genů hostitele, čímž reprogramují jeho transkriptom ve svůj prospěch. TALE obsahují repetice, které jsou schopné vázat se na specifický nukleotid DNA. Je možné připravit syntetické TALEN, které se budou vázat na specifickou sekvenci cílové DNA a štěpit ji (Khan *et al.*, 2017). Byla vyvinuta sada Golden Gate vektorů obsahující jednotlivé DNA vazebné repetice a také sada akceptorů, do kterých jsou vybrané repetice klonovány. Vytvořená standardizovaná sada velmi usnadňuje a urychluje přípravu nových TALEN (Cermak *et al.*, 2011).

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Alfa Aesar: Phytagel

Applichem: Heptahydrát síranu hořečnatého (MgSO4·7H2O)

<u>Duchefa Biochemie</u>: 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina (2,4-D), ampicilin, fosfinotricin, Gamborg B5 médium základní směs solí, Gamborg B5 směs vitamínů (1 000x), glutamin, kanamycin, kinetin, Murashige & Skoog (MS) základní směs solí, Nitsch & Nitsch směs vitamínů (1 000x), pentahydrát síranu měďnatého (CuSO₄·5H₂O), spectinomycin, ticarcillin disodný

Fermentas: RNasa A

Honeywell Fluka: chlornan sodný (NaClO)

Nippon Genetics: Midori Green

Penta: 70% a 96% ethanol

Sigma-Aldrich: 2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina monohydrát (MES), agarosa, D-glukosa, dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Na₂HPO₄·2H₂O), dihydrát molybdenanu sodného (Na2MoO4·2H2O), dihydrogenfosforečnan draselný (KH2PO4), disodná sůl EDTA (Na2EDTA), dusičnan draselný (KNO3), ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), glycerol, heptahydrát síranu horečnatého (MgSO₄·7H₂O), heptahydrát síranu železnatého (FeSO4·7H2O), hydrát síranu manganatého (MnSO4·H2O), hydrát síranu zinečnatého (ZnSO4·H2O), hydroxid draselný (KOH), hydroxid sodný (NaOH), chlorid hořečnatý (MgCl₂), chlorid sodný (NaCl), chlorid vápenatý (CaCl₂), kvasničný extrakt, kyselina chlorovodíková (HCl), kyselina boritá (H3BO3), kyselina octová, Lglutation, L-prolin, L-serin, Luria Bertani (LB) broth médium, LB broth médium myo-inositol, sacharosa. hořečnatý s agarem, síran $(MgSO_4),$ Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris báze), trypton, Tween 20, octan draselný (CH₃COOK)

<u>Thermo Scientific</u>: 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -D-Galaktopyranosid (X-Gal), 6x DNA loading dye, dNTP mix (10 mM), GeneRulerTM 1 kb Plus DNA Ladder, hovězí sérový albumin (BSA), isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG), PhusionTM High-Fidelity DNA Polymerasa, Phusion HF pufr (5x), pufr pro T4 DNA ligasu (10x), T4 DNA ligasa

3.1.2 Použité restrikční endonukleasy

<u>Thermo Scientific</u>: Alw44I, BamHI, BpiI (BbsI), BsaI (Eco31I), EcoRI, HindIII, NdeI, PaeI, PvuI.

3.1.3 Použité primery

Všechny použité primery (Tab. 2, Tab. 3) byly navrženy Mgr. Michaelou Tichou. Ph.D pomocí Primer3Plus (https://www.bioinformatics.nl/cgibin/primer3plus/primer3plus.cgi) a programu Geneious Prime. Primery byly připraveny firmou Eurofins Genomics a byly dodány v lyofilizovaném stavu. Lyofilizované primery byly rozpuštěny v daném objemu MilliQ H₂O podle firmou dodaného manuálu, takže koncentrace zásobního roztoku primerů činila 100 pmol· μ l⁻¹ (100 μ M). Dále byly zásobní roztoky ředěny 10x a byly tak získány pracovní roztoky o koncentraci 10 pmol· μ l⁻¹ (10 μ M). Primery byly uchovávány při -20 °C.

| Název | $5' \rightarrow 3'$ sekvence |
|-------------------|--|
| cAtTUA6_GC-Fp1 | AAGAAGACTTAATGagagagtgcatttcgatccaca |
| cAtTUA6_GC-Rp1 | TTGAAGACAAcCtctttaccactgatgagttgttcagg |
| cAtTUA6_GC-Fp2 | AAGAAGACTTgaGgacgctgctaacaatttcgcc |
| cAtTUA6_GC-Rp2 | TTGAAGACAAgGagaccagtacagttatcagcgagc |
| cAtTUA6_GC-Fp3 | AAGAAGACTTctCcaaggattccttgttttcaacgct |
| cAtTUA6_GC-Rp3 | TTGAAGACAAgCctctcaatgttaagggagcgtct |
| cAtTUA6_GC-Fp4 | AAGAAGACTTagGcctacctacaccaacctcaaccg |
| cAtTUA6_GC-Rp4 | TTGAAGACAACGAACCgtattcctctccttcatcatcctca |
| cAtTUA6_GC-Rp4n | TTGAAGACAAAAGCttagtattcctctccttcatcatcct |
| tagRFP-T_GC-Fp1 | AAGAAGACTTTTCGatggtttcaaagggagaagagct |
| tagRFP-T_GC-Rp1 | TTGAAGACAAcCtcgtatgtggtgactctctc |
| tagRFP-T_GC-Fp2 | AAGAAGACTTgaGgacgggggggggggggggggggggggggggggggg |
| tagRFP-T_GC-Rp2 | TTGAAGACAAtTtctttgtcggcctccttga |
| tagRFP-T_GC-Fp3 | AAGAAGACTTgaAacctacgtcgagcagc |
| tagRFP-Ts_GC-Rp3 | TTGAAGACAAAAGCttagttaagtttgtgccccag |
| tagRFP-T_GC-Fp1N | AAGAAGACTTCCATatggtttcaaagggagaagagct |
| tagRFP-Tx_GC-Rp3N | TTGAAGACAACATTgttaagtttgtgccccagtttg |

Tab. 2 Primery využité při domestikaci genu AtTUA6 a tagRFP-T.

Legenda: F – forward primer; R – reverse primer; c – kódující sekvence; n/N – amplifikace fragmentu určeného pro N-terminální fúzi; s – amplifikace sekvence se stop kodonem; x – amplifikace sekvence bez stop kodonu. Červeně jsou znázorněny rozpoznávací místa pro enzym BpiI, modře 4bp přesahy nutné pro fúzi jednotlivých částí genů a zaklonování do akceptorového vektoru úrovně 0, zeleně je znázorněná oblast domestikace, fialově je znázorněn stop kodon. Sekvence komplementární k cílové DNA je psána malými písmeny. Velké písmeno v zelených oblastech představuje zmutovanou bázi.

| 5 5 1 | |
|-------------|---------------------------------------|
| Název | $5' \rightarrow 3'$ sekvence |
| pEF1a_GC-F | AAGAAGACTTGGAGggaagtttctctcttgagggagg |
| pEF1a_GC-R | TTGAAGACAACATTggttagagactggtcaacaa |
| pEF1a_GC-Rn | TTGAAGACAAATGGggttagagactggtcaacaa |
| EGFP_GC-F | AAGAAGACTTTTCGatggtgagcaagggcgag |
| EGFP_GC-R | TTGAAGACAAAAGCttacttgtacagctcgtcca |
| EGFP_GC-Fn | AAGAAGACTTCCATatggtgagcaagggcgag |
| EGFP_GC-Rn | TTGAAGACAACATT cttgtacagctcgtccatgc |

Tab. 3 Primery využité při PCR amplifikaci promotoru EF1α a genu EGFP.

Legenda: F – forward primer; R – reverse primer; p – promotor; n - amplifikace fragmentu určeného pro N-terminální fúzi. Červeně je znázorněno rozpoznávací místo pro enzym BpiI, modře 4bp přesahy nutné pro zaklonování do akceptoru úrovně 0, fialově – stop kodon. Sekvence komplementární k cílové DNA je psána malými písmeny.

3.1.4 Přístrojové vybavení

Analytické váhy XA 110/2X (Radwag)

Autokláv Sterivap HP IL (MMM Group)

Centrifuga ROTANTA 460R (Schoeller Instruments)

Centrifuga Scan Speed 1730 MR (Scala Scientific)

Elektromagnetická míchačka MSH-420 (Boeco)

Elektroporátor ECM399 (BTX)

Fytotronová komora (Weiss Gallenkamp)

Konfokální laserový skenovací mikroskop LSM 880 s Airyscan (Zeiss)

Laboratorní předvážky S1502 (BEL-Engineering)

Mikrocentrifuga Microfuge16 (Beckman Coulter)

NanoDrop Lite (Thermo Scientific)

PCR cycler T100 Thermal Cycler (BioRad)

pH metr stolní PC 2700 (Eutech instruments)

Simplicity Water Purification System (Merk)

Skener Image Scaner III (Epson)

Spektrofotometr Smart SpecTM plus (Bio-Rad)

Sterilní laminární box (Merci)

Termoblok ThermoStat C (Eppendorf)

Třepačka s nastavitelnou teplotou ES-20 (Biosan)

UV transiluminátor Gel DocTM EZ Imager (program Image Lab 4.0.1., Bio-Rad)

Vortex Microspin FV2400 (Biosan)

Zoomovací fluorescenční stereomikroskop Axio Zoom.V16

3.1.5 Software

ApE - A plasmid editor v2.0.37, EPSON scan, Geneious Prime 2020.2.2, Image Lab 4.0.1 a 6.0.1, ImageJ 1.52p, Microsoft Office 365, Zen 3.3 (modrá edice)

3.1.6 Roztoky a média

LB tekuté médium

| 25 g·l ⁻¹ | LB médium |
|----------------------|---|
| | MilliQ H ₂ O |
| | pH = 7,2 (1 mol·l ⁻¹ KOH), sterilizace média autoklávováním. |

LB tekuté médium bez NaCl

| 10 g·l ⁻¹ | pepton |
|----------------------|-----------------------------------|
| 5 g·l ⁻¹ | kvasničný extrakt |
| | MilliQ H ₂ O |
| | Sterilizace média autoklávováním. |

LB tuhé médium

40 g·l⁻¹ LB médium s agarem MilliQ H₂O Sterilizace média autoklávováním.

SOC médium

| 2% (w/v) | trypton |
|--------------------------|-------------------------|
| 0,5% (w/v) | kvasničný extrakt |
| 10 mmol·l ⁻¹ | NaCl |
| 2,5 mmol·l ⁻¹ | KCl |
| | MilliQ H ₂ O |

pH = 7,5 (1 mol·l⁻¹ NaOH), sterilizace média autoklávováním, po vychlazení přidání:

 20 mmol·l⁻¹
 D-glukosa

 10 mmol·l⁻¹
 MgCl₂

 Sterilizace média filtrací přes 0,22 μm membránový filtr.

1 mol·l⁻¹ Tris-HCl

| 12,1 g | Tris báze |
|--------|---|
| 100 ml | MilliQ H ₂ O |
| | pH 7,6 (koncentrovaná HCl) |
| | Sterilizace roztoku filtrací přes 0,22 µm membránový filtr. |

10 mmol·l⁻¹ Tris-HCl

| 1 ml | 1 mol·l ⁻¹ Tris-HCl |
|-------|---|
| 99 ml | MilliQ H2O |
| | Sterilizace roztoku filtrací přes 0,22 µm membránový filtr. |

Roztoky pro přípravu chemokompetentních buněk E. coli

| <u>Roztok 1</u> | |
|-----------------|---|
| 20 ml | 10 mmol·l ⁻¹ Tris-HCl (pH 7,6) |
| 0,19 g | MgCl ₂ |
| Roztok 2 | |
| 20 ml | 10 mmol·l ⁻¹ Tris-HCl (pH 7,6) |
| 0,22 g | CaCl ₂ |
| Roztok 3 | |
| 17 ml | 10 mmol·l ⁻¹ Tris-HCl (pH 7,6) |
| 0,22 g | CaCl ₂ |
| 3 ml | 100% (v/v) glycerol |
| | Sterilizace roztoků filtrací přes 0,22 µm membránový filtr. |

Tris-acetátový pufr (50x koncentrovaný zásobní roztok)

| 121 g | Tris báze |
|-----------|-------------------------|
| 28,55 ml | kyselina octová |
| 50 ml | EDTA |
| 421,45 ml | MilliQ H ₂ O |
| | рН 7,8 |

Tekuté ½ MS médium

| 2,2 g.l ⁻¹ | MS základní směs solí |
|-----------------------|--|
| 10 g.1 ⁻¹ | sacharosa |
| | MilliQ H ₂ O |
| | $pH = 5.8 (1 \text{ mol} \cdot l^{-1} a 0.1 \text{ mol} \cdot l^{-1} \text{ KOH})$, sterilizace média autoklávováním. |

Roztoky pro sterilizaci listů M. sativa

| Roztok | 1 | |
|--------|---|--|
| | | |

70% (v/v) ethanol

Roztok 2

| 0,1% (w/v) | Tween 20 |
|------------|---|
| | MilliQ H ₂ O |
| | Sterilizace roztoku filtrací přes 0,22 µm membránový filtr. |

Roztok 3

| 0,05% (w/v) | Tween 20 |
|-------------|---|
| 1% (v/v) | chlornan sodný |
| | MilliQ H ₂ O |
| | Sterilizace roztoku filtrací přes 0,22 µm membránový filtr. |
| | |

Zásobní roztok kinetinu (0,1 mg·ml⁻¹)

| 4 mg | kinetin |
|----------|---|
| 80 µl | 1 mol·l ⁻¹ NaOH |
| 39,92 ml | MilliQ H ₂ O |
| | Sterilizace roztoku filtrací přes 0,22 µm membránový filtr. |

Zásobní roztok 2,4-D (1 mg·ml⁻¹)

| 40 mg | 2,4-D |
|---------|---|
| 300 µl | 1 mol·l ⁻¹ NaOH |
| 39,7 ml | MilliQ H ₂ O |
| | Sterilizace roztoku filtrací přes 0,22 µm membránový filtr. |

Roztok aminokyselin (250 ml)

| 6,65 g | L-glutamin |
|---------|---|
| 0,83 g | L-serin |
| 0,004 g | adenin |
| 0,083 g | L-glutation |
| | MilliQ H ₂ O |
| | Sterilizace roztoku filtrací přes 0,22 µm membránový filtr. |

B5H médium k indukci tvorby kalusů

| $3,1 \text{ g} \cdot 1^{-1}$ | Gamborg B5 základní směs solí |
|------------------------------|---|
| 0,5 g·l ⁻¹ | KNO ₃ |
| 0,25 g·l ⁻¹ | $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ |
| 0,5 g·l ⁻¹ | prolin |
| 30 g·l ⁻¹ | sacharosa |
| 4,5 g·l ⁻¹ | phytagel |
| | MilliQ H ₂ O |
| | pH = 5,7 (1 mol·l ⁻¹ a 0,1 mol·l ⁻¹ KOH), sterilizace média autoklávováním, |
| | po vychlazení přidání: |
| 1,0 mg·l ⁻¹ | 2,4-D (1,0 ml·l ⁻¹ zásobního roztoku 2,4-D 1,0 mg·ml ⁻¹) |
| 0,1 mg·l ⁻¹ | kinetin (1,0 ml·l ⁻¹ zásobního roztoku kinetinu 0,1 mg·ml ⁻¹) |
| 1,0 ml·l ⁻¹ | 1 000x Gamborg B5 směs vitamínů |
| 30 ml·l ⁻¹ | zásobní roztok aminokyselin |
| | |

B50 embryogenní médium

| 0,5 g·l ⁻¹ | KNO ₃ |
|------------------------|---|
| 0,25g·l ⁻¹ | $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ |
| 0,5 g·l ⁻¹ | prolin |
| 30 g·l ⁻¹ | sacharosa |
| 4,5 g·l ⁻¹ | phytagel |
| | MilliQ H ₂ O |
| | $pH = 5,7 (1 \text{ mol} \cdot l^{-1} \text{ a } 0,1 \text{ mol} \cdot l^{-1} \text{ KOH})$, sterilizace média autoklávováním, |
| | po vychlazení přidání: |
| 1,0 ml·l ⁻¹ | 1 000x Gamborg B5 směs vitamínů |
| 30 ml·l ⁻¹ | zásobní roztok aminokyselin |

MMS pevné kultivační médium

| 4,3 g·l ⁻¹ | MS základní směs solí |
|------------------------------------|--|
| 30 g·l ⁻¹ | sacharosa |
| 0,1 g·l ⁻¹ | myoinositol |
| 4,5 g·l ⁻¹ | phytagel |
| | MilliQ H ₂ O |
| | $pH = 5,7 (1 \text{ mol} \cdot l^{-1} a 0,1 \text{ mol} \cdot l^{-1} \text{ KOH})$, sterilizace média autoklávováním, |
| | po vychlazení přidání: |
| $1 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ | 1 000x Nitsch & Nitsch směs vitamínů |
| | |

MS pevné kultivační médium

- 4,3 g·l⁻¹ MS základní směs solí
- 30 g·1⁻¹ sacharosa
- 4,5 g·l⁻¹ phytagel
 - MilliQ H₂O

 $pH = 5,7 (1 \text{ mol} \cdot l^{-1} a 0,1 \text{ mol} \cdot l^{-1} \text{ KOH})$, sterilizace média autoklávováním.

Tuhé/tekuté Fahräeus médium bez N2

| Makronutrienty: | Zásobní roztok: | Pracovní roztok: |
|---------------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 123,2 g·l ⁻¹ | $1 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ |
| KH ₂ PO ₄ | 95,3 g·1 ⁻¹ | $1 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ |
| $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ | 71,2 g·l ⁻¹ | $2 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$ |

| Fe-EDTA: | | 2,5 ml·l ⁻¹ |
|--------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 5,6 g·l ⁻¹ | |
| Na ₂ EDTA | 7,4 g·l ⁻¹ | |
| | | |
| Mikronutrienty: | Zásobní roztok: | Pracovní roztok: |
| $MnSO_4 \cdot H_2O$ | 1 g·1 ⁻¹ | $100 \ \mu l \cdot l^{-1}$ |
| $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | $1,5 \text{ g} \cdot l^{-1}$ | 100 μl·l ⁻¹ |
| $ZnSO_4 \cdot H_2O$ | 1,7 g·l ⁻¹ | 100 μl·l ⁻¹ |
| H ₃ BO ₃ | 1 g·l^{-1} | 100 μl·l ⁻¹ |
| | | |

V případě přípravy tuhého média je přidáno 11 g·l⁻¹ mikroagaru.

 $1,1 \text{ g} \cdot 1^{-1}$

pH = 6,5 (1 mol·l⁻¹ a 0,1 mol·l⁻¹ HCl), sterilizace autoklávováním, po vychlazení přidání: CaCl₂ 0,11098 g·ml⁻¹ 100 μ l·l⁻¹

 $100 \ \mu l \cdot l^{-1}$

3.1.7 Kity

 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$

<u>Qiagen</u>: QIAprep® Spin Miniprep Kit <u>Thermo Scientific</u>: GeneJET Gel Extraction Kit <u>Addgene</u>: MoClo ToolKit, MoClo Plants Part Kit

3.1.8 Biologický materiál

Rostlinný materiál

- Kontrolní rostliny *M. sativa* RSY (kultivar Regen SY) pocházející ze somatické embryogeneze.
- Transgenní rostliny *M. sativa* RSY stabilně exprimující marker alfa TUBULINU *p35S::tagRFP:AtTUA6* (dále *tagRFP-TUA6*) pocházející ze somatické embryogeneze.
- Transgenní rostliny *M. sativa* RSY exprimující marker F-aktinu *p35S::FABD2:GFP* (dále *FABD2-GFP*) pocházející ze somatické embryogeneze.

Rostliny *M. sativa* byly regenerovány procesem somatické embryogeneze a kultivovány na kultivačních médiích v Petriho miskách ve fytokomoře s nastavenou teplotou 21 °C a vlhkostí 60 % ve dne a 70 % v noci. Fotoperioda byla nastavena na 16 h světlo a 8 h tmu. *Ex vitro* rostliny byly pěstovány za stejných podmínek v květináčích obsahujících substrát a perlit.

Použitý bakteriální materiál a jeho specifikace

- Escherichia coli kmen DH5α tento kmen byl vyvinut pro vylepšení účinnosti transformace. Obsahuje mimo jiné mutace recA1 a endA1. V případě recA1 se jedná se o jednobodovou mutaci, která inaktivuje schopnost homologní rekombinace. Mutace endA1 inaktivuje intracelulární endonukleasy a zamezuje degradaci transformovaných plasmidů. Tento kmen byl využit při přípravě markerů cytoskeletu Golden Gate klonováním.
- Sinorhizobium meliloti kmen Sm2011 jedná se o dusík fixující bakterie schopné symbiózy s rody *Medicago*, *Melilotus* nebo *Trigonella* spp. Tento kmen byl využit při fenotypové analýze během symbiotických interakcí s transgenními liniemi *M. sativa*.

Použité plasmidy

Všechny použité plasmidy spolu s jejich popisem a rezistencí jsou uvedeny v Tab. 4. Akceptorové plasmidy využité pro klonování jsou komerčně dostupné v kitu MoClo ToolKit (Addgene). Dále byly použity plasmidy nesoucí moduly úrovně 0 (35S CMV promotor, 35S CMV terminátor, Nos promotor, Nos terminátor, gen kódující fosfinotricin acetyl transferasu), které jsou součástí kitu MoClo Plants Parts Kit (Addgene). Bakterie *E. coli* DH10B nesoucí plasmidy jsou uchovávány ve formě bakteriálních konzerv při - 80 °C.

Pro amplifikaci některých sekvencí byly využity jako templáty plasmidy dostupné na Oddělení buněčné biologie, CRH: pEN-attR2-EGFPstop-attL3, pEN-attR2-tagRFP-Tstop-attL3, pIG121Hm nesoucí konstrukt *35S::tagRFP:AtTUA6* (Murata *et al.*, 2013) a pEN-attL4-pEF1α-attR1.

| Název | Popis plasmidu | Rezistence (bakterie/rostliny) | Koncentrace antibiotik (µg/ml) |
|--------------------------------------|---|-----------------------------------|--------------------------------------|
| pICH41295 | Úroveň 0 akceptor pro modul Pro+5U | spe | 100 |
| pAGM1251 | Úroveň 0 akceptor pro modul Pro+5U (f) | spe | 100 |
| pAGM1287 | Úroveň 0 akceptor pro modul CDS1ns | spe | 100 |
| pICH41308 | Úroveň 0 akceptor pro modul CDS1 | spe | 100 |
| pAGM1301 | Úroveň 0 akceptor pro modul CT | spe | 100 |
| pAGM1276 | Úroveň 0 akceptor pro modul NT1 | spe | 100 |
| pICH41744 | Koncový linker 2 | spe | 100 |
| pICH87633 | Úroveň 0 obsahující Nos promotor + Ω 5U | spe | 100 |
| pICH42222 | Úroveň 0 obsahující gen pro fosfinotricin acetyl transferasu (bar) | spe | 100 |
| pICH41421 | Úroveň 0 obsahující 3U + Nos terminátor | spe | 100 |
| pICH51266 | Úroveň 0 obsahující 35S CMV promotor + Ω 5U | spe | 100 |
| pICH41414 | 3U + 35S terminátor | spe | 100 |
| pICH47802 | Úroveň 1 akceptor, pozice 1, reverzní orientace | amp | 50 |
| pICH47742 | Úroveň 1 akceptor, pozice 2, přímá orientace | amp | 50 |
| pAGM4723 | Úroveň 2 akceptor | kan | 50 |
| pEN-attR2- EGFPstop- attL3 | Entry klon obsahujíci gen <i>EGFP</i> se stop kodonem | kan | 50 |
| pIG121Hm | Binární vektor nesoucí konstrukt 355::tagRFP:AtTUA6 | kan/hyg | 400/50 |
| pEN-attL4- pEF1α-attR1 | Entry klon obsahujíci promotor <i>pEF1α</i> | kan | 50 |
| pEN-attR2- tagRFP- Tstop-attL3 | Entry klon obsahujíci gen <i>tagRFP-T</i> | kan | 50 |

Tab. 4 Plasmidy použité při klonování.

Legenda: pro – promotor; 5U - 5'nepřekládáná oblast, (f) – fúze s N-koncovým modulem; CDS1 – kódující sekvence se stop kodonem; CDS1ns – kódující sekvence bez stop kodonu; CT - C-terminální značka; NT1 – N-terminální značka; 3U - 3'nepřekládáná oblast; CMV promotor – promotor z viru mozaiky květáku; Nos promotor – promotor genu pro NOPALIN SYNTASU z Agrobacterium tumefaciens; Ω 5U – 5'nepřekládáná oblast z viru mozaiky tabáku; *EGFP* – *ENHANCED GREEN FLUORESCENT PROTEIN*; *RFP* – *RED FLUORESCENT PROTEIN*; tagRFP-T – fluorescenční protein odvozen od tagRFP, "T" označuje mutaci S158T; *TUA6* – *TUBULIN ALPHA* 6, *EF1a* – *ELONGATION FACTOR* 1 a; spe – spektinomycin; amp – ampicilin; kan – kanamycin; hyg – hygromycin B.

3.2 Metody

3.2.1 Příprava kultivačních médií

Chemikálie potřebné pro přípravu příslušného média byly naváženy na laboratorních vahách nebo předvážkách. Na elektromagnetické míchačce byly chemikálie postupně rozpuštěny v přibližně 3/4 konečného objemu MilliQ vody. pH média bylo upraveno na požadovanou hodnotu kyselinami nebo zásadami. Objem média byl poté doplněn na konečnou hodnotu a opět bylo změřeno a případně upraveno pH. Médium bylo rozlito do skleněných lahví a bylo sterilizováno autoklávováním. Chemikálie, které nemohly být přidány do média před autoklávováním kvůli nebezpečí jejich degradace, byly přidány po vychladnutí média na přibližně 60 °C. Sterilní kultivační média byla rozlévána do sterilních Petriho misek.

3.2.2 Sterilizace listů M. sativa

Zdravé listy pocházející z 2.-5. nodu rostliny *M. sativa* stabilně exprimující požadovaný konstrukt nebo listy kontrolních rostlin byly ustřiženy a vloženy do sterilní vody. Listy pocházející z *ex vitro* podmínek byly vysterilizovány ve falkoně obsahující 70% ethanol po dobu 10 sekund. Po uplynutí této doby byly listy přeloženy do falkony obsahující 0,1% (w/v) Tween20, kde byly protřepávány po dobu přibližně 10 min. Následně byly listy přesunuty do falkony obsahující 0,05% Tween20 a 1% (v/v) chlornan sodný. Listy byly ve falkoně protřepávány po dobu 1,5 min. Po uplynutí této doby byly listy vyjmuty z falkony a 3x promyty ve sterilní destilované vodě a následně vysušeny na sterilním filtračním papíru.

3.2.3 Somatická embryogeneze M. sativa

Osušené listy byly s použitím sterilního skalpelu opatrně rozřezány na polovinu a také byly odřezány řapíky. Nařezané části listů byly pomocí sterilní pinzety přeneseny na Petriho misky obsahující kalus indukující B5H médium. Kalus se vyvinul po přibližně měsíci kultivace v kultivační komoře. Vytvořené kalusy byly v laminárním boxu přeloženy na embryogenní B50 médium. Embrya se začala tvořit po 3 a více týdnech kultivace na tomto médiu. Dozrávající embrya byla postupně sterilně přenášena na MMS médium, kde byla ponechána po dobu 2-4 dní, aby došlo k indukci růstu primárního kořene.

3.2.4 Fenotypová analýza transgenních linií M. sativa

Při fenotypové analýze byly srovnávány transgenní linie *M. sativa* nesoucí konstrukty *35S::tagRFP:TUA6* a *35S::FABD2:GFP* s kontrolní linií RSY. Analýza byla zaměřena na kořenový systém rostlin, který je místem symbiotických interakcí s *S. meliloti*. Cílem této analýzy bylo zjistit, zda se vyskytují fenotypové rozdíly mezi jednotlivými liniemi ve srovnání s kontrolou a zda mají případné odchylky mezi liniemi vliv na symbiotický proces.

3.2.4.1 Měření přírůstku primárního kořene somatických embryí M. sativa

Somatická embrya s rostoucím primárním kořenem byla přenesena na MS médium, kde byla ponechána 15 dní. Prvních 5 dní na tomto médiu byly každý den pořizovány skeny, poté byly Petriho misky s rostlinami skenovány každých 5 dní. Po 15 dnech růstu na MS médiu byly rostliny přeneseny na Fahräeus médium bez N₂. Misky byly skenovány 4. a 8. den růstu na tomto médiu.

Délka hlavního kořene a jeho přírůstek byl měřen pomocí programu ImageJ. Počet laterálních kořenů byl stanoven na 15. den kultivace na MS médiu. Pro statistickou analýzu přírůstku primárního kořene byla provedena ANOVA (analysis of variance) s Tukey HSD testem. Pro statistickou analýzu laterálních kořenů byl využit Studentův *t-test*.

3.2.4.2 Inokulace rostlin s S. meliloti a hodnocení počtu nodulů

Samostatné kolonie bakterie *S. meliloti* Sm2011 byly přes noc kultivovány v tekutém LB médiu při 28 °C a 180 RPM. Falkona obsahující bakteriální kulturu byla obalena v alobalu, protože *S. meliloti* je bakterie přirozeně žijící ve tmě. Po kultivaci byly bakterie centrifugovány (10 min, 2 000 RCF) a pelet byl resuspendován v tekutém Fahräeus médiu bez N₂ tak, aby OD₆₀₀ odpovídalo hodnotě 0,5. Následovala další kultivace pro regeneraci bakterií při 28 °C přibližně 3 hod. Dvacet tři dní staré rostliny rostoucí 8 dní na tuhém Fahräeus médiu bez N₂ byly inokulovány *S. meliloti* Sm2011, kdy byly na kořeny rostlin přímo aplikovány bakterie pomocí pipety. Petriho misky byly skenovány a pozorovány pod binokulární lupou 8. a 25. den po inokulaci (dpi) pro zjištění počtu vytvořených nodulů. Pro statistickou analýzu počtu nodulů u jednotlivých linií byl proveden Studentův *t-test*.

3.2.5 Klonování Golden Gate

3.2.5.1 Plán klonování markerů α TUBULINU-6

Pro přípravu fluorescenčních markerů cytoskeletu metodou GGC byl připraven plán klonování. Bylo nutné navrhnout, které akceptory úrovně 0 budou využity (Obr. 11 a 12), aby mohly být navrženy primery s příslušnými 4bp přesahy pro požadované sekvence.

Do akceptoru úrovně 0 určeném pro promotor a 5'UTR (všeobecně označen jako Pro 5U, pICH41295) byl klonován konstitutivní promotor *EF1α*. Dále byla do akceptoru 0 určeném pro CDS1/CDS1ns (pICH41308/pAGM1287) klonována sekvence genu pro TUBULIN ALFA izoformu 6 z *A. thaliana - AtTUA6* (At4g14960.2, Tair). Geny kódující EGFP a tagRFP-T byly klonovány do akceptoru úrovně 0 určeném pro Cterminální (CT, pAGM1301) nebo N-terminální značku (NT, pAGM1276). Pro ukončení transkripce byl použit CMV 35S terminátor. CMV 35S promotor a terminátor jsou součástí MoClo Plant Parts Kit (Addgene). Sekvence promotoru *EF1α*, genu *AtTUA6*, *EGFP* a *tagRFP-T* byly získány pomocí PCR z plasmidů dostupných na OBB, CRH.

Transkripční jednotky (úroveň 1) vznikly spojením modulů úrovně 0 a akceptoru úrovně 1 (pICH47742). Tento akceptor zajišťuje přímou orientaci klonované transkripční jednotky v pozici 2 finálního akceptoru. Byly klonovány transkripční jednotky se značkou na C konci genu zájmu (Obr. 11) a také transkripční jednotky se značkou na N konci genu zájmu (Obr. 12). V plánu bylo připravit následující transkripční jednotky: *p35S::AtTUA6:EGFP, p35S::EGFP:AtTUA6, p35S::AtTUA6:tagRFP-T, p35S::tagRFP-T:AtTUA6, pEF1a::AtTUA6:EGFP, pEF1a::EGFP:AtTUA6, pEF1a::AtTUA6:tagRFP-T* a *pEF1a::tagRFP-T:AtTUA6*.

Také byla v plánu příprava finálních multigenových konstruktů. Finální moduly úrovně 2 měly sestávat z markeru α TUBULINU-6, selekční transkripční jednotky *pNOS::bar:tNOS*, koncového linkeru (pICH41744) a finálního akceptoru úrovně 2 (pAGM4723).

Vlivem pandemie COVID-19 bylo klonování přerušeno během přípravy modulů úrovně 1. Moduly *p35S::EGFP:AtTUA6* a *p35S::tagRFP-T:AtTUA6* nebyly připraveny, stejně tak žádný finální modul úrovně 2.



Obr. 11 Typy modulů a vektorů úrovně 0 využité při přípravě konstruktů úrovně 1 se značkou na C konci genu zájmu. Znázorněné jsou 4bp přesahy specifické pro jednotlivé moduly. Upraveno podle Marillonnet *et* Werner (2015). Legenda: Pro – promotor; 5U - 5' nepřekládaná oblast; CDS ns – kódující sekvence bez stop kodonu; CT – C terminální značka; 3U - 3' nepřekládaná oblast; Ter – terminátor. Hvězdička značí stop kodon.



Obr. 12 Moduly a vektory úrovně 0 využité při přípravě konstruktů úrovně 1 s N-terminální značkou. Znázorněné jsou i 4bp přesahy. Hvězdička značí stop kodon. Upraveno podle Marillonnet *et* Werner (2015). Legenda: Pro – promotor; 5U - 5' nepřekládaná oblast; CDS – kódující sekvence; NT – N terminální značka; 3U - 3' nepřekládaná oblast; Ter – terminátor.

3.2.5.2 Plán klonování rezistence na herbicid fosfinotricin

Pro selekci rostlin nesoucích multigenové konstrukty (úroveň 2) byl připraven konstrukt nesoucí selekční marker – gen *bar* kódující enzym fosfinotricin-N-acetyl transferasu. Gen *bar* byl exprimován pod kontrolou konstitutivního promotoru *AtuNos* a pro ukončení transkripce byl využit Nos terminátor (Obr. 13). Uvedené moduly byly na základě komplementarity 4bp přesahů klonovány do úroveň 1 akceptoru pICH47802. Tento akceptor úrovně 1 zajišťuje reverzní orientaci transkripční jednotky v pozici 1 ve finálním akceptoru. Všechny využité moduly i akceptor jsou součástí MoClo Plant Parts kitu.



Obr. 13 Moduly a vektory úrovně 0 využité při přípravě konstruktu úrovně 1 - *pNOS::bar:tNOS*. Znázorněné jsou i 4bp přesahy. Upraveno podle Marillonnet *et* Werner (2015).

3.2.5.3 Příprava elektrokompetentních buněk E. coli DH5a

Byl proveden roztěr komerčních elektrokompetentních buněk E. coli DH5a (Thermo Scientific) na Petriho misku obsahující tuhé LB médium bez antibiotik. Bakterie byly kultivovány přes noc při 37 °C. Další den byla do sterilní falkony s tekutým LB médiem bez antibiotik přenesena jedna kolonie. Falkona byla umístěna do třepačky (180 RPM) a bakteriální kultura byla kultivována při teplotě 37 °C přes noc. Následující den byl jeden litr sterilního LB média bez NaCl inokulován 10 ml noční kultury. Bakteriální kultura byla kultivována na třepačce při 37 °C, dokud nebyla hodnota OD₆₀₀ v rozmezí 0,4-0,6 (přibližně 4 hod.). Jeden litr bakteriální kultury o požadovaném OD₆₀₀ byl rozlit po 166 ml do 6 sterilních 200 ml falkon. Falkony s bakteriální kulturou byly inkubovány na ledu po dobu 30 min. Kultury byly centrifugovány (3 400 RCF, 4 °C, 10 min) a poté byly falkony obsahující pelet umístěny zpět na led. Supernatant byl v laminárním boxu vylit do GMO opadu a pelet byl v jednotlivých falkonách resuspendován v 166 ml sterilní vychlazené MilliQ vody. Kultura byla opět centrifugována za stejných podmínek. Supernatant byl odstraněn do odpadu a bakteriální pelet byl resuspendován v 83 ml vychlazené MilliQ vody. Po následující centrifugaci a odstranění supernatantu byl pelet resuspendován ve vychlazeném 10% glycerolu o celkovém objemu 20 ml. Po centrifugaci byl opět odpipetován supernatant. Všechen pelet byl postupně resuspendován do jediné falkony, kde byl resuspendován celkově ve 3 ml 10% glycerolu. Elektrokompetentní buňky byly alikvotovány do vychlazených mikrozkumavek po 50 µl a zmraženy v tekutém dusíku. Elektrokompetentní buňky byly uchovávány v hlubokomrazícím boxu při -80 °C.

3.2.5.4 Příprava chemokompetentních buněk E. coli DH5a

Pro přípravu startovní kultury bylo přes noc kultivováno 15 μ l bakteriální kultury *E. coli* DH5 α v 3 ml tekutého LB média. Kultivace probíhala na třepačce při 37 °C a 180 RPM. Další den bylo do 100 ml tekutého LB média přidáno 1,5 ml startovní kultury. Následovala kultivace na třepačce (200 RPM) při 37 °C do OD₆₀₀ = 0,4-0,6. Bakteriální kultura byla následně rozlita do 50ml falkon a inkubována na ledě 10 min. Kultura byla poté centrifugována (3 200 RCF) při 4 °C po dobu 20 min. Supernatant byl odstraněn a pelet byl resuspendován v 1250 μ l vychlazeného roztoku 1. Následovala inkubace na ledě po dobu 30 min a poté centrifugace za stejných podmínek. Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován v 1250 μ l vychlazeného roztoku 2. Směs byla

inkubována 30 min na ledě a poté opět centrifugována za stejných podmínek. Po odstranění supernatantu byl pelet resuspendován ve 2 ml vychlazeného roztoku 3. Chemokompetentní buňky byly alikvotovány po 50 μl do vychlazených mikrozkumavek. Buňky byly zmraženy v tekutém dusíku a uloženy do hlubokomrazícího boxu (-80 °C).

3.2.5.5 Izolace plasmidové DNA z bakteriálních konzerv

Pro získání plasmidové DNA z MoClo ToolKit a MoClo Plants Parts Kit bylo sterilní párátko namočeno do příslušné bakteriální konzervy a byl proveden roztěr na Petriho misku obsahující tuhé LB médium s příslušným selekčním antibiotikem (Tab. 4). Misky s rozetřenými bakteriemi byly inkubovány přes noc při 37°C. Následující den byly vzniklé individuální kolonie přeneseny pomocí sterilního párátka do falkony obsahující 10 ml tekutého LB média obsahující příslušné selekční antibiotikum. Bakterie byly kultivovány přes noc na třepačce při 37 °C, 200 RPM.

Plasmidová DNA byla izolována pomocí komerční soupravy – QIAprep® Spin Miniprep Kit firmy Qiagen. Veškeré potřebné chemikálie i pracovní postup je součástí balení kitu. Koncentrace izolované plasmidové DNA byla změřena pomocí NanoDrop-u. Veškerá plasmidová DNA byla rovněž ověřena restrikčním štěpením, jehož provedení bude popsáno v kapitole 3.2.5.13. Plasmidová DNA byla uchovávána v mrazícím boxu při -20 °C.

3.2.5.6 Domestikace sekvencí AtTUA6 a tagRFP-T

DNA fragmenty, které chceme klonovat do akceptoru úrovně 0, nesmí obsahovat v interní sekvenci rozpoznávací místo pro restrikční enzymy BpiI nebo BsaI. V případě, že se v sekvenci tyhle rozpoznávací místa nachází, je nutné provést domestikaci.

V interní sekvenci genu *AtTUA6* a genu pro fluorescenční protein tagRFP-T se nachází rozpoznávací místa pro enzymy BpiI a BsaI. Rozpoznávací místa pro jednotlivé enzymy byla odstraněna pomocí PCR s využitím primerů s 5' přesahem (Tab. 2). Místně specifickou mutagenezí došlo k záměně jednoho nukleotidu v rozpoznávacích sekvencích a zároveň byla díky degeneraci genetického kódu zachována původní aminokyselinová sekvence. Složení a podmínky PCR jsou uvedeny v Tab. 5 a Tab. 6.

Tab. 5 Složení 50µl PCR.

| Složka reakční směsi | Výsledná koncentrace | Množství (µl) |
|---|---------------------------|---------------|
| Templátová DNA | 100 ng | Х |
| 5x Phusion HF pufr | 1x | 10 |
| 10 mmol·dm ⁻³ dNTPs | 200 µmol∙dm ⁻³ | 1 |
| Forward primer 10 µmol·dm ⁻³ | 0,5 µmol∙dm⁻³ | 2,5 |
| Reverse primer 10 µmol·dm ⁻³ | 0,5 µmol∙dm⁻³ | 2,5 |
| Phusion High-Fidelity DNA polymerasa | 2 U | 1 |
| dH ₂ O | - | Doplnit do 50 |

Tab. 6 Program PCR využívající HF Phusion DNA polymerasu.

| Krok cyklu | Teplota (°C) | Čas | Počet cyklů |
|----------------------|--------------|---------|----------------|
| Počáteční denaturace | 98 | 30 s | 1 |
| Denaturace | 98 | 10 s | |
| Nasedání primerů | 53-62 | 30 s | 35x |
| Extenze | 72 | 30 s/kb | |
| Finální extenze | 72 | 5 min | 1 |

3.2.5.7 PCR amplifikace promotoru EF1a a genu kódujícího marker EGFP

Pro přípravu vektorů úrovně 0 obsahující $pEF1\alpha$ a EGFP byly jednotlivé sekvence amplifikovány pomocí PCR s využitím navržených primerů (Tab. 3). Primery obsahovaly 5' přesah, který byl tvořen rozpoznávacím místem pro enzym BpiI a 4bp přesahem nutným pro zaklonování do akceptoru úrovně 0. Složení a podmínky reakce jsou uvedeny v Tab. 5 a Tab. 6.

3.2.5.8 Gelová elektroforéza a izolace DNA z agarosového gelu

Velikost PCR produktů byla ověřena pomocí gelové elektroforézy v 1% agarosovém gelu. Rozvařením v mikrovlnné troubě byla připravena 1% agarosa v 1x TAE pufru. Do rozpuštěné agarosy bylo přidáno barvivo Midori Green (3,5 µl/100 ml) a směs byla promíchána. Agarosa byla vlita do připravené formy obsahující hřebínek a byla ponechána přibližně 30 min v digestoři, aby došlo k jejímu zatuhnutí. Po zatuhnutí byla forma s gelem přesunuta do elektroforetické vany a zalita 1x TAE pufrem. Hřebínek byl opatrně vyjmut a do první jamky byl pipetován marker GeneRulerTM 1 kb Plus DNA Ladder. Do dalších jamek byly pipetovány vzorky, v případě PCR o celkovém objemu 50 µl byla do jamek pipetována celá reakce společně s 6x DNA loading dye (10 µl). Elektrické napětí během separace DNA bylo nastaveno na 80-100 V a délka trvání

separace činila 40-90 min. DNA byla následně vizualizována a vyhodnocena pomocí UV transiluminátoru Gel DocTM EZ Imager.

PCR produkty byly z agarosového gelu izolovány s využitím soupravy GeneJET Gel Extraction Kit firmy Thermo Scientific. Pod UV iluminátorem byly vyříznuty PCR produkty odpovídající velikosti a byly vloženy do 2ml mikrozkumavek. Další pracovní postup i chemikálie jsou součástí kitu. Koncentrace izolované DNA byla změřena pomocí NanoDrop-u a byla následně uchována v mrazícím boxu při - 20 °C.

3.2.5.9 Příprava modulů úrovně 0

Extrahované PCR produkty byly klonovány do příslušných úroveň 0 akceptorů. Jednotlivé komponenty reakce byly smíchány v mikrozkumavce v pořadí, které je uvedeno v Tab. 7. Akceptory, které byly použity pro přípravu modulů úrovně 0, jsou vypsány ve výsledkové části v kapitole 4.1.4. Podmínky reakce jsou uvedeny v Tab. 8. Po štěpení enzymem BpiI vznikly mezi extrahovanými PCR produkty a akceptorem komplementární 4bp přesahy, které byly ligovány pomocí T4 ligasy. Ligační reakce byly skladovány při teplotě -20 °C.

Při reakci je nutné zachovat molární poměr inzertů ku akceptoru v hodnotě 2:1. Pro výpočet požadovaného množství inzertů a akceptorů byla využita následující rovnice:

 $\frac{\text{x fmol} \cdot \text{délka sekvence (bp)} \cdot 666}{1 \cdot 10^6} = \text{množství požadované DNA (ng)}$

| Složka reakční směsi | Výsledná koncentrace | Množství (µl) |
|----------------------|-------------------------|---------------|
| 10x T4 pufr | 1x | 2 |
| 0,1% BSA | - | 2 |
| Akceptor | 20-40 fmol | Х |
| Inzert(y) | 40-100 fmol | Х |
| T4 ligáza | 200 U | 1 |
| BpiI/BsaI | 5 U | 1 |
| dH ₂ O | - | Doplnit do 20 |

Tab. 7 Složení Golden Gate klonovací reakce.

| Krok cyklu | Teplota (°C) | Čas | Počet cyklů | |
|-------------------|--------------|--------|----------------|--|
| Aktivace digesce | 37 | 20 s | 1 | |
| Digesce | 37 | 3 min | 25 | |
| Ligace | 16 | 4 min | 25X | |
| Inaktivace enzymu | 50 | 10 min | 1 | |
| Inaktivace ligasy | 80 | 5 min | 1 | |

Tab. 8 Teplotní program Golden Gate klonovací reakce.

3.2.5.10 Transformace elektrokompetentních buněk

Připravené elektrokompetentní buňky (50 µl) byly rozmrazeny na ledu. K buňkám byly napipetovány 1-2 µl reakce a směs byla opatrně promíchána pipetou a ponechána 10 min na ledu. Směs byla přenesena do čisté a vychlazené elektroporační kyvety. Dobře osušená kyveta byla umístěna do elektroporátoru a bylo na ni cíleno napětí o hodnotě 2,4 kV. Ihned po elektrickém pulsu bylo ke směsi přidáno 200 µl SOC média, směs byla promíchána, přenesena do mikrozkumavky a inkubována po dobu 1,5 h při 37 °C, 180 RPM.

3.2.5.11 Transformace chemokompetentních buněk

Připravené chemokompetentní buňky (50 µl) byly rozmrazeny na ledu. K rozmrazeným buňkám byly přidány 3 µl reakce a směs byla jemně promíchána a ponechána 30 min na ledu. Následně byly mikrozkumavky s buňkami umístěny do termobloku nastaveném na 42 °C po dobu 45 s. Poté byly mikrozkumavky umístěny zpět na led po dobu 2 min. Po uplynutí této doby bylo k buňkám pipetováno 200 µl SOC média pokojové teploty. Mikrozkumavka obsahující transformační směs byla inkubována po dobu 1 h při 37 °C a 220 RPM.

3.2.5.12 Kultivace bakterií a selekce kolonií nesoucí požadovaný konstrukt

Na Petriho misku obsahující tuhé LB médium s příslušným selekčním antibiotikem (Tab. 4), 40 µl IPTG a 120 µl X-Gal bylo pipetováno 150 µl transformační směsi. Směs byla pomocí sterilní hokejky rozetřena na celou plochu plotny a následně byla inkubována přes noc při 37 °C. Následující den byly do falkon obsahující 10 ml tekutého LB média s požadovaným selekčním antibiotikem přeneseny individuální bílé kolonie. Bílá barva kolonií značí, že došlo k ligaci požadovaných inzertů do akceptoru. Falkony obsahující kolonie byly následně inkubovány přes noc na třepačce (200 RPM, 37 °C).

Další den bylo 500 µl noční kultury smícháno s 500 µl 50% (v/v) sterilního glycerolu. Směs byla promíchána pipetou a následně zamrazena v tekutém dusíku. Bakteriální konzervy byly uloženy do hlubokomrazícího boxu (-80 °C). Ze zbylé noční kultury byla následně izolována pDNA pomocí komerčního kitu - QIAprep® Spin Miniprep Kit firmy Qiagen.

3.2.5.13 Ověřování připravených konstruktů restrikčním štěpením

Veškeré produkty připravené Golden Gate klonováním byly vždy ověřeny restrikčním štěpením. Restrikční štěpení bylo navrženo *in silico* v programu Geneious Prime 2020.2.2 nebo ApEv2.0.37. Jednotlivé komponenty reakční směsi (Tab. 9) byly smíchány v mikrozkumavce. Směs byla následně inkubována 1 hod při 37 °C. Následovala elektroforéza produktů štěpení na 1% agarosovém gelu a gel byl vizualizován pomocí UV transiluminátoru. Jednotlivá restrikční štěpení budou popsána ve výsledkové části.

| Složka reakční směsi | Výsledná koncentrace | Množství (μl) |
|----------------------|-------------------------|---------------|
| pDNA | 300 ng | Х |
| enzym | | 1 |
| 10x pufr | 1x | 2 |
| dH ₂ O | - | Doplnit do 20 |

Tab. 9 Složení reakční směsi restrikčního štěpení pDNA izolované z E. coli.

3.2.5.14 Golden Gate klonování modulů úrovně 1

Moduly úrovně 0 byly naklonované do akceptoru úrovně 1 za vzniku funkčních transkripčních jednotek (modulů úrovně 1). Fúze inzertů s akceptorem se uskutečnila na základě komplementarity unikátních 4bp přesahů, které vznikly po štěpení enzymem BsaI. Akceptory a inzerty využité při klonování úrovně 1 jsou popsány ve výsledkové části v kapitole 4.1.5.

Po sérii štěpení a ligací modulů do akceptorů byla ligační reakce transformována do kompetentních buněk, které byly kultivovány při 37 °C na LB agarových plotnách obsahující selekční antibiotikum (ampicilin pro selekci modulů úrovně 1), induktor a substrát pro modro-bílou selekci. Další den byly nově vzniklé bílé kolonie přeneseny do tekutého LB média se selekčním antibiotikem. Následně byla izolována pDNA, která byla štěpena restrikčními enzymy pro ověření přítomnosti jednotlivých konstruktů. V případě úspěšně ověřených konstruktů byl připraveny bakteriální konzervy. Všechny zmíněné kroky jsou popsány výše.

3.2.6 Konfokální laserová skenovací mikroskopie s Airyscanem

Kořenové špičky rostlin *M. sativa* byly v laminárním boxu uřezány a byly uloženy na podložní sklíčko do pár kapek tekutého ½ MS média. Následně byl kořen překryt krycím sklíčkem. Hrany krycího sklíčka byly překryty parafilmem, aby nedocházelo k rychlému odpařování média. Připravené preparáty byly nasnímány konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem LSM 880 s Airyscanem pomocí programu Zen 2014. Parametry snímání byly následující - laser pro GFP: 488, filtr: 493-551 nm; laser pro tagRFP: 561, filtr: 561-583 nm. Získaný obrazový materiál byl následně zpracován použitím programu Zen 2014.

4 VÝSLEDKY

4.1 Příprava cytoskeletálních markerů Golden Gate klonováním

V této části jsou uvedeny výsledky klonování metodou Golden Gate. Cílem bylo připravit několik různých fluorescenčních markerů α TUBULINU-6 pomocí konstruktů, exprimujících gen *AtTUA6* s fluorescenční značkou (tagRFP-T nebo EGFP). Vlivem pandemie COVID-19 a s ní souvisejících vládních opatření nebyla práce na přípravě cytoskeletálních markerů dokončena. Byly připraveny jednotlivé transkripční jednotky obsahující promotor, gen *AtTUA6*, fluorescenční marker a terminátor, ale již nedošlo ke spojení jednotlivých transkripčních jednotek s vektorem nesoucí rezistenci na herbicid fosfinotricin a nebyly tedy vytvořeny finální multigenové konstrukty (úroveň 2).

4.1.1 Ověřovaní modulů z kitů "MoClo Tool" a "MoClo Plant Parts" restrikčním štěpením izolované plasmidové DNA

Plasmidová DNA, která byla izolována z bakteriálních konzerv MoClo Tool Kit a MoClo Plant Parts Kit (Addgene) byla ověřena restrikčním štěpením pro určení správnosti jednotlivých plasmidů. Popis jednotlivých plasmidů je uveden výše v Tab. 4. Výsledky štěpení (Obr. 14-16) odpovídaly *in silico* predikci.



Obr. 14 Elektroforetogram jednotlivých plasmidů štěpených enzymem PvuI (1-7, 9) nebo enzymem Alw44I (8). M – marker; 1-5 = 1 787 bp a 1 058 bp; 6 = 1 652 bp a 1 190 bp; 7 = 2 241 bp a 1 076 bp; 8 = 2 656 bp a 1 019; 9 = 2 331 a 1 076 bp.



Obr. 15 Elektroforetogram jednotlivých plasmidů štěpených enzymem Alw44I (1-2) nebo enzymem PaeI (3). M – marker; 1 = 1579 bp a 1 019 bp; 2 = 1495 bp a 1 019 bp; 3 = 4420 bp a 548 bp.



Obr. 16 Elektroforetogram jednotlivých plasmidů štěpených enzymem Alw44I (1) nebo enzymem PvuI (2 - 3). M – marker; 1 = 1436 bp a 1019 bp; 2 = 3140 bp a 1828 bp; 3 = 10794 bp a 2125 bp.

4.1.2 Domestikace sekvencí AtTUA6 a tagRFP-T

Domestikace jednotlivých sekvencí byla provedena pomocí PCR s využitím Phusion DNA polymerasy. Po amplifikaci byly získány domestikované fragmenty, které byly ohraničené specifickými 4bp přesahy a rozpoznávacím místem pro enzym BpiI. Získané PCR produkty o očekávané velikosti byly následně izolovány z gelu s využitím GeneJET Gel Extraction kitu.

Pro domestikaci genu *AtTUA6* byl jako templát využit vektor pIG121Hm nesoucí konstrukt *p35S::tagRFP:TUA6*. Tento gen obsahuje v sekvenci 2 rozpoznávací místa pro enzym BpiI a jedno rozpoznávací místo pro enzym BsaI. Po domestikaci byly získány fragmenty (Obr. 17) o velikosti odpovídající *in silico* predikci (Tab. 10). Pro fúzi s N-terminální značkou byl gen *AtTUA6* amplifikován společně se stop kodonem. Také byla amplifikována varianta bez stop kodonu, která byla využita při fúzi s C-terminální značkou.

| | Název | PCR produkt (bp) | Tm (°C) |
|---|-----------------|------------------|---------|
| 1 | cAtTUA6_GC-Fp1 | 212 | 59 |
| | cAtTUA6_GC-Rp1 | | |
| 2 | cAtTUA6_GC-Fp2 | 120 | 60 |
| | cAtTUA6_GC-Rp2 | — 129 | |
| 3 | cAtTUA6_GC-Fp3 | 201 | 58 |
| | cAtTUA6_GC-Rp3 | 291 | |
| 4 | cAtTUA6_GC-Fp4 | 717 | 59 |
| | cAtTUA6_GC-Rp4 | /16 | |
| 5 | cAtTUA6_GC-Fp4 | 717 | 59 |
| | cAtTUA6_GC-Rp4n | — /1/ | |

Tab. 10 Páry primerů využité při domestikaci genu AtTUA6.



Obr. 17 Elektroforetogram domestikace genu *AtTUA6*. **M** – marker; **1-5** domestikované fragmenty genu *AtTUA6*. Velikost získaných produktů odpovídala *in silico* predikcím.

Jako templát pro domestikaci tagRFP-T byl využit vektor pEN-attR2-tagRFP-TstopattL3 obsahující gen kódující tagRFP-T. TagRFP-T obsahuje ve své sekvenci 1 rozpoznávací místo pro enzym BpiI a jedno rozpoznávací místo pro enzym BsaI. Byla provedena PCR s využitím primerů, které jsou pro přehled vypsány v Tab. 11. Byly získány PCR produkty (Obr. 18), které odpovídaly *in silico* predikcím. Byla amplifikována varianta se stop kodonem (pro C-terminální fúzi) i bez stop kodonu (pro N-terminální fúzi).

| | Název | PCR produkt (bp) | Tm (°C) |
|---|-------------------|------------------|---------|
| 1 | tagRFP-T_GC-Fp1 | 204 | 59 |
| | tagRFP-T_GC-Rp1 | | |
| 2 | tagRFP-T_GC-Fp2 | 257 | 62 |
| | tagRFP-T_GC-Rp2 | | |
| 3 | tagRFP-T_GC-Fp3 | 101 | 60 |
| | tagRFP-Ts_GC-Rp3 | - 101 | |
| 4 | tagRFP-T_GC-Fp1N | 721 | 50 |
| | tagRFP-Tx_GC-Rp3N | - /31 | 39 |

Tab. 11 Páry primerů využité při domestikaci tagRFP-T.



Obr. 18 Domestikace genu pro tagRFP-T. M – marker; **1-4** domestikované fragmenty. Velikost získaných produktů odpovídala *in silico* predikcím.

4.1.3 PCR amplifikace promotoru *pEF1α* a genu *EGFP*

Interní sekvence promotoru *EF1a* a genu kódující fluorescenční protein EGFP neobsahují žádné rozpoznávací místo pro enzymy BsaI nebo BpiI, proto nebyla nutná domestikace. Pro amplifikaci sekvencí byla provedena PCR s využitím Phusion DNA polymerasy. Po proběhnutí reakce byly získány amplikony ohraničené rozpoznávacím místem pro enzym BpiI a specifickými 4bp přesahy, které jsou komplementární k přesahům v odpovídajících akceptorech. PCR produkty o očekávané velikosti byly izolovány z gelu pomocí GeneJET Gel Extraction kitu.

Templátem pro amplifikaci $pEF1\alpha$ byl vektor pEN-attL4-pEF1 α -attR1 se zaklonovanou sekvencí promotoru $EF1\alpha$. Pro amplifikaci tohoto promotoru byly využity primery uvedené v Tab. 12. PCR produkty (Obr. 19) odpovídaly *in silico* predikcím.

V případě amplifikace genu kódující EGFP byl jako templát využit vektor pEN-attR2-EGFPstop-attL3. Tento vektor má mezi attR2 a attL3 místy zaklonovaný gen pro EGFP. Byla amplifikována varianta se stop kodonem (pro C-terminální fúzi) i bez stop kodonu (pro N-terminální fúzi). Použité primery jsou uvedeny v Tab. 12. PCR produkty (Obr. 19) odpovídaly *in silico* predikcím.

| Název | PCR produkt (bp) | Tm (°C) | |
|-------------------------|------------------|---------|--|
| pEF1a_GC-F | 1 105 | 50 | |
| pEF1a_GC-R | 1 185 | 59 | |
| pEF1a_GC-F | 1 195 | 50 | |
| ² pEF1a_GC-R | 1 185 | 59 | |
| EGFP_GC-F | 749 | 50 | |
| ³ EGFP_GC-R | /48 | 59 | |
| EGFP_GC-Fr | 745 | 50 | |
| 4 EGFP_GC-Rt | /45 | 59 | |
| | | | |

Tab. 12 Páry primerů využité při amplifikaci promotoru *EF1α* a markeru EGFP.



Obr. 19 PCR amplifikace promotoru $EF1\alpha$ a genu pro EGFP. **M** – marker; **1-2** – amplifikovaný promotor $EF1\alpha$; **3-4** – amplifikovaná sekvence EGFP. Velikost získaných produktů odpovídala *in silico* predikcím.

4.1.4 Ověření modulů úrovně 0 restrikčním štěpením

Extrahované PCR produkty byly během Golden Gate klonovací reakce inkorporovány do příslušných akceptorů úrovně 0 na základě komplementarity 4bp přesahů. Po proběhnutí ligační reakce byly jednotlivé výsledné reakce transformovány do kompetentních buněk *E. coli* DH5α. Transformované buňky byly kultivovány a bílé kolonie, potencionálně nesoucí požadovaný konstrukt, byly očkovány do LB média obsahující selekční antibiotikum. Následně byla z kultur izolována pDNA, která byla ověřena restrikčním štěpením. Mapy vytvořených modulů úrovně 0 jsou uvedené v příloze č. 1 (Obr. P1-P4).

Přítomnost *pEF1α* v akceptoru pICH41295 (Obr. P1 A) byla ověřena enzymem PvuI a v případě akceptoru pAGM1251 (určeno pro fúzi s N terminální značkou; Obr. P1 B) byly využity enzymy NdeI a PvuI (Obr. 20).

Pro ověření přítomnosti genu pro EGFP v akceptoru pAGM1301 (určeno pro C terminální fúzi; Obr. P2 A) byly využity enzymy HindIII a PvuI (Obr. 21). V případě klonování genu pro EGFP do akceptoru pAGM1276 (určeno pro N terminální fúzi; Obr. P2 B) byla izolovaná pDNA ověřena enzymy NdeI a PvuI (Obr. 21).

Domestikovaná sekvence pro fluorescenční protein tagRFP-T byla klonována do akceptoru pAGM1301 (Obr. P3 A) a do akceptoru pAGM1276 (Obr. P3 B). Pro ověření její přítomnosti v uvedených akceptorech byla izolovaná pDNA štěpena enzymem PvuI (Obr. 22).

Přítomnost domestikovaného genu *AtTUA6* v akceptoru pAGM1287 (určeno pro fúzi s C terminální značkou; Obr. P4 A) a akceptoru pICH41308 (určeno pro fúzi s N

terminální značkou; Obr. P4 B) byla ověřena restrikčním enzymem PvuI (Obr. 23). Ve všech případech byly pozorovány fragmenty o očekávané velikosti.



Obr. 20 Elektroforetogram na ověření přítomnosti promotoru $EF1\alpha$ v akceptoru pAGM1251 nebo v akceptoru pICH41295. **M** – marker; restrikce enzymy **NdeI** a **PvuI** odpovídala velikosti linearizovaného plasmidu obsahujícího inzert (3 408 bp).



pAGM1301-EGFP pAGM1276-EGFP

Obr. 21 Elektroforetogram na ověření přítomnosti genu pro EGFP v akceptoru pAGM1301 nebo v akceptoru pAGM1276. **M** – marker; restrikce enzymy **HindIII**, **PvuI** a **NdeI** odpovídala velikosti linearizovaného plasmidu obsahujícího inzert (2 971 bp – pAGM1301-EGFP; 2 965 bp – pAGM1276-EGFP).



pAGM1301-tagRFP-T pAGM1276-tagRFP-T

Obr. 22 Elektroforetogram na ověření přítomnosti genu pro tagRFP-T v akceptoru pAGM1301 nebo v akceptoru pAGM1276. **M** – marker; restrikce enzymem **PvuI** odpovídala velikosti linearizovaného plasmidu obsahujícího inzert (2 965 bp - pAGM1301-tagRFP-T; 2 959 bp - pAGM1276-tagRFP-T).



pAGM1287-AtTUA6 pICH41308-AtTUA6

Obr. 23 Elektroforetogram na ověření přítomnosti genu AtTUA6 v akceptoru pAGM1287 nebo v akceptoru pICH41308. **M** – marker; restrikce enzymem **PvuI** odpovídala velikosti linearizovaného plasmidu obsahujícího inzert (3 600 bp – pAGM1287-AtTUA6; 3 601 bp – pICH41308-AtTUA6).

4.1.5 Ověření modulů úrovně 1 restrikčním štěpením

Pro tvorbu funkčních transkripčních jednotek byly využity ověřené moduly úrovně 0 spolu s akceptory pro úroveň 1. V Tab. 13 je ukázáno, které akceptory a moduly úrovně 0 byly použity pro přípravu jednotlivých transkripčních jednotek. K naklonování došlo na základě komplementarity 4bp přesahů mezi transkripční jednotkou a akceptorem úrovně 1. Po transformaci kompetentních buněk *E. coli* DH5α byl proveden roztěr

na Petriho misku obsahující LB médium s ampicilinem, X-Gal a IPTG. Další den byly jednotlivé bílé kolonie kultivovány v tekutém LB médiu s ampicilinem. Z narostlých kultur byla izolována pDNA, která byla ověřena restrikčním štěpením (Obr. 24 – 27). Výsledky štěpení se shodovaly s *in silico* predikcí. Mapy připravených modulů úrovně 1 jsou uvedeny v příloze 2 (Obr. P5-P11).

| Transkripční jednotka (úroveň 1) | Inzerty (úroveň 0) | Akceptor | Restrikční štěpení |
|----------------------------------|--------------------|------------|-----------------------|
| p35S::AtTUA6:EGFP | pICH51266-p35S | | PvuI BamHI |
| | pAGM1287-AtTUA6 | pICU/77/2 | |
| | pAGM1301-EGFP | picii4/742 | |
| | pICH41414-t35S | | |
| | pICH51266-p35S | | NdeI |
| n255AtTUA6.tacDED T | pAGM1287-AtTUA6 | | |
| p355All UA0.lugKFF-1 | pAGM1301-tagRFP-T | рісп47742 | Alw44I |
| | pICH41414-t35S | | |
| | pICH41295-pEF1α | | HindIII EcoRI |
| TEL ATUAGECED | pAGM1287-AtTUA6 | mICI147742 | |
| pEF1a::At1UA0:EGFP | pAGM1301-EGFP | рісн47742 | |
| | pICH41414-t35S | | |
| | pAGM1251-pEF1α | pICH47742 | NdeI EcoRI |
| TEL CED. ATUA6 | pAGM1276-EGFP | | |
| pEF1a::EGFP:AttUA0 | pICH41308-AtTUA6 | | |
| | pICH41414-t35S | | |
| | pICH41295-pEF1a | | Alw44I EcoRI |
| pEEla., AtTUA6.tacDED T | pAGM1287-AtTUA6 | | |
| per IuAll UAO.lughr F-1 | pAGM1301-tagRFP-T | рісп47742 | |
| | pICH41414-t35S | | |
| | pAGM1251-pEF1α | | NdeI EcoRI |
| pEF1a::tagRFP-T:AtTUA6 | pAGM1276-tagRFP-T | mICI147742 | |
| | pICH41308-AtTUA6 | рісн47742 | |
| | pICH41414-t35S | | |
| | pICH87633-pNOS | | BpiI Alw44I |
| pNOS::bar:tNOS | pICH42222-bar | pICH4780 | |
| - | pICH41421-tNOS | | |

Tab. 13 Klonování úrovně 1 – použité inzerty a akceptory.



Obr. 24 Restrikční štěpení úroveň 1 vektorů nesoucí transkripční jednotky *EF1a::TUA6:EGFP* nebo *EF1a::EGFP:TUA6*. **M** – marker; restrikce *35S::TUA6:EGFP* enzymy **BamHI** (8 085 bp) a **PvuI** (4 986 bp a 3 099 bp); restrikce *35S::TUA6:tagRFP-T* enzymy **NdeI** (8 079 bp) a **PvuI** (4 035 bp, 2 798 bp a 1 246 bp).



Obr. 25 Restrikční štěpení úroveň 1 vektorů nesoucí transkripční jednotky *EF1a::TUA6:EGFP* nebo *EF1a::EGFP:TUA6*. **M** – marker; restrikce *EF1a::TUA6:EGFP* enzymy **EcoRI** (5 396 bp a 2422 bp) a **HindIII** (4 576 bp a 3 242 bp); restrikce *EF1a::EGFP:TUA6* enzymy **EcoRI** (4 673 bp a 3 143 bp) a **NdeI** (3 951 bp, 2 739 bp a 1 116 bp).


Obr. 26 Restrikční štěpení úroveň 1 vektorů nesoucí transkripční jednotky *EF1a::TUA6:tagRFP-T* nebo *EF1a::tagRFP-T:TUA6*. **M** – marker; restrikce *EF1a::TUA6:tagRFP-T* enzymy **Alw44I** (3 768 bp, 2 798 bp a 1 242 bp) a **EcoRI** (5 386 bp a 2 422 bp); restrikce *EF1a::tagRFP-T:TUA6* enzymy **NdeI** (3 961 bp, 2 733 bp a 1 116 bp) a **EcoRI** (4 673 bp a 3 137 bp).



Obr. 27 Restrikční štěpení úroveň 1 vektoru nesoucí transkripční jednotku *pNOS::bar:tNOS.* Byly analyzovány dva nezávislé vzorky (kolonie 1 a kolonie 2). **M** – marker; restrikce enzymy **Alw44I** (4 297 bp a 1 246 bp) a **BpiI** (4 338 bp a 1205 bp).

4.2 Somatická embryogeneze *M. sativa*

Pokud existuje protokol pro regeneraci rostlin procesem somatické embryogeneze, je možné získat v řádu několika týdnů dostatek rostlinného materiálu pro jednotlivé experimenty. V případě *M. sativa* bylo publikováno několik protokolů pro regeneraci rostlin procesem somatické embryogeneze (Shetty *et* McKersie, 1993; Tian *et al.*, 2002; Sangra *et al.* 2019).

Somatickou embryogenezi u *M. sativa* je možné navodit z různých typů rostlinných orgánů – listů, kotyledonů nebo hypokotylu (Atanassov et Brown, 1984). V této diplomové práci byly pro indukci somatické embryogeneze linií tagRFP-TUA6, FABD2-GFP a kontrolní linie RSY využity listy, které byly sterilizovány, nařezány a uloženy na kalus indukující B5H médium (Obr. 28 A). B5H médium obsahovalo rostlinné hormony – auxin 2,4-D (1 mg·l⁻¹) a cytokinin kinetin (0,1 mg·l⁻¹). Neorganizovaná masa buněk se vytvořila po přibližně 2-3 týdnech kultivace na tomto médiu (Obr. 28 B). Vyvinuté kalusy byly následně přeneseny na embryogenní B50 médium, ve kterém nejsou rostlinné hormony obsaženy. Somatická embrya se vlivem nepřítomnosti hormonů začala na kalusu vytvářet po 2-3 týdnech kultivace (Obr. 28 C). Na embryogenním B50 médiu bylo možné pozorovat kalusy se somatickými embryi v různých stádiích vývoje embrya v stádiu globulárním (Obr. 29, hvězdičky), torpédovitém (Obr. 29, šipky) a kotyledonárním (Obr. 29, trojúhelníky). Vyvinutá somatická embrya byla přenášena na MMS médium, kde došlo během 2-4 dní k jejich klíčení a tvorbě kořenů (Obr. 28 D). Pro účely fenotypového experimentu byla vyklíčená somatická embrya přenesena a kultivovaná 15 dní na MS médium, kde se dále vyvíjely v mladé rostliny. Následně byly rostliny po 15 dnech na MS médiu přeneseny na Fahräeus médium bez N₂ (FAH-N₂ médium).



Obr. 28 Proces somatické embryogeneze u *M. sativa*. A Listový explantát na BH5 médiu, **B** kalus na B5H médiu, **C** embryogenní kalus na B50 médiu, **D** somatické embryo s vyvíjejícím se kořenem na MMS médiu. Měřítko 2 mm.



Obr. 29 Jednotlivá stádia somatických embryí vyvíjejících se na embryogenním B50 médiu. Hvězdičky ukazují somatická embrya v globulárním stádiu, šipky v torpédovitém stádiu a trojúhelníky v kotyledonárním stádiu. Měřítko 2 mm.

4.3 Fenotypová analýza transgenních linií *M. sativa* exprimující markery cytoskeletu

Pro fenotypový experiment byla využita vyklíčená somatická embrya *M. sativa*, která rostla 2-4 dny na MMS médiu. Byly využity transgenní linie exprimující markery cytoskeletu – *tagRFP-TUA6* a *FABD2-GFP* a kontrolní linie RSY. Ve dvou biologických opakování bylo analyzováno celkem 10 rostlin linie *tagRFP-TUA6*, 11 rostlin *FABD2-GFP* a 8 rostlin kontrolní linie RSY.

Vyklíčená somatická embrya byla přenesena z MMS média na MS kultivační médium, kde byla ponechána 15 dní. Během této kultivace se vyklíčená somatická embrya regenerovala v kompletní rostliny. Poté byly rostliny přeneseny na FAH-N₂ médium, kde byly po 8 dnech růstu na tomto médiu inokulovány s *S. meliloti* Sm2011. Ve fenotypovém experimentu byl měřen přírůstek hlavního kořene, počet laterálních kořenů a počet vytvořených nodulů.

Fenotypové experimenty byly během karanténních opatření založeny a udržovány Mgr. Michaelou Tichou, Ph.D. a Mgr. Olgou Šamajovou, Dr. Mou úlohou v tomto experimentu bylo samotné měření přírůstků hlavních kořenů, počítání laterálních kořenů a statistická analýza získaných hodnot.

4.3.1 Měření přírůstku hlavního kořene

Petriho misky s analyzovanými rostlinami byly skenovány denně prvních 5 dní růstu na MS médiu pro zjištění denního přírůstku hlavního kořene. Dále byl přírůstek hlavního kořene měřen 3., 5., 10. a 15. den růstu na MS médiu a po přenosu na FAH-N₂ médium 4. a 8. den růstu na tomto médiu. Přírůstek byl měřen pomocí programu ImageJ a pro statistickou analýzu naměřených přírůstků byla využita ANOVA s Tukey HSD testem.

Mezi kontrolní linií RSY a linií *tagRFP-TUA6* nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi hodnotami denního přírůstku. Průměrný denní přírůstek u kontrolní linie RSY činil 1,2 mm a u linie *tagRFP-TUA6* měl hodnotu 1,55 mm. Hodnoty denního přírůstku hlavního kořene rostlin linie *FABD2-GFP* byly prokazatelně vyšší ve srovnání s přírůstky hlavních kořenů linií *tagRFP-TUA6* a RSY (Obr. 30). Průměrný denní přírůstek hlavního kořene u linie *FABD2-GFP* měl hodnotu 2 mm. Také byly zaznamenány velmi vysoké denní přírůstky, kdy nejvyšší denní přírůstek činil 1,1 cm a byl pozorován u rostliny linie *FABD2-GFP* (Obr. 30).





Obr. 30 Krabicový graf porovnávající denní přírůstek hlavního kořene u linií RSY, tagRFP-TUA6 a FABD2-GFP. Denní přírůstek byl měřen prvních 5 dní růstu vyklíčených somatických embryí na MS médiu. Písmeno "b" značí signifikantní rozdíl v denním přírůstku hlavního kořene u rostlin linie FABD2-GFP ve srovnání s liniemi RSY a tagRFP-TUA6 (p < 0,05). Pro statistické hodnocení byla využita ANOVA s Tukey HSD testem.

Vyklíčená somatická embrya uložená na MS kultivačním médium se postupně vyvíjela v mladé kompletní rostliny. U všech analyzovaných linií se prodlužoval a rozvětvoval kořenový systém a také se vyvíjela nadzemní část rostlin (Obr. 31). Růst kořenů a nadzemní části pokračoval i po přenosu na FAH-N₂ médium.

Z grafu přírůstku hlavního kořene za konkrétní dny lze vyčíst, že průměrný přírůstek byl ve všech analyzovaných dnech vždy nejvyšší u linie *FABD2-GFP* (Obr. 32).

V prvních dnech na MS médiu byly rozdíly v přírůstku mezi analyzovanými liniemi menší, postupně se však rozdíly navyšovaly. Nejvyšší rozdíly v přírůstku hlavního kořene mezi liniemi byly zaznamenány 23. den kultivace (tedy 8. den růstu na FAH-N₂ médiu). Průměrná hodnota přírůstku hlavního kořene po 23 dnech činila u kontrolní RSY linie 2,34 cm, u linie *tagRFP-TUA6* 2,87 cm a u linie *FABD2-GFP* 3,16 cm.

Také v rámci jedné linie se hodnoty přírůstku hlavních kořenů v prvních dnech velmi neodlišovaly, ale od 10. dne se rozptyl naměřených hodnot navyšoval. Větší variabilitu naměřených přírůstků měly od 10. dne transgenní linie *tagRFP-TUA6* a *FABD2-GFP*, kdy byly v jednotlivých dnech naměřeny velmi krátké i velmi dlouhé přírůstky hlavních kořenů. Nejmenší rozdíly mezi naměřenými hodnotami přírůstků měla v jednotlivých dnech kontrolní linie RSY (Obr. 32).

Přírůstky byly v daných dnech statisticky vyhodnocovány, ale nebyl zjištěn žádný signifikantní rozdíl mezi liniemi.



Obr. 31 Vývoj kořenového systému a nadzemní části jednotlivých linií *M. sativa* během kultivace na MS a FAH-N₂ médiu. Měřítko 1 cm.



Obr. 32 Grafické znázornění přírůstku hlavního kořene u linií RSY, *tagRFP-TUA6* a *FABD2-GFP* v jednotlivých dnech. Pro statistické hodnocení byla využita ANOVA s Tukey HSD testem. V žádný den nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl v přírůstku hlavního kořene mezi analyzovanými liniemi (p hodnota nebyla nižší číslu 0,05).

4.3.2 Vyhodnocení počtu laterálních kořenů

Počet laterálních kořenů byl analyzován 15. den růstu na MS médiu (Obr. 33 A). Pro statistickou analýzu počtu laterálních kořenů byl využit Studentův *t-test*. Byl zjištěn signifikantní rozdíl v počtu vytvořených laterálních kořenů u linie *tagRFP-TUA6* a linie *FABD2-GFP* ve srovnání s kontrolní RSY linií. Celkový počet vytvořených laterálních kořenů u všech analyzovaných rostlin linie RSY činil 50, u linie *tagRFP-TUA6* bylo napočítáno celkem 201 laterálních kořenů a v případě linie *FABD2-GFP* dokonce 233 laterálních kořenů (Obr. 33 B).

Maximální počet laterálních kořenů na jedné rostlině u linie RSY byl 14, v případě linie *tagRFP-TUA6* to bylo 63 a u linie *FABD2-GFP* bylo na jedné rostlině napočítáno celkem 58 lateráních kořenů. U všech linií byly také pozorovány rostliny, které neměly žádný nebo pouze velmi nízký počet laterálních kořenů (Obr. 33 C).



Obr. 33 Analýza počtu laterálních kořenů u linií RSY, tagRFP-TUA6 a FABD2-GFP. Laterální kořeny byly počítány 15. den růstu na MS médiu. A rostliny *M. sativa* rostoucí 15. den na MS médiu. B graf znázorňující celkový počet laterálních kořenů u jednotlivých linií *M. sativa*. C průměrný počet laterálních kořenů u testovaných linií *M. sativa*. Pro statistické hodnocení byl využit Studentův *t-test*. Hvězdička značí signifikantní rozdíly v počtu laterálních kořenů mezi testovanými liniemi (p < 0,05). Měřítko 1 cm.

4.3.3 Vyhodnocení počtu vytvořených nodulů

Dvacet tři dní staré rostliny *M. sativa* rostoucí 8 dní na FAH-N₂ médiu byly inokulovány bakteriemi *S. meliloti* Sm2011. Viditelné bílé noduly se na kořenech vytváří přibližně 7-10 dpi (Maunoury *et al.*, 2010). V této práci se počet vytvořených nodulů analyzoval 8. a 25. dpi. Počet nodulů u jednotlivých linií byl statisticky hodnocen pomocí Studentova *t- testu*.

Linie *tagRFP-TUA6* a *FABD2-GFP* tvořily 8. dpi prokazatelně více nodulů (Obr. 34 A, B). Celkový počet nodulů vytvořených rostlinami linie RSY, *tagRFP-TUA6* a *FABD2-GFP* činil 14, 71 a 101, respektive. Nejvyšší počet nodulů vytvořených jednou rostlinou bylo 31 a byly vytvořeny na rostlině linie *FABD2-GFP*.

Linie *FABD2-GFP* tvořila také prokazatelně více nodulů 25. dpi (Obr. 35 A, B). Celkový počet nodulů vytvořených rostlinami linie RSY, *tagRFP-TUA6* a *FABD2-GFP* činil 86, 132 a 242, respektive. Průměrný počet nodulů u linie *FABD2-GFP* byl 34.



Obr. 34 Analýza počtu vytvořených nodulů 8. dpi u linií RSY, *tagRFP-TUA6* a *FABD2-GFP*. A graf znázorňující celkový počet vytvořených nodulů u jednotlivých linií *M. sativa*. B průměrný počet vytvořených nodulů u testovaných linií *M. sativa*. Pro statistické hodnocení byl použit Studentův *t-test*. Hvězdičky značí signifikantní rozdíly v počtu nodulů mezi testovanými liniemi (p < 0.05 *tagRP-TUA6*, p < 0.01 *FABD2-GFP*).



Obr. 35 Analýza počtu vytvořených nodulů 25. dpi u linií RSY, *tagRFP-TUA6* a *FABD2-GFP*. **A** graf znázorňující celkový počet vytvořených nodulů u jednotlivých linií *M. sativa*. **B** průměrný počet vytvořených nodulů u testovaných linií *M. sativa*. Pro statistické hodnocení byl použit Studentův *t-test*. Hvězdička značí signifikantní rozdíly v počtu nodulů mezi testovanými liniemi (p < 0.05 FABD2-GFP).

4.4 *In vivo* pozorování cytoskeletu v raných fázích interakce *M. sativa* s *Sinorhizobium meliloti*

Pro *in vivo* pozorování byly využity transgenní linie *M. sativa* stabilně exprimující markery cytoskeletu – linie *tagRFP-TUA6*, *FABD2-GFP* a *MAP4-GFP*. Byla zkoumána lokalizace cytoskeletu před a po ošetření symbiotickými bakteriemi *S. meliloti* značenými mRFP.

Z kořenů somatických embryí a mladých rostlin výše zmíněných transgenních linií *M. sativa* byly připraveny jednotlivé preparáty. Preparáty byly snímány pomocí laserového skenovacího mikroskopu s Airyscanem. Fotografie byly pořízeny Mgr. Michaelou Tichou, Ph.D.

tagRFP-TUA6 V případě snímání kořenové preparátu linie neošetřeného symbiotickými bakteriemi bylo možné pozorovat kortikální mikrotubuly v rhizodermálních buňkách kořenové špičky (Obr. 36 A). Obr. 36 B ukazuje detail rhizodermálních buněk kořene, kde je možné vidět jednotlivá MT vlákna, která jsou transverzálně orientovaná. Také v kořenových vláscích byly pozorovány kortikální MT (Obr. 36 C, šipky).



Obr. 36 Lokalizace a distribuce MT v kořenovém preparátu *M. sativa* stabilně exprimující konstrukt *tagRFP-TUA6*. A kortikální MT v rhizodermálních buňkách kořenové špičky, B detailní snímek kortikálních MT v rhizodermálních buňkách kořene, C kortikální MT v kořenových vláscích. Šipky ukazujíc jednotlivé MT. Měřítko 50 μ m (A), 20 μ m (B), 10 μ m (C).

V neošetřeném kořenovém preparátu linie *FABD2-GFP* bylo možné pozorovat expresi markeru v rhizodermálních buňkách kořenové špičky (Obr. 37 A). Obr. 37 B ukazuje detail rhizodermálních buněk, ve kterých jsou vizualizována aktinová vlákna. Aktinová vlákna tvořila v buňkách hustou síť, která obklopovala jednotlivá buněčná jádra (Obr. 37 B, šipky). Aktin byl také pozorován v odlupujících se buňkách kořenové čepičky (Obr. 37 C, šipky).



Obr. 37 Lokalizace a distribuce aktinových vláken v kořenovém preparátu *M. sativa* stabilně exprimující konstrukt *FABD2-GFP*. A vizualizace aktinu značeného GFP v rhizodermálních buňkách kořenové špičky, **B** detailní snímek aktinových vláken v rhizodermálních buňkách kořene, aktinová vlákna obklopující buněčné jádro jsou označena šipkou. C aktinová vlákna v odlupujících se buňkách kořenové čepičky. Měřítko 50 μ m (A), 10 μ m (B), 20 μ m (C).

Lokalizace cytoskeletu a symbiotických struktur byla analyzována 17 dní po ošetření kořenů *M. sativa* linie *FABD2-GFP* bakteriemi *S. meliloti* značenými mRFP. Bylo zaznamenáno charakteristické stáčení kořenových vlásků okolo shluku bakterií (Obr. 38 C, hvězdička) a tvorba infekčního vlákna, které je tvořeno jednotlivými bakteriemi a prorůstá skrz celý kořenový vlásek (Obr. 38 A, C šipky). Byla také pozorována aktinová vlákna, která jsou velmi důležitá pro růst kořenových vlásků (Obr. 38, C trojúhelníky).



Obr. 38 Lokalizace a distribuce aktinových vláken a *S. meliloti* v kořenu *M. sativa* stabilně exprimující marker *FABD2-GFP* sedmnáct dní po inokulaci. A bakterie *S. meliloti* vizualizovány pomocí mRFP. Šipkou jsou označena infekční vlákna. B aktinová vlákna (trojúhelník) vizualizována pomocí markeru *FABD2-GFP*. Zatočené kořenové vlásky jsou označeny hvězdičkou. C sloučené obrázky. Měřítko 20 μm.

Analyzována byla také lokalizace MT u linie *MAP4-GFP* sedmnáct dní po inokulaci s bakteriemi *S. meliloti* značenými mRFP. Stejně jako v předcházejícím případě bylo pozorováno obtočení kořenového vlásku okolo symbiotických bakterií (Obr. 39 B, C hvězdička). Také bylo pozorováno infekční vlákno prorůstající celým kořenovým vláskem (Obr. 39 A, C šipka). V kořenových vláscích bylo možné pozorovat kortikální MT (Obr. 39 B, C trojúhelník).



Obr. 39 Lokalizace a distribuce MT a *S. meliloti* v kořenu *M. sativa* stabilně exprimující marker *MAP4-GFP* sedmnáct dní po inokulaci. A bakterie *S. meliloti* vizualizovány pomocí mRFP. Šipkou jsou označeny infekční vlákna. B MT (trojúhelník) vizualizovány pomocí markeru *MAP4-GFP*. Zatočené kořenové vlásky jsou označeny hvězdičkou. C sloučené obrázky. Měřítko 20 μm.

5 DISKUZE

První úlohou experimentální části byl *in silico* design cytoskeletálních markerů. Pro design byl využit bioinformatický software Geneious Prime, který nabízí mnoho funkcí. Jedná se o funkce pro analýzu DNA/RNA sekvencí jako je tvorba fylogenetických stromů nebo porovnávání sekvencí. Software také dokáže simulovat proces molekulárního klonování Golden Gate. Dále obsahuje funkce pro návrh a testování primerů na příslušných sekvencích, optimalizaci kodónů nebo restrikční analýzu. Geneious prime také nabízí přímý přístup k databázím, jako je BLAST, NCBI nebo GenBank. Tento software je pravidelně aktualizován a jeho funkce jsou stále upravovány a rozšiřovány (https://www.geneious.com/prime/).

Podle *in silico* navržených map bylo realizováno klonování cytoskeletálních markerů, konkrétně se jednalo o markery a TUBULUNU-6. Pro vizualizaci tubulinu byl klonován gen kódující fluorescenční protein – EGFP nebo tagRFP-T a pro konstitutivní expresi markeru byl klonován promotor *CMV 35S* nebo *EF1a*. Metodou klonování Golden Gate byly připraveny konstrukty úrovně 0 (Příloha č. 1) a konstrukty úrovně 1 (Příloha č. 2), ale bohužel příprava multigenních konstruktů nebyla dokončena vlivem karanténních opatření, která byla zavedena v souvislosti s pandemií COVID-19. Expresi finálních konstruktů bylo v plánu otestovat pomocí transientních transformací listů *N. benthamiana* suspenzí *A. tumefaciens* nesoucí jednotlivé finální konstrukty a TUBULUNU-6. Po otestování funkčnosti konstruktů byla v plánu stabilní transformace listových explantátů *M. sativa* a odvození stabilních transgenních linií pomocí somatické embryogeneze. Transgenní linie by bylo možné využít např. pro studium symbiotických interakcí mezi *M. sativa* a *S. meliloti*.

Metoda molekulárního klonování Golden Gate umožňuje velice efektivní zabudování i více fragmentů do akceptorového vektoru najednou a je proto široce využívána. Tato metoda umožňuje klonování konstruktů, které jsou využitelné v rostlinách, živočiších, kvasinkách i bakteriích (Kakui *et al.*, 2015; Gantner *et al.*, 2018; Chiasson *et al.*, 2019).

Pro usnadnění Golden Gate klonování konstruktů určených pro transformaci rostlin byl vyvinut komerční set klonovacích vektorů a také sada 96 standardizovaných modulů úrovně 0. Sada obsahuje standardizované promotory, 5'a 3'nepřekládané oblasti, signální sekvence, reportéry, selekční markery i terminátory (Engler *et al.*, 2014), kdy některé sekvence byly použity i v této práci. Podobné komerční sety byly vyvinuty i pro přípravu kvasinkových vektorů (Kakui *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015) nebo pro přípravu vektorů určených pro transformaci *E. coli* (Moore *et al.*, 2016).

Fenotypové analýzy transgenních linií jsou důležité pro zjištění, zda zavedení transgenu ovlivní metabolismus, růst nebo vývoj rostlin. Při fenotypovém experimentu, který byl proveden v této diplomové práci, byly porovnávány dvě transgenní linie *M. sativa* exprimující cytoskeletální markery – *tagRFP-TUA6* a *FABD2-GFP* s kontrolní linií RSY.

Při fenotypovém experimentu byl měřen přírůstek primárního kořene, počet laterálních kořenů a množství vytvořených nodulů. Dříve bylo provedeno několik fenotypových studií transgenních linií *M. sativa*, ale žádná se nezaměřovala na analýzu transgenních linií exprimující cytoskeletální markery.

V této diplomové práci bylo zjištěno, že linie *FABD2-GFP* má v prvních 5 dnech růstu na MS médiu prokazatelně větší denní přírůstek hlavního kořene ve srovnání s linií *tagRFP-TUA6* a kontrolní linií RSY (Obr. 30). Dále byl také zjištěn signifikantní rozdíl v počtu laterálních kořenů u linie *tagRFP-TUA6* a *FABD2-GFP* ve srovnání s kontrolní linií (Obr. 33), kdy transgenní linie tvořily mnohem více laterálních kořenů. S výrazně vyšším počtem laterálních kořenů u transgenních linií také souvisí větší počet vytvořených nodulů po inokulaci se symbiotickými bakteriemi *S. meliloti* (Obr. 34, 35). Osmý den po inokulaci bylo pozorováno prokazatelně více nodulů u linií *tagRFP-TUA6* a *FABD2-GFP*. Tím, že je kořenový systém více rozvětvený, mají symbiotické bakterie více možností být zachyceny kořenovými vlásky.

Počet laterálních kořenů také ovlivňuje nodulaci u sóji, kde bylo zjištěno, že kultivar Kitamusume tvoří více laterálních kořenů ve srovnání a kultivarem Toyosuzu. Po inokulaci kořenů symbiotickými bakteriemi bylo na kultivaru Kitamusume pozorováno podstatně více nodulů (Ikeda 1999).

Vytvořené noduly byly počítány 8. a 25. dpi. Primordia nodulu se začínají vytvářet 4.-5. dpi, ale většinou ještě nejsou vidět okem pozorovatelné změny na kořenech (Arrighi *et al.*, 2008). Bílé noduly je možné pozorovat přibližně 7. dpi. V těchto nodulech je vyvinutá meristémová a infekční zóna, ale ještě není plně vyvinuta dusík fixující zóna. Rovněž se bakterie ještě nediferencují na bakteroidy, a proto v těchto nodulech ještě neprobíhá fixace dusíku. Přibližně 10.-13. dpi noduly obsahují již plně diferenciované bakteroidy a fixace dusíku v nich probíhá (Maunoury *et al.*, 2010).

V dřívější studii bylo prokázáno, že na délku kořenových vlásků a počet vytvořených nodulů má u *M. sativa* vliv signální protein SIMK. SIMK je stresem indukovaná MAPK, která je aktivována během solného stresu, oxidativního stresu a při působení různých elicitorů (Munnik *et al.*, 1999; Cardinale *et al.*, 2002; Fernandez-Pascual *et al.*, 2006). Byla provedena fenotypová analýza transgenních linií *M. sativa* – linie 35S::GFP:SIMK, která nadexprimuje SIMK a linie SIMKK RNAi, ve které je exprese SIMKK a tím i SIMK částečně potlačena. Jako kontrola byla využita netransgenní linie RSY. U linie 35S::GFP:SIMK byly pozorovány delší kořenové vlásky a více infekčních vláken a nodulů ve srovnání s kontrolními rostlinami. Dále bylo zjištěno, že snížení exprese SIMKK u linie SIMKK RNAi vede ke kratším kořenovým vláskům a menšímu počtu nodulů (Hrbáčková *et al.*, 2020).

Také byla ovlivněna nadzemní část rostlin, kdy nadexprese SIMK vedla k větší tvorbě biomasy. Tato zvýšená tvorba biomasy u linie *35S::GFP:SIMK* má velký biotechnologický potenciál, protože *M. sativa* je jednou z nejvýznamnějších pícnin a pěstuje se především pro nadzemní zelenou část (Putnam *et al.*, 2000; Hrbáčková *et al.*, 2020).

Poslední část diplomové práce se věnovala *in vivo* pozorování cytoskeletu *M. sativa* během interakce s bakteriemi *S. meliloti*. Pro vizualizaci cytoskeletu byly využity linie stabilně exprimující následující markery – *tagRFP-TUA6, FABD2-GFP* a *MAP4-GFP*. Kořeny rostlin byly kokultivovány se symbiotickými bakteriemi *S. meliloti* značenými fluorescenčním proteinem mRFP.

Působení bakteriálního Nod faktoru na kořeny rostlin způsobí zvýšení množství intracelulárního vápníku v kořenových vláscích, jeho následnou oscilaci a dochází ke změně v uspořádání cytoskeletu uvnitř vlásku, což má za následek zatočení kořenového vlásku okolo bakterie (Cardenas *et al.*, 2003; Sieberer *et al.*, 2005). Uvězněná bakterie se začne množit a strukturou zvanou infekční vlákno se bakterie dostávají skrz kořenový vlásek a rhizodermis do kortexu kořene.

Charakteristické uvěznění bakterie kořenovým vláskem bylo pozorováno i v této práci (Obr. 38 C, 39 C, hvězdička). Rovněž bylo pozorováno infekční vlákno, které prorůstalo celým kořenovým vláskem (Obr. 38 C, 39 C, šipka). Infekční vlákno prorůstá do kortexu kořene, kde se vyvíjí primordium nodulu. Primordium se dále vyvíjí a dává vzniku maturovanému nodulu, který obsahuje jednotlivé zóny – meristematickou, infekční, dusík fixující a případně zónu senescence (Xiao *et al.*, 2014).

Fluorescenční proteiny, které jsou součástí cytoskeletálních markerů, by neměly ovlivňovat přirozenou dynamiku nebo lokalizaci cytoskeletálních proteinů. Díky tomu, že většina široce využívaných fluorescenčních proteinů je monomerní a má poměrně malou velikost (GFP 27 kDa), tak k ovlivnění dynamiky nedochází a jsou vhodné pro *in vivo* studie. Fluorescenční proteiny, které tvoří dimery nebo tetramery (např. dsRed), nejsou příliš vhodné pro přípravu markerů cytoskeletu, protože mohou ovlivňovat jeho dynamiku (Shaner *et al.*, 2007).

6 ZÁVĚR

V teoretické části této diplomové práce bylo rozebráno téma symbiózy mezi rostlinami *M. sativa* a dusík fixujícími bakteriemi rodu *Rhizobium*. Část teorie se zabývala průběhem samotné symbiózy a další část byla zaměřena na rostlinný cytoskelet – na jeho úlohu a změny, které se uskutečňují v průběhu celého symbiotického procesu. Dále jsou rozebrány jednotlivé MAPK, které byly popsány u *M. sativa*. Závěr teoretické části je věnován principu molekulárního klonování Golden Gate.

V experimentální části byly nejprve představeny výsledky Golden Gate klonování. Pomocí PCR byla provedena domestikace genu AtTUA6 a genu kódující fluorescenční protein tagRFP-T. Dále byl pomocí PCR amplifikován promotor EF1a a gen kódující EGFP. Z agarosového gelu byly extrahovány PCR produkty a ty byly následně naklonovány do akceptorů úrovně 0. Po proběhnutí klonovací reakce byly transformovány bakterie E. coli DH5a. Po izolaci pDNA byla správnost naklonování ověřena pomocí restrikčního štěpení. Dále byly ověřené moduly úrovně 0 využity pro přípravu transkripčních jednotek. Byly připraveny následující transkripční jednotky: p35S::AtTUA6:EGFP, p35S::AtTUA6:tagRFP-T, pEF1a::AtTUA6:EGFP, pEF1a::AtTUA6:tagRFP-T, pEF1a::tagRFP-T:AtTUA6 pEF1a::EGFP:AtTUA6, a pNOS::bar:tNOS. Tyto moduly úrovně 1 mohou být v budoucnu využity pro sestavení modulů úrovně 2.

Dále byly v experimentální části představeny výsledky fenotypové analýzy transgenních linií *M. sativa* nesoucí cytoskeletální markery. S kontrolní linií RSY byly srovnávány linie *tagRFP-TUA6* a *FABD2-GFP*. Bylo zjištěno, že linie *FABD2-GFP* má prokazatelně větší denní přírůstek hlavního kořene. Dále byl analyzován počet laterálních kořenů a po inokulaci rostlin s bakteriemi *S. meliloti* byly počítány vytvořené noduly. V obou případech bylo zjištěno, že transgenní linie exprimující markery cytoskeletu tvoří signifikantně více laterálních kořenů i nodulů.

Poslední část byla věnována *in vivo* studiím cytoskeletu *M. sativa* během interakce s *S. meliloti*. Na snímcích pořízených konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem s Airyscanem byly pozorovány kortikální mikrotubuly v rhizodermálních buňkách a v kořenových vláscích. Dále byla v rhizodermálních buňkách a odlupujících se buňkách kořenové čepičky pozorována aktinová vlákna. Sedmnáct dní po aplikaci *S. meliloti* na kořeny rostlin byly pozorovány interakce mezi kořenovými vlásky *M. sativa* a bakteriemi, jako je zatočení kořenového vlásku okolo bakterie a prorůstání infekčního vlákna kořenovým vláskem.

7 SEZNAM LITERATURY

- Abdel-Lateif K., Vaissayre V., Gherbi H., Verries C., Meudec E., Perrine-Walker F., Cheynier V., Svistoonoff S., Franche C., Bogusz D., Hocher V. (2013): Silencing of the chalcone synthase gene in Casuarina glauca highlights the important role of flavonoids during nodulation. *New Phytologist* 199, 1012–1021.
- Aganga A. A., Tshwenyane S. O. (2003): Lucerne, Lablab and Leucaena leucocephalaforages: production and utilization for livestock production. *Pakistan Journal of Nutrution* . **2**, 46-53.
- Agmon N., Mitchell L. A., Cai Y., Ikushima S., Chuang J., Zheng A., Choi W. J., Martin J. A., Caravelli K., Stracquadanio G., Boeke J. D. (2015): Yeast golden gate (yGG) for the efficient assembly of *S. cerevisiae* transcription units. *ACS Synthetic Biology* 4, 853–859.
- Arrighi J. F., Godfroy O., de Billy F., Saurat O., Jauneau A., Gough C. (2008): The RPG gene of Medicago truncatula controls Rhizobium-directed polar growth during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A* **105**, 9817-9822.
- Arrighi J. F., Barre A., Ben Amor B., Bersoult A., Campos Soriano L., Mirabella R., de Carvalho-Niebel F., Journet E. P., Ghérardi M., Huguet T., Geurts R., Dénarié J, Rougé P., Gough C. (2006): The *Medicago truncatula* lysin motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant Physiology* 142, 265-279.
- Atanassov A., Brown D. C. W. (1984): Plant regeneration from suspension culture and mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Cultur* **3**, 149–162.
- Baluška F., Parker J. S., Barlow P. W. (1992): Specific patterns of cortical and endoplasmic microtubules associated with cell growth and tissue differentiation in roots of maize (Zea mays L.). *Journal of Cell Science* **103**, 191–200.
- Baluška F., Salaj J., Mathur J., Braun M., Jasper F., Samaj J., Chua N.-H., Barlow P. W., Volkmann D. (2000): Root hair formation: Factin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilinsupported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges. *Developmental Biology* 227, 618–632.
- Bauchan G., R. (2006): Cytogenetics. In: Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement. Vol 5, (Singh R., Jauhar P., eds.) CRC Press, Boca Raton, U.S.A., 22-25.
- Beck M., Komis G., Muller J., Menzel D., Šamaj J. (2010): Arabidopsis homologs of nucleusand phragmoplast-localized kinase 2 and 3 and mitogen-activated protein kinase 4 are essential for microtubule organization. *Plant Cell* **22**, 755-771.
- Bekešová S., Komis G., Křenek P., Vyplelová P., Ovečka M., Luptovčiak I., Šamaj J. (2015): Monitoring protein phosphorylation by acrylamide pendant Phos-Tag[™] in various plants. *Frontiers in Plant Science* **6**, 336.
- Berson T., von Wangenheim D., Takáč T., Šamajová O., Rosero A., Ovečka M., Komis G., Stelzer E. H. K., Šamaj J. (2014): Trans-Golgi network localized small GTPase RabA1d is involved in cell plate formation and oscillatory root hair growth. *BMC Plant Biology* 14, 252.
- Bibikova T. N., Blancaflor E. B., Gilroy S. (1999): Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **17**, 657–666.
- Bingham E. T., McCoy T. J. (1979): Cultivated alfalfa at the diploid level: Origin, reproductive stability and yield of seeds and forage. *Crop Science* **19**, 97-100.
- Bögre L., Calderini O., Binarova P., Mattauch M., Till S., Kiegerl S., Jonak C., Pollaschek C., Barker P., Huskisson N. S., Hirt H., Heberle-Bors E. (1999): A MAP Kinase Is Activated Late in Plant Mitosis and Becomes Localized to the Plane of Cell Division. *The Plant Cell* 11, 101-113.
- Bolaños L., Redondo-Nieto M., Rivilla R., Brewin N. J., Bonilla I. (2004): Cell surface interactions of *Rhizobium* bacteroids and other bacterial strains with symbiosomal and peribacteroid membrane components from pea nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17, 216-223.
- Borisov A. Y., Danilova T. N., Koroleva T. A., Kuznetsova E. V., Madsen L., Mofett M., Naumkina T. S., Nemankin T. A., Ovchinnikova E. S., Pavlova Z. B. *et al* (2007): Regulatory genes of garden pea (Pisum sativum L.) controlling the development of nitrogen-fixing

nodules and arbuscular mycorrhiza: a review of basic and applied aspects. *Applied Biochemistry and Microbiology* **43**, 237–243.

- Braun M., Hauslage J., Czogalla A., Limbach C. (2004): Tip-localized actin polymerization and remodeling, reflected by the localization of ADF, profilin and villin, are fundamental for gravity-sensing and polar growth in characean rhizoids. *Planta* **219**, 379-388.
- Breakspear A., Liu C., Roy S., Stacey N., Rogers Ch., Trick M., Morieri G., Mysore K. S., Wen J., Oldroyd G. E. D., Downie A., Murray J. D. (2014): The Root Hair "Infectome" of Medicago truncatula Uncovers Changes in Cell Cycle Genes and Reveals a Requirement for Auxin Signaling in Rhizobial Infection. *The Plant Cell* 26, 4680-4701.
- Brewin N. J. (2004): Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Critical Reviews in Plant Sciences* 23, 293-316.
- Bubb M. R., Spector I., Beyer B. B., Fosen K. M. (2000): Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization an explanation for certain in vivo observations. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 5163–5170.
- Calderini O., Bogre L., Vicente O., Binarova P., Heberle-Bors E., Wilson C. (1998): A cell cycle regulated MAP kinase with a possible role in cytokinesis in tobacco cells. *Journal of Cell Science* 111, 3091-3100.
- Cam Y., Pierre O., Boncompagni E., Hérouart D., Meilhoc E., Bruand C. (2012): Nitric oxide (NO): a key player in the senescence of *Medicago truncatula* root nodules. *New Phytologist* 196, 548–560.
- Cárdenas L., Lovy-Wheeler A., Wilsen K. L., Hepler P. K. (2005): Actin polymerization promotes the reversal of streaming in the apex of pollen tubes. *Cell Motil Cytoskeleton* **61**, 112-127.
- Cardenas L., Thomas-Oates J. E., Nava N., López-Lara I. M., Hepler P. K., Quinto C. (2003): The role of nod factor substituents in actin cytoskeleton rearrangements in Phaseolus vulgaris. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**, 326–334.
- Cardinale F., Jonak C., Ligterink W., Niehaus K., Boller T., Hirt H. (2000): Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 36734-36740.
- Cardinale F., Meskiene I., Ouaked F., Hirt, H. (2002): Convergence and divergence of stressinduced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *The Plant Cell* **14**, 703-711.
- Cermak T., Doyle E., Christian M., Wang L., Zhang, Y., Schmidt C., Baller J., Somia N., Bogdanove A., Voytas D. (2011): Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic acids research* 39. e82. 10.1093/nar/gkr218.
- D'Alvise N., Lesueur-Lambert C., Fertin B., Dhulster P., Guillochon D. (2000): Hydrolysisand large scale ultrafiltration study of alfalfa protein concentrate enzymatic hydrolysate. *Enzyme and Microbial Technology* **27**, 286-94.
- Dakora F. D., Joseph C. M., Phillips, D. A. (1993): Alfalfa (Medicago sativa l) root exudates contain isoflavonoids in the presence of Rhizobium meliloti. *Plant Physiology* **101**, 819–824.
- Danquah A., Zélicourt A., Colcombet J., Hirt H. (2014): The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology Advances* **32**, 40–52.
- de Zelicourt A., Colcombet J., and Hirt H. (2016): The role of MAPK modules and ABA during abiotic stress signaling. *Trends Plant Science* **21**, 677–685.
- Downie A. J., Walker S. A. (1999): Plant responses to nodulation factors. *Current Opinion in Cell Biology* 2, 483±489.
- Engler C., Gruetzner R., Kandzia R., Marillonnet S. (2009): Golden gate shuffling: a one-pot DNAshuffling method based on type IIs restriction enzymes. *PLoS One* **4**, e5553.
- Engler C., Youles M., Gruetzner R., Ehnert T. M., Werner S., Jones J. D., Patron N. J., Marillonnet S. (2014): A golden gate modular cloning toolbox for plants. ACS Synthetic Biology 11, 839-843.
- Esseling J. J., Lhuissier F. G. P., Emons A. M. C. (2003): Nod factor-induced root hair curling: continuous growth towards the point of Nod factor application. *Plant Physiology* 132, 1982– 1988.

- Fajardo D.A., Ramaraj T., Devitt N., Tang H. B., Cameron C.T., Brummer E.C., Town C.D., Udvardi M.K., Monteros M.J., Farmer A.D., Miller J.R., Young N.D., Mudge J (2016): Sequencing and genome assembly of cultivated alfalfa at the diploid level (CADL) Medicago sativa. Proceedings of Plant & Animal Genome Conference XXIV, San Diego, USA.
- Fan X., Hou J., Chen X., Chaudhry F., Staiger C. J., Ren H. (2004): Identification and characterization of a Ca2+-dependent actin filament-severing protein from lily pollen. *Plant Physiology* **136**, 3979-3989.
- Favata M. F., Horiuchi K. Y., Manos E. J., Daulerio A. J., Stradley D. A., Feeser W. S., Van Dyk D. E., Pitts W. J., Earl R. A., Hobbs F., Copeland R. A., Magolda R. L., Scherle P. A., Trzaskos J. M. (1998): Identification of a Novel Inhibitor of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 18623-18632.
- Felle H. H., Kondorosi E., Kondorosi A., Schultze M. (1999): Elevation of the cytosolic free [Ca2.] is indispensable for the transduction of the Nod factor signal in alfalfa. *Plant Physiology* **121**, 273-279.
- Fernandez-Pascual M., Lucas M. M., de Felipe M. R., Boscá L., Hirt H., Golvano M. P. (2006): Involvement of mitogen-activated protein kinases in the symbiosis *Bradyrhizobium-Lupinus*. *Journal of Experimental Botany* 57, 2735–2742.
- Figurski, D. H., Helinski, D. R. (1979): Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 76, 1648–1652.
- Finan T., Weidner S., Wong K., Buhrmester J., Chain P., Vorhölter F., Hernandez-Lucas I., Becker A., Cowie A., Gouzy J., Golding B., Pühler A. (2001): The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N2-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 9889-9894.
- Fournier J., Timmers A. C., Sieberer B. J., Jauneau A., Chabaud M., Barker D. G. (2008): Mechanism of infection thread elongation inroot hairs of Medicago truncatulaand dynamic interplay with associated rhizobial colonization. *Plant Physioly* 148, 1985–1995.
- Frugier F., Kosuta S., Murray J. D., Crespi M., Szczyglowski K. (2008): Cytokinin: secret agent of symbiosis. *Trends in Plant Science* 13, 115–120.
- Fuchsman W. H., Appleby C. A. (1979): Separation and determination of the relative concentrations of the homogeneous components of soybean leghemoglobin by isoelectric focusing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* **579**, 314–324.
- Gage DJ (2002): Analysis of infection thread development using Gfp and DsRed-expressing Sinorhizobium meliloti. *Journal of Bacteriology* **184**, 7042–7046.
- Galibert F., Finan T. M., Long S. R., Pühler A., Abola P. *et al.* (2001): The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**, 668–672.
- Gantner J., Ordon J., Ilse T., Kretschmer C., Gruetzner R., Löfke C., Dagdas V., Buerstenbinder K., Marillonnet S., Stuttmann J. (2018): Peripheral infrastructure vectors and an extended set of plant parts for the Modular Cloning system. *PLoS ONE* 13, 10.1371/journal.pone.0197185.
- Gavrin A., Jansen V., Ivanov S., Bisseling T., Fedorova E. (2015): ARP2/3-mediated actin nucleation associated with symbiosome membrane is essential for the development of symbiosomes in infected cells of Medicago truncatula root nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28, 605–614.
- Gavrin A., Kulikova O., Bisseling T., Fedorova E. E. (2017) Interface symbiotic membrane formation in root nodules of Medicago truncatula: the role of synaptotagmins MtSyt1, MtSyt2 and MtSyt3. *Frontiers in Plant Science* **8**, 201.
- Geddes B. A., Mendoza-Suárez M. A., Poole P. S. (2019): A Bacterial Expression Vector Archive (BEVA) for Flexible Modular Assembly of Golden Gate-Compatible Vectors. *Frontiers in Microbiology* 9, 3345.
- Gelvin S. B. (2017): Integration of Agrobacterium T-DNA into the Plant Genome. *Annual Review* of Genetics **51**, 195–217.
- Gibson K. E., Kobayashi H., Walker G. C. (2008): Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual Review of Genetics* **42**, 413-441.

- Gonzalez-Rizzo S., Crespi M., Frugier, F. (2006): The Medicago truncatula CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root developmentand early symbiotic interaction with Sinorhizobium meliloti. *Plant Cell* 18, 2680–2693.
- Grimsrud P. A., den Os D., Wenger C. D., Swaney D. L., Schwartz D., Sussman M. R., Ané J. M., Coon J. J. (2010): Large-Scale Phosphoprotein Analysis in Medicago truncatula Roots Provides Insight into in Vivo Kinase Activity in Legumes. *Plant Physiology* 152, 19-28.
- Gualtieri G, Bisseling T. (2000): The evolution of nodulation. *Plant Molecular Biology* **42**, 181–194.
- Guenoune, D., Galili S., Phillips D. A., Volpin H., Chet I., Okon Y., Kapulnik Y. (2001): The defense response elicited by the pathogen Rhizoctonia solani is suppressed by colonization of the am-fungus Glomus intraradices. *Plant Science* 160, 925–932.
- Hanks S. K., Hunter T. (1995): The Eukaryotic protein kinase superfamily. In: The protein kinase Factsbook. (Hardie D. G., Hanks S. K., eds) Academic Press, London, England, 576-596.
- Hawkins C., Yu L. X. (2018): Recent progress in alfalfa (Medicago sativa L.) genomics and genomic selection. *The Crop Journal* **6**, 565-575.
- Heidstra R., Geurts R., Franssen H., Spaink H. P., Van Kammen A., Bisseling T. (1994): Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on Vicia sativa. *Plant Physiology* 105, 787-797.
- Hepler P. K., Vidali L., Cheung A. Y. (2001): Polarized cell growth in higher plants. Annual Review of Cell and Developmental Biology 17, 159-187.
- Hettenhausen C., Schuman M. C., and Wu J. (2014): MAPK signaling a key element in plant defense response to insects. *Insect Science* 22, 157–164.
- Hord C. L., Sun Y. J., Pillitteri L.J., Torii K. U., Wang H., Zhang S., Ma H. (2008): Regulation of *Arabidopsis* early anther development by the mitogen-activated protein kinases, MPK3 and MPK6, and the ERECTA and related receptor-like kinases. *Molecular Plant Pathology* 1, 645–58.
- Hrbáčková M., Luptovčiak I., Hlaváčková K., Dvořák P., Tichá M., Šamajová O., Novák D., Bednarz H., Niehaus K., Ovečka M., Šamaj J. (2020): Overexpression of alfalfa SIMK promotes root hair growth, nodule clustering and shoot biomass production. *Plant Biotechnology Journal* doi:10.1111/pbi.13503.
- Chauhan A. (2015): Sinorhizobium meliloti Bacteria Contributing to Rehabilitate the Toxic Environment. *Journal of Bioremediation and Biodegradation* **6**, 1-2.
- Chen T., Zhu H., Ke D., Cai K., Wang C., Gou H., Hong Z., Zhang Z. (2012): A MAP kinase kinase interacts with SymRK and regulates nodule organogenesis in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* **24**, 823–838.
- Cheng HP, Walker G.C. (1998): Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* **180**, 5183–5191.
- Chiasson D., Giménez-Oya V., Bircheneder M., Bachmaier S., Studtrucker T., Ryan J., Sollweck K., Leonhardt K., Boshart M., Dietrich P., Parniske M. (2019): A unified multi-kingdom Golden Gate cloning platform. *Scientific Reports* **9**, 10131.
- Ichimura K., Shinozaki K., Tena G. (2002): Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* **7**, 301-308.
- Ikeda J. (1999): Differences in numbers of nodules and lateral rootsbetween soybean (Glycine max L. Merr.) cultivars, Kitamusume and Toyosuzu, *Soil Science and Plant Nutrition* 45, 591-598.
- Jagodzik P., Tajdel-Zielinska M., Ciesla A., Marczak M., Ludwikow A. (2018): Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Plant Hormone Signaling. *Frontiers in Plant Science* 9, 1387.
- Jiménez-Guerrero I., Acosta-Jurado S., Del Cerro P., Navarro-Gómez P., López-Baena F. J., Ollero F. J., Vinardell J. M., Pérez-Montaño F. (2018): Transcriptomic Studies of the Effect of *nod* Gene-Inducing Molecules in Rhizobia: Different Weapons, One Purpose. *Genes* 9, 1-27.

- Johnston A. W. B., Beringer J. E. (1975): Identification of the *Rhizobium* strains in pea root nodules using genetic markers. *Journal of General Microbiology* **87**, 343–350.
- Jonak C., Kiegerl S., Lloyd C., Chan J., Hirt H. (1995): MMK2, a novel alfalfa MAP kinase, specifically complements the yeast MPK1 function. *Molecular Genetics and Genomics* **248**, 686–694.
- Jonak C., Nakagami H., Hirt H. (2004): Heavy metal stress. Activation of distinct mitogenactivated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiology* 136, 3276– 3283.
- Kakui Y., Sunaga T., Arai K., Dodgson J., Ji L., Csikász-Nagy A., Carazo-Salas R., Sato M. (2015): Module-based construction of plasmids for chromosomal integration of the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *Open Biology* 5, 150054.
- Kanamori N., Madsen L. H., Radutoiu S., Frantescu M., Quistgaard E. M., Miwa H., Downie J. A., James E. K., Felle H. H., Haaning L. L., Jensen T. H., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Sandal N., Stougaard J. (2006): A nucleoporin is required for induction of Ca2+ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103, 359–364.
- Kawaharada Y., James E. K., Sandal, N., Kelly S., Stougaard J. (2017): The ERF Required for Nodulation1 (ERN1) transcription factor is required for infection thread formation in Lotus japonicus. *Molecular plant-microbe interactions* **30**, 1-39.
- Ketelaar T., de Ruijter N. C., Emons A. M. (2003): Unstable F-actin specifies the area and microtubule direction of cell expansion in Arabidopsis root hairs. *Plant Cell* **15**, 285-292.
- Khan Z., Khan S. H., Mubarik M. S., Sadia B., Ahmad A. (2017): Use of TALEs and TALEN Technology for Genetic Improvement of Plants. *Plant Molecular Biology Reporter* **35**, 1–19.
- Kim T. W., Michniewicz M., Bergmann D. C., Wang Z. Y. (2012): Brassinosteroid regulates stomatal development by GSK3-mediated inhibition of a MAPK pathway. *Nature* 482, 419– 422.
- Kitaeva A. B., Demchenko K.N., Tikhonovich I. A., Timmers A. C., Tsyganov V. E. (2016): Comparative analysis of the tubulin cytoskeleton organization in nodules of Medicago truncatula and Pisum sativum: bacterial release and bacteroid positioning correlate with characteristic microtubule rearrangements. *New Phytologist* 210, 168-183.
- Kobayashi Y., Yamada M., Kobayashi I., Kunoh, H. (1997): Actin microfilaments are required for the expression of non-host resistance in higher plants. *Plant Cell Physiol.* **38**, 725–733.
- Komis G., Illés P., Beck M., Samaj J. (2011): Microtubules and mitogen-activated protein kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 650-657.
- Komis G., Šamajová O., Ovečka M., Šamaj J. (2018): Cell and Developmental Biology of Plant Mitogen-Activated Protein Kinases. *Annual Review of Plant Biology* **69**, 237-265.
- Kosetsu K., Matsunaga S., Nakagami H., Colcombet J., Sasabe M., Soyano T., Takahashi Y., Hirt H., Machida Y. (2010): TheMAP kinase MPK4 is required for cytokinesis in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **22**, 3778-3790.
- Krysan P. J., Jester P. J., Gottwald J. R., Sussman M. R. (2002): An Arabidopsis mitogenactivated protein kinase kinase gene family encodes essential positive regulators of cytokinesis. *Plant Cell* 14,1109-1120.
- Kuhn S., Stiens M., Pühler A., Schlüter A. (2008): Prevalence of pSmeSM11a-like plasmids in indigenous *Sinorhizobium meliloti* strains isolated in the course of a field release experiment with genetically modified *S. meliloti* strains. *FEMS Microbiology Ecology* **63**, 118–131.
- Kuppusamy K.T., Endre G., Prabhu R. Varma Penmetsa, Harita Veereshlingam, Douglas R. Cook, Rebecca Dickstein, Kathryn A. VandenBosch (2004): *LIN*, a *Medicago truncatula* gene required for nodule differentiation and persistence of rhizobial infections. *Plant Physiology* **136**, 3682-3691.
- Laplaze L., ILucas M., Champion A. (2015): Rhizobial root hair infection requires auxin signaling. *Trends in Plant Science* **20**, 332-334.
- Lee J. S., Kuroha T., Hnilova M., Khatayevich D., Kanaoka M. M., McAbee J. M., Sarikaya M., Tamerler C., Torii K. U. (2012): Direct interaction of ligandreceptor pairs specifying stomatal patterning. *Genes & Development*. **26**, 126–36.

- Lee M. E., DeLoache W. C., Cervantes B., Dueber J. E. (2015): A Highly Characterized Yeast Toolkit for Modular, Multipart Assembly. *ACS Synthetic Biology* **4**, 975–986.
- Lehman, W.F., Marbie, V.I., Niclson, M.W. (1992): Registration of UC179, UC196, UC226, UC276 and UC296 verynon dormant alfalfa germplasm with varying levels of resistance to diseases and or insects. *Crop Science* **32**.
- Lerouge P., Roche P., Faucher C., Maillet F., Truchet G., Prome J.-C., Denarie J. (1990): Symbiotic host-specificity of Rhizobium meliloti is determined by a sulfated and acetylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**, 781±784.
- Leung J., Giraudat J. (1998): ABSCISIC ACID SIGNAL TRANSDUCTION. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 49, 199–222.
- Lévy J., Bres C., Geurts R., Chalhoub B., Kulikova O., Duc G., Journet E. P., Ane J. M., Lauber E., Bisseling T., Dénarié J., Rosenberg C., Debellé F. (2004): A putative Ca2+ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* 303, 1361–1364.
- Lhuissier F., De Ruijter N., Sieberer B., Esseling J. J., Emons A. (2001): Time Course of Cell Biological Events Evoked in Legume Root Hairs by Rhizobium Nod Factors: State of the Art. *Annals of Botany* **87**, 289-302.
- Li W., Xu H., Liu Y., Song L., Guo C., Shu Y. (2016): Bioinformatics Analysis of MAPKKK Family Genes in Medicago truncatula. *Genes (Basel)* **7**, 13.
- Limpens E., Ivanov S., van Esse W., Voets G., Fedorova E., Bisseling T. (2009): *Medicago* N2fixing symbiosomes acquire the endocytic identity marker Rab7 but delay the acquisition of vacuolar identity. *Plant Cell* 21, 2811-2828.
- Liu C. W., Murray J. D. (2016): The Role of Flavonoids in Nodulation Host-Range Specificity: An Update. *Plants* **5**(3), 1-13.
- Liu W., Kohlen W., Lillo A., Op den Camp R., Ivanov S., Hartog M., Limpens E., Jamil M., Smaczniak C., Kaufmann K., Yang W. C., Hooiveld G., Charnikhova T., Bouwmeester H. J., Bisseling T., Geurts R. (2011): Strigolactone biosynthesis in Medicago truncatula and rice requires the symbiotic GRAS-type transcription factors NSP1 and NSP2. *Plant Cell* 23, 3853–3865.
- Marc J. M., Granger C. L., Brincat J., Fischer D. D., Kao T., McCubbin A. G., Cyr R. J. (1998): A GFP–MAP4 reportergene for visualizing cortical microtubule rearrangements inliving epidermal cells. *Plant Cell* 10, 1927–1939.
- Marillonnet S., Grutzner, R. (2020): Synthetic DNA assembly using golden gate cloning and the hierarchical modular cloning pipeline. *Current Protocols in Molecular Biology* **130**, e115. doi: 10.1002/cpmb.115.
- Marillonnet S., Werner S. (2015): Assembly of Multigene Constructs Using Golden Gate Cloning. *Methods in Molecular Biology* **1321**, 269-284.
- Maunoury N., Redondo-Nieto M., Bourcy M., Van de Velde W., Alunni B., Laporte P., Durand P., Agier N., Marisa L., Vaubert D., Delacroix H., Duc G., Ratet P., Aggerbeck L., Kondorosi E., Mergaert P. (2010): Differentiation of symbiotic cells and endosymbionts in Medicago truncatula nodulation are coupled to two transcriptome-switches. *PLoS One* 4, e9519.
- Mergaert P., Uchiumi T., Alunni B., Evanno G., Cheron A., Catrice O., Mausset A. E., Barloy-Hubler F., Galibert F., Kondorosi A., Kondoros E. (2006): Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the Rhizobium -legume symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 5230–5235.
- Mielmann A. (2013): The utilisation of lucerne(Medicago sativa): a review. *British Food Journal* **115**, 590-600.
- Miyahara A., Richens J., Starker C., Morieri G., Smith L., Long S., Downie J. A., Oldroyd G. E. (2010): Conservation in function of a SCAR/WAVE component during infection thread and root hair growth in Medicago truncatula. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23, 1553-1562.
- Monahan-Giovanelli H., Pinedo C. A., Gage D. J. (2006): Architecture of infection thread networks in developing root nodules induced by the symbiotic bacterium Sinorhizobium meliloti on Medicago truncatula. *Plant Physiology* **140**, 661–670.

- Moore S. J., Lai H. E., Kelwick R., Chee S. M., Bell D., Polizzi K. M., Freemont P. S. (2016): EcoFlex: A Multifunctional MoClo Kit for E. coli Synthetic Biology. ACS Synthetic Biology 10, 1059–1069.
- Mortier V., Holsters M., Goormachtig S. (2012): Never too many? How legumes control nodule numbers. *Plant Cell and Environment* **35**, 245–258.
- 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. *Plant Journal* **20**, 381–388.
- Murata, T., Sano, T., Sasabe, M., Nonaka S., Higashiyama T., Hasezawa S., Machida Y., Hasebe M. (2013): Mechanism of microtubule array expansion in the cytokinetic phragmoplast. *Nature Communications* 4, 1967.
- Murray J. D., Karas B. J., Sato S., Tabata S., Amyot L., Szczyglowski, K. (2007): A cytokinin perception mutant colonized byRhizobium in the absence of nodule organogenesis. *Science* 315, 101–104.
- Mysore K. S., Bassuner B., Deng X. B., Darbinian N. S., Motchoulski A., Ream W., Gelvin S. B. (1998): Role of the Agrobacterium tumefaciens VirD2 protein in T-DNA transfer and integration. *Molecular Plant-Microbe Interactionser Act* 11, 668–683.
- Nakagami H., Kiegerl S., Hirt H. (2004): OMTK1, a novel MAPKKK, channels oxidative stress signaling through direct MAPK interaction. *The Journal of biological chemistry* 279, 26959-26966.
- Neupane A., Nepal M. P., Piya S., Benson B. V., MacArthur K. J. (2013): Evolutionary history of mitogen-activated protein kinase (MAPK) genes in *Lotus*, *Medicago*, and *Phaseolus*. *Plant Signaling & Behavior* **8**, e27189.
- Nishihama R., Ishikawa M., Araki S., Soyano T., Asada T., Machida Y. (2001): The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is a regulator of cell-plate formation in plant cytokinesis. *Genes & Development* **15**, 352-363.
- Nishihama R., Soyano T., Ishikawa M., Araki S., Tanaka H., Asada T., Irie K., Ito M., Terada M., Banno H., Yamazaki Y., Machida Y. (2002): Expansion of the cell plate in plant cytokinesis requires a kinesin-like protein/MAPKKK complex. *Cell* 109, 87-99.
- O'Brian M. R., Kirshbom P. M., Maier R. J. (1987): Bacterial heme synthesis is required for expression of the leghemoglobin holoprotein but not the apoprotein insoybean root nodules. *Proceedings National Academy of Sciences* **84** 8390-8393.
- Ogden A. J., Gargouri M., Park J., Gang D. R., Kahn M. L. (2017): Integrated analysis of zonespecific protein and metabolite profiles within nitrogen-fixing *Medicago truncatula-Sinorhizobium medicae* nodules. *PLoS ONE* **12**, e0180894.
- Oldroyd G. E. D., Engstrom E. M., Long S. R. (2001): Ethylene inhibits Nod factor signal transduction pathway of Medicago truncatula. *Plant Cell* **13**, 1835–1849.
- Oldroyd G. E. D., Murray J. D., Poole P. S., Downie J. A. (2011): The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. *Annual Review of Genetics* **45**, 119–144.
- Oldroyd G. E., Downie J. A. (2008): Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 519–546.
- Opdenakker K., Remans T., Vangronsveld J., Cuypers A. (2012): Mitogen-Activated Protein (MAP) kinases in plant metal stress, regulation and responses in comparison to other biotic and abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences* **13**, 7828–7853.
- Otegui M., Staehelin L. A. (2000): Cytokinesis in flowering plants: more than one way to divide a cell. *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 493-502.
- Ott T., van Dongen J.T., Gunther C., Krusell L., Desbrosses G., Vigeolas H., Bock V., Czechowski T., Geigenberger P., Udvardi M. K. (2005): Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current Biology* 15, 531-335.
- Ouaked F., Rozhon W., Lecourieux D., Hirt H. (2003): A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *The EMBO Journal* **22**, 1282-1288.
- Ovečka M., Takáč T., Komis G., *et al.* (2014): Salt-induced subcellular kinase relocation and seedling susceptibility caused by overexpression of Medicago SIMKK in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **65**, 2335-2350.

- Pan H. R., Oztas O., Zhang X. W., Wu X. Y., Stonoha C., Wang E., Wang B., Wang D. (2016): A symbiotic SNARE protein generated by alternative termination of transcription. *Nature Plants* 2, 197-208.
- Penas E., Go'mez R., Fri'as J., Vidal-Valverde C. (2009): Efficacy of combinations of highpressure treatment, temperature and antimicrobial compounds to improve themicrobiological quality of alfalfa seeds for sprout production. *Food Control* **20**, 31-39.
- Penmetsa R. V., Cook, D. R. (1997): A legume ethylene-insensitivemutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. *Science* **275**, 527–530.
- Perrine-Walker F. M., Lartaud M., Kouchi H., Ridge R. W. (2014): Microtubule array formation during root hair infection thread initiation and elongation in the *Mesorhizobium-Lotus* symbiosis. *Protoplasma* 251, 1099–1111.
- Portais J., Tavernier P., Gosselin I., Barbotin J. (1999): Cyclic organization of the carbohydrate metabolism in *Sinorhizobium meliloti. European Journal of Biochemistry* **265**, 473–480.
- Putnam D., Brummer J., Cash D., Gray A., Griggs T., Ottman M., Ray I., Riggs W., Smith M., Shewmaker G., Todd R., (2000): The importance of western alfalfa production. In: *Proc.* 29th National Alfalfa Symposium. Las Vegas, U.S.A., pp. 11–12.
- Qiu L., Lin J. S., Xu J., Sato S., Parniske M., Wang T. L., Downie J. A., Xie F. (2015): SCARN a novel class of SCAR protein that is required for root-hair infection during legume nodulation. *PLoS Genetics* 11, e1005623.
- Radović J., Sokolovic D., Lugic Z., Anđelković S., Štrbanović R. (2010): Genetic Diversity Within and Among Alfalfa Varieties for Some Traits. In: Sustainable use of Genetic Diversity in Forage and Turf Breeding. (Huyghe C. eds.) Springer, Dordrecht, Netherlands, 83-85.
- Radović, J., Sokolović, D. and Marković, J. (2009): Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnology in Animal Husbandry* **25**, 465–475.
- Radutoiu S., Madsen L. H., Madsen E. B., Felle H. H., Umehara Y., Gronlund M., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Sandal N. *et al.* (2003): Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* **425**, 585–592.
- Raja V., Majeed U., Kang H., Andrabi K. I., John R. (2017): Abiotic stress: interplay between ROS, hormones and MAPKs. *Environmental and Experimental Botany* **137**, 142–157.
- Rasmussen M. W., Roux M., Petersen M., Mundy J. (2012): MAP kinase cascades in *Arabidopsis* innate immunity. *Frontiers in Plant Science* **3**, 169.
- Reeve W., Chain P., O'Hara G., Ardley J., Nandesena K., et al. (2010): Complete genome sequence of the Medicago microsymbiont Ensifer (Sinorhizobium) medicae strain WSM419. Standards in Genomic Sciences 2, 77-86.
- Rodriguez M. C., Petersen M., and Mundy J. (2010): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 621–649.
- Ruiz B., Le Scornet A., Sauviac L., Rémy A., Bruand C., Meilhoc E. (2019): The Nitrate Assimilatory Pathway in *Sinorhizobium meliloti*: Contribution to NO Production. *Frontiers* in Microbiology. 10, 1526.
- Ryu H., Cho H., Choi D., Hwang I. (2012): Plant hormonal regulation of nitrogen-fixing nodule organogenesis. *Molecules and Cells* **34**, 117–126.
- Ryu H., Laffont C., Frugier F., Hwang I. (2017): MAP kinase-mediated negative regulation of symbiotic nodule formation in *Medicago truncatula*. *Molecules and Cells* **40**, 17–23.
- Sangra A., Shahin L., Dhir S. K. (2019): Long-Term Maintainable Somatic Embryogenesis System in Alfalfa (*Medicago sativa*) Using Leaf Explants: Embryogenic Sustainability Approach. *Plants* 8, 278.
- Sangwan V., Orvar B. L., Beyerly J., Hirt H., Dhindsa R. S. (2002): Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *Plant Journal* 31, 629-638.
- Santana M. A., Pihakaski-Maunsbach K., Sandal N., Marcker K. A., Smith A. G. (1998): Evidence that the plant host synthesizes the heme moiety of leghemoglobin in root nodules. *Plant Physiology* **116**, 1259-1269.
- Sasabe M., Machida Y. (2006): MAP65: a bridge linking a MAP kinase to microtubule turnover. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 563-570.

- Shaner N. C., Patterson G. H., Davidson W. D. (2007): Advances in fluorescent protein technology. *Journal of Cell Science* **120**, 4247-4260.
- Shen C., Du H., Chen Z., Lu H., Zhu F., Chen H., Meng X., Liu Q., Liu P., Zheng L., Li X., Dong J., Liang C., Wang T. (2020): The Chromosome-Level Genome Sequence of the Autotetraploid Alfalfa and Resequencing of Core Germplasms Provide Genomic Resources for Alfalfa Research. *Molecular Plant* 7, 1250-1261.
- Shetty K., McKersie B. D. (1993): Proline, thioproline and potassium mediated stimulation of somatic embryogenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L.) Plant Science **88**, 185–193.
- Scholtz G. D. J. (2008): A grading system for Medicago Sativa hay in South Africa. Ph.D. thesis, The University of the Free State, Bloemfontein, Republic of South Africa.
- Sieberer B. J., Timmers A. C. J., Emons, A.M.C. (2005): Nod factors alter the microtubule cytoskeleton in *Medicago truncatula* root hairs to allow root hair orientation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18, 1195–1204.
- Sieberer B. J., Timmers A. C. J., Lhuissier F. G. P., Emons A. M. C. (2002): Endoplasmic microtubules configure the subapical cytoplasm and are required for fast growth of *Medicago truncatula* root hairs. *Plant Physiology* **130**, 977–988.
- Smékalová V., Doskočilová A., Komis G., Šamaj J. (2014): Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology advances* 32, 2–11.
- Smit P., Limpens E., Geurts R., Fedorova E., Dolgikh E., Gough C., Bisseling, T. (2007): Medicago LYK3, an entry receptor inrhizobial nodulation factor signaling. *Plant Physiology* 145, 183–191.
- Soupène E., Foussard M., Boistard P., Truchet G., Batut J. (1995): Oxygen as a key developmental regulator of Rhizobium meliloti N2-fixation gene expression within the alfalfa root nodule. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 3759–3763.
- Soyano T., Nishihama R., Morikiyo K., Ishikawa M., Machida Y. (2003): NQK1/NtMEK1 is a MAPKK that acts in the NPK1 MAPKKKmediated MAPK cascade and is required for plant cytokinesis. *Genes & Development* 17, 1055-1067.
- Spaepen S. Vanderleyden J. (2011): Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**, 1-13.
- Spaink H. P., Okker R. J. H., Wijffelman C. A., Tak T., Goosenderoo L., Pees E., Vanbrussel A. A. N., Lugtenberg B. J. J. (1989): Symbiotic properties of rhizobia containing a flavonoidindependent hybrid nodD product. *Journal of Bacteriology* **171**, 4045–4053.
- Staehelin L. A., Hepler P. K. (1996): Cytokinesis in higher plants. Cell 84, 821-824.
- Staiger, C. J., Blanchoin, L. (2006): Actin dynamics: old friends with new stories. *Curr. Opin. Plant Biology* **9**, 554–562.
- Straube A., Brill M., Oakley B. R., Horio T., Steinberg G. (2003): Microtubule organization requires cell cycle-dependent nucleation at dispersed cytoplasmic sites: polar and perinuclear microtubule organizing centers in the plantpathogenUstilago maydis. *Molecular Biology of the Cell* 14, 642–657.
- Su J., Xu J., Zhang S. (2015): RACK1, scaffolding a heterotrimeric G protein and a MAPK cascade. *Trends Plant Sci*ence **20**, 405–407.
- Suzaki T., Yano K., Ito M., Umehara Y., Suganuma N., Kawaguchi M. (2012): Positive and negative regulation of cortical cell division during root nodule development in Lotus japonicus is accompanied by auxin response. *Development* 139, 3997–4006.
- Šamaj J., Ovecka M., Hlavacka A., Lecourieux F., Meskiene I., Lichtscheidl I., Lenart P., Salaj J., Volkmann D., Bögre L., Baluska F., Hirt H. (2002): Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *The EMBO Journal* 21, 3296-3306.
- Šamajová O., Plíhal O., Al-Yousif M., Hirt H., Šamaj J. (2013): Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. *Biotechnology Advances* 31, 118-28.
- Takahashi Y., Soyano T., Sasabe M., Machida Y. (2004): A MAP kinase cascade that controls plant cytokinesis. *Journal of Biochemistry* **136**, 127-132.

- Tanaka H., Ishikawa M., Kitamura S., Takahashi Y., Soyano T.,nMachida C., Machida Y. (2004): The AtNACK1/HINKEL and STUD/ TETRASPORE/AtNACK2 genes, which encode functionally redundant kinesins, are essential for cytokinesis in Arabidopsis. *Genes Cells* 9, 1199-1211.
- Tang H., Krishnakumar V., Bidwell S., Rosen B., Chan A., Zhou S., Gentzbittel L., Childs K. L., Yandell M., Gundlach H., Mayer K. F., Schwartz D. C., Town C. D. (2014): An improved genome release (version Mt4.0) for the model legume Medicago truncatula., *BMC genomics* 15, 1-14.
- Tena G., Asai T., Chiu W. L., Sheen J. (2001): Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 392-400.
- Tian L., Brown D. C. W., Watson E. (2002): Continuous long-term somatic embryogenesis in alfalfa. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* **38**, 279–284.
- Timmers A. C. J. (2008): The role of the plant cytoskeleton in the interaction between legumes and rhizobia. *Journal of Microscopy* **231**, 247–256.
- Timmers A. C. J., Auriac M.-C., Truchet G. (1999): Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* **126**, 3617–3628.
- Timmers A. C. J., Vallotton P., Heym C., Menzel D. (2007): Microtubule dynamics in root hairs of *Medicago truncatula*. *European Journal of Cell Biology* **86**, 69–83.
- Tirichine L., Sandal N., Madsen L. H., Radutoiu S., Albrektsen A. S., Sato S., Asamizu E., Tabata S., Stougaard J. (2007): A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous rootnodule organogenesis. *Science* 315, 104–107.
- Tsyganov V. E., Morzhina E. V., Stefanov S. Y., Borisov A. Y., Lebsky V. K., Tikhonovich I.A. (1998) The pea (Pisum sativum L.) genes sym33 and sym40 control infection thread formation and root nodule function. *Molecular and General Genetics* 256, 491–503.
- Udvardi M., Poole P.S. (2013): Transport and Metabolism in Legume-Rhizobia Symbioses. Annual Review of Plant Biology 64, 781–805.
- Van de Velde W., Guerra J. C. P., De Keyser A., De Rycke R., Rombauts S., Maunoury N., et al. (2006): Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in Medicago truncatula. *Plant Physiology* 141, 711–720.
- Van de Velde W., Zehirov G., Szatmari A., Debreczeny M., Ishihara H., Kevei Z., Farkas A., Mikulass K., Nagy A., Tiricz H. *et al* (2010): Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science* 327, 1122–1126.
- Vernie T., Moreau S., De Billy F., Plet J., Combier J. P., Rogers C., Oldroyd G., Frugier F., Niebel A., Gamas P. (2008): EFD is an ERF transcription factor involved in the control of nodule number and differentiation in Medicago truncatula. *Plant Cell* 20, 2696–2713.
- Voigt B., Timmers A. C. J., Samaj J., Muller J., Baluska F., Menzel D. (2005): GFP-FABD2 fusion construct allows in vivo visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of *Arabidopsis* seedlings. *European Journal of Cell Biology* 84, 595–608.
- Voroshilova V. A., Boesten B., Tsyganov V. E., Borisov A. Y., Tikhonovich I. A., Priefer U. B. (2001): Effect of mutations in Pisum sativum L. genes (sym13, sym31, sym33, sym40) blocking different stages of nodule development on the expression of late symbiotic genes in Rhizobium leguminosarum bv. viciae. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 14, 471–476.
- Wasson A. P., Pellerone F. I., Mathesius U. (2006): Silencing the flavonoid pathway in Medicago truncatula inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia. *Plant Cell* 18, 1617–1629.
- White J., Prell J., James E. K., Poole P. (2007): Nutrient sharing between symbionts. *Plant Physiology* **144**, 604-614.
- Xiao T.T., Schilderink S., Moling S., Deinum E.E., Kondorosi E., Franssen H., Kulikova O., Niebel A., Bisseling T. (2014): Fate map of Medicago truncatula root nodules. *Development* 141, 3517–3528.
- Yano K., Yoshida S., Müller J., et al. (2008): CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA.;105, 20540– 20545.

- Young N. D., Debelle F., Oldroyd G. E., Geurts R., Cannon S. B., Udvardi M. K., Benedito V. A., Mayer K. F., Gouzy J., Schoof H., *et al.* (2011): The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* 480, 520–524.
- Zhang S., Wang J. (2020): One-Day TALEN Assembly Protocol and a Dual-Tagging System for Genome Editing. ACS Omega 5, 19702–19714.
- 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, 1049–1059.
- Zhao H., Li M., Fang K., Chen W., Wang J. (2012): In silico insights into the symbiotic nitrogen fixation in Sinorhizobium meliloti via metabolic reconstruction. *PloS one* **7**, 1-9.
- Zipfel C., Oldroyd G. E. (2017): Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature* **543**, 328-336.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| 2,4-D | kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová |
|--------------------------------|--|
| 3U | 3'nepřekládáná oblast |
| 5U | 5'nepřekládáná oblast |
| ABA | abcisová kyselina |
| ABD2 | aktin-vážící doména 2 |
| ACC 1 | aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina |
| AF | aktinová filamenta |
| amp | ampicilin |
| ANP1, 2, 3 | MAP3K, součástí kaskády aktivující MAP65 |
| ARF | aktivátor auxin odpovědných genů |
| bar | gen kódující fosfinotricin N-acetyltransferasu |
| CADL | vyšlechtěná diploidní M. sativa |
| CaMV | virus mozaiky květáku |
| CCaMK | Ca ²⁺ /kalmodulin-dependentní protein kináza |
| CDPK | vápník-dependentní protein kináza |
| CDS | kódující sekvence genu |
| CRE1 | cytokininový receptor |
| СТ | C-terminální značka |
| CTR 1 | receptorová MAP3 kináza |
| dNTPs | deoxynukleotidy |
| EDTA | kyselina ethylendiamintetraoctová |
| EF1α | elongační faktor 1 alfa, protein důležitý při translaci |
| EIN2/3 | ethylen insenzitivní protein 2/3 |
| EMT | endoplasmatické mikrotubuly |
| ERN1 | transkrinční faktor inaktivován MPK 3/6 během nodulace |
| ETR1 | ethylenový recentor |
| GFP | zelený fluorescenční protein |
| GGC | Golden Gate klonování |
| НАМК | tenlem aktivovaná MAPK |
| hvo | hygromycin |
| kan | kanamyein |
| IR | lysogen broth médium |
| | histidinová kináza lotosu |
| MAD65 1 | mikrotubuly vážící protoin stabilizuja mikrotubuly |
| MAPUJ-1 MADV | mikrotubuly vaziel protein, stabilizuje mikrotubuly |
| MATK $MADVV (MAD2V)$ | mitogen aktivovana protein kináza |
| MAPKK (MAP2K) $MADVVV (MAD2V)$ | mitogen-aktivovana protein kináza kináza |
| MAPARA (MAPSA) | milogen-aktivovana protein kinaza kinaza kinaza |
| | mikrotuduly-vazici domena mito con altivovaná protoin lináza lináza lináza |
| MERN | lintogen-aktivovana protein kinaza kinaza kinaza |
| MES MEVI 2 4 5 | kysenna 2-(N-morphonno)etnanesunonova mite zen eltimetria limétre limétre $1 - 2 - 4 - 5 (A - 4)$ |
| MKK1, 2, 4, 3 | mitogen-aktivovana protein kinaza kinaza 1, 2, 4, 5 (A. <i>inatiana</i>) |
| MMKZ, MMK3 | Medicago MAPK 2, 3 |
| MPK5, MPK6, MPK13 | initogen-aktivovana protein Kinaza 3, 6, 13 |
| MKNA | mediatorova KNA |
| MS | Murashige a Skoog medium |
| MT NA CH DOD | mikrotubuly |
| NACK-PQR | signalni draha vedouci k aktivaci MAP65-1 u N. benthamiana |
| NCR | nodul-specifické proteiny bohaté na cystein |

| NPK1 | MAP3K asociovaná s jádrem a fragmoplastem |
|---------|--|
| NSP1 | transkripční faktor účastnící se signalingu během nodulace |
| NT | N-terminální značka |
| OD | optická denzita |
| OMTK1 | MAP3K aktivovaná oxidativním stresem |
| PBM | peribakteroidní membrána |
| PCR | polymerázová řetězová reakce |
| PPT | fosfinotricin |
| PRKK | patogenem indukovaná MAPKK |
| rcf | relativní centrifugační síla |
| RFP | červený fluorescenční protein |
| RNasa A | ribonukleasa A |
| ROS | reaktivní formy kyslíku |
| RPM | otáčky za minutu |
| RSY | kultivar M. sativa Regen SY |
| SAMK | stresem aktivovaná MAPK |
| SIMK | stresem indukovaná MAPK |
| SIMKK | stresem indukovaná MAPKK |
| spe | spectinomycin |
| TUA6 | tubulin alfa 6 |
| UV | ultrafialové záření |

9. PŘÍLOHY

Příloha č. 1 – Mapy klonovaných modulů úrovně 0

V mapách modulů úrovně 0 jsou znázorněny místa, kde došlo k ligaci inzertu do akceptoru úrovně 0, a v případě sekvencí *TUA6* a *tagRFP-T* také místa ligace domestikovaných fragmentů. Dále jsou zobrazena restrikční místa enzymů, které byly využity pro ověření správnosti klonování (PvuI, NdeI, HindIII). Uvedené jsou rovněž rozpoznávací sekvence enzymu BsaI, prostřednictvím kterých byly klonované moduly úrovně 1.



Obr. P1: Promotor *EF1α* ligován s akceptorem 0 (**A**) pICH41295 a (**B**) pAGM1251.



Obr. P2: Gen kódující fluorescentní protein EGFP ligován s akceptorem 0 (**A**) pAGM1301 a (**B**) pAGM1276.



Obr. P3: Domestikovaný gen pro fluorescentní protein tagRFP-T ligován s akceptorem 0 (A) pAGM1301 a (B) pAGM1276.



Obr. P4: Gen AtTUA6 po domestikaci ligován s akceptorem (A) pICH1287 a (B) pICH41308.

Příloha č. 2 – Mapy klonovaných modulů úrovně 1

V mapách jsou znázorněny místa, kde došlo k ligaci inzertů z připravených modulů 0 do akceptorů úrovně 1. Dále jsou zobrazena restrikční místa pro enzymy, které byly využity pro ověření správnosti klonování (PvuI, BamHI, Alw44I, NdeI, EcoRI). Prostřednictvím uvedených restrikčních míst enzymu BpiI jsou transkripční jednotky ligované dále do multigenových konstruktů (modulů úrovně 2).



Obr. P5: Transkripční jednotka *p35S::AtTUA6:EGFP* naklonovaná do akceptoru úrovně 1 pICH47742.



Obr. P6: Transkripční jednotka *p35S::AtTUA6:tagRFP-T* naklonovaná do akceptoru úrovně 1 pICH47742



Obr. P7: Transkripční jednotka *pEF1a::AtTUA6:EGFP* naklonovaná do akceptoru pICH47742.



Obr. P8: Transkripční jednotka *pEF1a::EGFP:AtTUA6* naklonovaná do akceptoru pICH47742.



Obr. P9: Transkripční jednotka *pEF1a::AtTUA6:tagRFP-T* naklonovaná do akceptoru pICH47742.



Obr. P10: Transkripční jednotka *pEF1a::tagRFP-T:AtTUA6* naklonovaná do akceptoru pICH47742.



Obr. P11: Transkripční jednotka *pNOS::bar:tNOS* naklonovaná do akceptoru úrovně 1 pICH4780 pro reverzní pozici 1 akceptorovému vektoru úrovně 2.