

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



**Príprava vektorov pre CRISPR/Cas9 editáciu *SIMK*
génu a stabilná transformácia lucerny siatej
(*Medicago sativa* L.)**

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor: **Peter Šály**
Študijný program: B0512A130007 – Biotechnologie a genové inženýrství
Študijný obor: Biotechnologie a genové inženýrství
Forma štúdia: Prezenčná
Vedúci práce: **Mgr. Miroslava Hrbáčková, Ph.D.**
Rok: 2022

Prehlásenie

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

V Olomouci dňa

.....

Podpis študenta

Pod'akovanie

„Najväčšie pod'akovanie patrí mojej školiteľke bakalárskej práce Mgr. Miroslave Hrbáčkovej, Ph.D. za odborné vedenie, trpezlivosť, vynaloženú ochotu, vecné pripomienky a za všetok strávený čas pri vypracovaní mojej bakalárskej práce. Pod'akovanie taktiež patrí všetkým zamestnancom Katedry biotechnológií za príjemný prístup a ochotu vždy pomôcť.“

Táto práca bola podporená Európskym fondom pre regionálny rozvoj (ERDF), projekt č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000827, „Rostliny jako prostředek udržitelného globálního rozvoje“ a študentským projektom Internej grantovej agentúry (IGA) IGA_PrF_2021_029 Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Bibliografická identifikace

Meno a priezvisko autora	Peter Šály
Názov práce	Príprava vektorov pre CRISPR/Cas9 editáciu <i>SIMK</i> génu a stabilná transformácia lucerny siatej (<i>Medicago sativa</i> L.)
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Katedra biotechnológií
Vedúci práce	Mgr. Miroslava Hrbáčková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2022

Abstrakt

Prokaryotické organizmy už dlhú dobu využívajú CRISPR/Cas ako silnú a účinnú stratégiu v obrane proti vírusovým útočníkom. CRISPR/Cas9 technológiu je možné využiť k modifikácii genómových sekvencií na dosiahnutie požadovaných vlastností v rôznych organizmoch, vrátane rastlín. Úspešná aplikácia a validácia CRISPR/Cas9 systému v zložitom genóme, ako má lucerna siata, povedie k veľkému pokroku v zlepšovaní tejto plodiny. Lucerna siata (*Medicago sativa* L.) je významná kultúrna plodina pestovaná pre jej vysoké nutričné hodnoty a prirodzené obohacovanie pôdy. V teoretickej časti bakalárskej práce je predstavená táto hospodársky významná rastlina s dôrazom na jej regeneráciu pomocou somatickej embryogenézy. Taktiež sú charakterizované mitogénom-aktivované proteínkinázy (MAPK) a spôsob ich aktivácie a inaktivácie. Bližší záujem je daný na MAPK objavené u rodu *Medicago*. U lucerny siatej bola identifikovaná SIMK ako MAPK indukovaná soľným stresom a elicitorami. MAPK sú signálne molekuly zabezpečujúce reakciu rastliny na biotický a abiotický stres. V poslednej časti teórie je predstavená CRISPR/Cas9 metóda. Je ukázaný prehľad histórie, od objavu palindromatických sekvencií až po modernú metódu na cielenú editáciu genetickej informácie, ktorá bola napokon ocenená Nobelovou cenou za chémiu. V neposlednom rade je zhrnutý prehľad použitia CRISPR/Cas9 u lucerny siatej. Hlavným cieľom bakalárskej práce bolo navrhnúť a pripraviť CRISPR/Cas9 konštrukty na vyradenie *SIMK* génu. Tieto konštrukty boli následne zaklonované do vhodných vektorov a transformované do chemokompetentných baktérií *Escherichia coli* a *Agrobacterium tumefaciens*. Rastliny lucerny boli stabilne transformované pripravenými konštruktami a prvé rastliny boli overené pomocou PCR genotypovania so špecifickými primermi.

Kľúčové slová	<i>Medicago sativa</i> , somatická embryogenéza, MAPK, SIMK, CRISPR/Cas9, stabilná transformácia
Počet strán	81
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Peter Šály
Title	Preparation of CRISPR/Cas9 vectors for editing <i>SIMK</i> gene and stable transformation of alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.)
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biotechnology
Supervisor	Mgr. Miroslava Hrbáčková, Ph.D.
The year of presentation	2022

Abstract

Prokaryotic organisms have long used CRISPR/Cas as a powerful and effective strategy in defending against virus attackers. CRISPR/Cas9 can be used to modify genomic sequences to achieve desired properties in a variety of organisms, including plants. Successful application and validation of the CRISPR/Cas9 system in a complex genome, such as the alfalfa, will lead to significant progress in improving this crop. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) is an important crop grown for its high nutritional values and natural soil enrichment. The theoretical part of the bachelor thesis presents this economically important plant, emphasizing its regeneration by somatic embryogenesis. Mitogen-active protein kinases (MAPKs) and their process of activation and inactivation are also characterized. Closer interest is given to MAPKs discovered in the genus *Medicago*. In alfalfa, SIMK was identified as MAPK induced by salt stress and elicitors. MAPKs are signaling molecules involved in plant response to biotic and abiotic stresses. In the last part of the theory, the CRISPR/Cas9 method is introduced. An overview of history is shown, from the discovery of palindromic sequences to a modern method for targeted modification of genetic information, which was eventually awarded the Nobel Prize in Chemistry. Finally, a summary of the use of CRISPR/Cas9 in alfalfa is summarized. The main goal of the bachelor thesis was to design and prepare CRISPR/Cas9 constructs to knockout the *SIMK* gene. These constructs were then cloned into appropriate vectors and transformed into the chemocompetent bacteria *Escherichia coli* and *Agrobacterium tumefaciens*. Alfalfa was stably transformed with the prepared constructs and the first plants were verified by PCR genotyping with specific primers.

Keywords	<i>Medicago sativa</i> , somatic embryogenesis, MAPK, SIMK, CRISPR/Cas9, stable transformation
Number of pages	81
Number of appendices	0
Language	Slovak

OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY.....	2
2.1	<i>Medicago sativa</i> ako modelový organizmus.....	2
2.1.1	Somatická embryogenéza.....	3
2.1.1.1	Nepriama somatická embryogenéza.....	4
2.1.1.2	Priama somatická embryogenéza.....	5
2.2	Mitogénom-aktivované proteínkinázy.....	6
2.2.1	Základná charakteristika mitogénom-aktivovaných proteínkináz.....	6
2.2.2	Aktivácia signálnej dráhy.....	8
2.2.3	Inaktivácia signálnej dráhy.....	11
2.2.4	Mitogénom-aktivované proteínkinázy u <i>Medicago truncatula</i>	11
2.2.5	Mitogénom-aktivované proteínkinázy u <i>Medicago sativa</i>	12
2.3	Technológia CRISPR/Cas9.....	14
2.3.1	Základná charakteristika CRISPR/Cas9.....	14
2.3.1.1	Využitie CRISPR/Cas9 technológií v poľnohospodárstve.....	18
2.3.2	História CRISPR/Cas9.....	18
2.3.3	CRISPR/Cas9 u <i>Medicago sativa</i>	20
2.3.3.1	Použitie single guide CRISPR/Cas9 systému (sgCRISPR/Cas9).....	20
2.3.3.2	Aplikovanie multiplex guide RNA-CRISPR/Cas9 systému.....	21
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	23
3.1	Materiál.....	23
3.1.1	Bakteriálny materiál.....	23
3.1.2	Rastlinný materiál.....	23
3.1.3	Použité plazmidy pre Multisite Gateway® klonovací systém.....	23
3.1.4	Chemikálie.....	24
3.1.5	Kultivačné média.....	24
3.1.6	Roztoky a pufry.....	28
3.1.7	Prístrojové vybavenie a komerčné kity.....	31
3.1.8	Software.....	32
3.2	Metódy.....	32
3.2.1	Príprava chemokompetentných buniek.....	32
3.2.1.1	<i>Escherichia coli</i> One Shot™ TOP10 chemokompetentné bunky.....	32
3.2.1.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101 chemokompetentné bunky.....	33
3.2.2	Metodický postup pri príprave konštruktov pre CRISPR/Cas9 mutagenézu <i>SIMK</i> génu.....	34
3.2.2.1	Návrh navádzacích sekvencií gRNA.....	34
3.2.2.2	Dimerizácia navádzacích gRNA sekvencií (primer annealing).....	36
3.2.2.3	Restrikčné štiepenie vstupného vektora pEn-Chimera.....	36
3.2.2.4	DNA agarózová elektroforéza.....	37
3.2.2.5	Extrakcia DNA z agarózového gélu.....	38
3.2.2.6	Ligácia gRNA do rozštiepeného vstupného vektora pEn-Chimera...38	
3.2.2.7	Transformácia <i>Escherichia coli</i> vstupným vektorom pEn-Chimera s inzertom.....	39
3.2.2.8	Metóda colony PCR.....	39
3.2.2.9	Kultivácia pozitívnych transformovaných kolónií <i>Escherichia coli</i> so vstupným vektorom pEn-Chimera s inzertom.....	40
3.2.2.10	Izolácia plazmidovej DNA pomocou miniprepu P1P2P3.....	40
3.2.2.11	Sekvenovanie vstupného vektora pEn-Chimera s inzertom.....	41

3.2.2.12	Tvorba bakteriálnych konzerv	42
3.2.2.13	Príprava finálneho destinačného vektora pDe-Cas9 s inzertom	42
3.2.2.14	Transformácia <i>Escherichia coli</i> destinačným vektorom pDe-Cas9 s inzertom	43
3.2.2.15	Metóda colony PCR a DNA agarózová elektroforéza.....	44
3.2.2.16	Izolácia plazmidovej DNA pomocou QIAprep Spin Miniprep Kitu.....	45
3.2.2.17	Sekvenovanie destinačného vektora pDe-Cas9 s inzertom	45
3.2.2.18	Tvorba bakteriálnych konzerv	45
3.2.2.19	Transformácia <i>Agrobacterium tumefaciens</i> destinačným vektorom pDe-Cas9 s inzertom	46
3.2.2.20	Metóda colony PCR, DNA agarózová elektroforéza a tvorba bakteriálnych konzerv	46
3.2.3	Stabilná transformácia lucerny siatej s využitím somatickej embryogenézy.....	47
3.2.3.1	Sterilizácia rastlinného materiálu lucerny siatej	47
3.2.3.2	Stabilná transformácia explantátov lucerny siatej	47
3.2.3.3	Kultivácia lucerny siatej na B5H médiu	48
3.2.3.4	Kultivácia lucerny siatej na B50 médiu.....	48
3.2.3.5	Kultivácia lucerny siatej na MMS médiu	48
3.2.3.6	Kultivácia lucerny siatej na MS médiu.....	48
3.2.4	PCR genotypovanie transgénnych rastlín lucerny siatej.....	48
4	VÝSLEDKY	50
4.1	Príprava konštruktov pre CRISPR/Cas9 editáciu <i>SIMK</i> génu.....	50
4.1.1	<i>In silico</i> príprava vektorových máp nesúcich navádzacie sekvencie gRNA	50
4.1.1.1	Vstupný vektor pEn-Chimera s inzertom	51
4.1.1.2	Destinačný vektor pDe-Cas9 s inzertom	52
4.1.2	Overenie vstupného vektora a destinačného vektora pomocou restričného štiepenia.....	53
4.1.3	Príprava vstupného vektora pEn-Chimera s inzertom	54
4.1.3.1	Overenie bakteriálnych kolónií <i>Escherichia coli</i> transformovaných vstupným vektorom s inzertom.....	55
4.1.3.2	Sekvenovanie vstupných vektorov pEn-Chimera s inzertom.....	56
4.1.4	Príprava destinačného vektora pDe-Cas9 s inzertom.....	57
4.1.4.1	Overenie bakteriálnych kolónií <i>Escherichia coli</i> transformovaných destinačným vektorom s inzertom	57
4.1.4.2	Sekvenovanie destinačných vektorov pDe-Cas9 s inzertom	58
4.1.4.3	Overenie bakteriálnych kolónií <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformovaných destinačným vektorom s inzertom	59
4.2	Stabilná transformácia lucerny siatej.....	60
4.2.1	Genotypovanie rastlín lucerny siatej	61
5	DISKUSIA.....	62
6	ZÁVER.....	66
7	LITERATÚRA	67
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....	79

CIELE PRÁCE

Teoretická časť:

- Spracovanie literárnej rešerše na tému *Medicago sativa* ako modelový organizmus, MAP kinázová signalizácia a editácia genómu pomocou CRISPR/Cas9 technológií.

Praktická časť:

- CRISPR/Cas9 metóda (návrh primerov na editovanie *SIMK* génu, ligácia, colony PCR, transformácia *Agrobacterium tumefaciens*, klonovanie pomocou Multisite Gateway[®] Cloning kitu).
- Stabilná transformácia *Medicago sativa*.
- Vyhodnotenie získaných výsledkov a spísanie experimentálnej časti bakalárskej práce.

1 ÚVOD

Lucerna siata ako hospodársky významná plodina, nazývaná aj kráľovná krmovín, je najviac produkovanou strukovinou vo svete s ekonomickým významom predovšetkým v USA (Gao et al., 2018; Wolabu et al., 2020). Vzniká záujem o vylepšenie a editáciu tejto plodiny s cieľom dosiahnuť vyššieho výnosu a kvality. K tomu by mohla napomôcť CRISPR/Cas9 technológia, ktorá sa ukázala byť prínosná aj pri iných hospodársky významných plodinách.

Baktérie a archea si v snahe chrániť sa pred napadnutím baktériofágmi vyvinuli systém na rozpoznávanie a ničenie cudzorodej DNA, ktorý im slúži ako adaptívna imunita. Modifikáciu tohto systému dnes poznáme pod názvom CRISPR/Cas9. Táto metóda za posledných 10 rokov, od jej objavu v roku 2012, zaznamenala veľký prelom v cielenej editácii genetickej informácie a našla si široké uplatnenie vo vedeckom svete. V medicíne môže slúžiť na liečbu Huntingtonovej choroby (Shin et al., 2016) alebo ako génová terapia na liečbu transfúzne závislej β -talasémie a kosáčikovej anémie (Frangoul et al., 2021). V poľnohospodárstve prispela k vylepšeniu plodín, kedy bol CRISPR/Cas9 systém úspešne aplikovaný na mnohých významných plodinách, ako je ryža (Jun et al., 2019), pšenica (Upadhyay et al., 2013), sója (Jacobs et al., 2015) a kukurica (Liang et al., 2014).

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo pripraviť vektory pre CRISPR/Cas9 editáciu *SIMK* génu u lucerny siatej. *SIMK* proteín patrí do rodiny mitogénom-aktivovaných proteínkináz, skrátene MAPK. Jedná sa o signálne molekuly aktivované fosforyláciou, ktoré sú zodpovedné za odpoveď bunky na stimuly spôsobené abiotickými alebo biotickými stresmi. Aktiváciou signálnych dráh dochádza k regulácii bunkových procesov, ako sú kontrola génovej expzie, diferenciácia alebo proliferácia. *SIMK* je stresom indukovaná MAPK, ktorá je zapojená do rôznych odpovedí lucerny siatej na stres. Môže sa jednať o stres spôsobený ťažkými kovmi (Jonak et al., 2004), zasolením alebo hyperosmotickým stresom (Munnik et al., 1999; Cardinale et al., 2000, 2002).

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 *Medicago sativa* ako modelový organizmus

Lucerna siata (*Medicago sativa* L.) je viacročná dvojklíčnolistová rastlina patriaca medzi strukoviny z čeľade bôbovítých (*Fabaceae*). Prvá kultivovaná forma zrejme pochádza zo západnej Perzie a rozšírila sa do mnohých regiónov v Európe, Amerike a Ázii (Rashmi et al., 1997). Strukoviny sú všeobecne dôležitými kŕmnymi plodinami, pretože sú schopné produkovať vysoké výnosy kvalitného krmiva (Buxton & Harrison, 2015). Rod *Medicago* zahŕňa jednoróčné aj trvalé druhy rastlín. Lucerna siata je trváca kŕmna strukovina s hlbokým koreňovým systémom, ktorý chráni pred eróziou pôdy alebo kontamináciou povrchových a podzemných vôd (Radović et al., 2009; Kumar et al., 2018).

Významným znakom lucerny je jej nenáročnosť pri pestovaní, tolerancia voči environmentálnym stresom (Radović et al., 2009), ale hlavne symbióza s pôdnou baktériou *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* fixujúcou vzdušný dusík, čo vedie k prirodzenému obohacovaniu pôdy (Babić et al., 2008). Má vysoký obsah proteínov, minerálov, antioxidantov, vitamínov (A, C, K, E) a enzýmov (amyláza, peroxidáza invertáza, koaguláza, erepsín, pektináza; Bora & Sharma, 2011). Okrem toho sa používa k výrobe farmaceutických zlúčenín a priemyselných enzýmov (Kineman et al., 2010; Kumar et al., 2018).

Lucerna siata je tetraploidný organizmus s ôsmimi chromozómami ($2n = 4x = 32$) s veľkosťou 800 – 1000 Mbp (Blondon et al., 1994), čo prispieva k veľkej genetickej diverzite. Genóm lucerny je intenzívne študovaný, vrátane abiotických a biotických odpovedí lucerny na stres s využitím moderných genomických, proteomických a metabolomických prístupov (Hrbáčková et al., 2020).

Lucerna patrí medzi rastliny, ktoré sú často využívané na skúmanie embryogenézy rastlín pomocou somatickej embryogenézy (Stuart & Strickland, 1984; Györgyey et al., 1991). Použitím inhibítorov biosyntézy, gibberelínov, sa zistilo, že tieto rastlinné hormóny zohrávajú úlohu pri indukcii a vývine embrya (Ruduš et al., 2002). Oxid dusný (NO), ako signálna molekula, má vplyv na bunkové delenie a embryogenézu rastlín za prítomnosti auxínu (Ötvös et al., 2005). Počas skorej fázy somatickej embryogenézy lucerny sa ukázala aktivácia Kalmodulínu podobnej doménovej proteínkinázy (Calmodulin like domain protein kinase; CPK) vyvolaná auxínom

(Davletova et al., 2001). Taktiež sa lucerna využíva na pozorovanie a výskum transformovaných sekundárnych embryí (Uzelac et al., 2007).

2.1.1 Somatická embryogenéza

Somatická embryogenéza (SE) je regeneračný proces, pri ktorom sú somatické bunky indukované v podmienkach *in vitro*, aby získali embryogénny potenciál (Zimmerman, 1993). Vývojové štádia somatického embrya sú podobné tým, aké pozorujeme pri vývoji zygoty. Z proembryogénneho zhluku buniek vzniká globulárne embryo, ktoré prechádza do srdcovitého štádia, to dá následne vzniknúť torpédovitému embryu, až nakoniec vzniká embryo s viditeľnými kľúčnymi listami (Quiroz-Figueroa et al., 2006; Sangra et al., 2019).

SE predstavuje hlavný spôsob regenerácie pre mnohé rastlinné druhy (Lakshmanan & Taji, 2000; Guan et al., 2016; Sangra et al., 2019). Poskytuje dôležitý nástroj pri genetickej modifikácii rastlín s využitím transformácie sprostredkovej pomocou *Agrobacterium tumefaciens* (Rai et al., 2010). Prvú úspešnú nezávislú SE vykonali Steward et al. (1958) a Reinert (1958) na mrkve obyčajnej (*Daucus carota*). V prírode sa SE prirodzene vyskytuje u sukulentnej rastliny *Kalanchoë daigremontiana*, na listoch ktorej vyrastajú malé semenáčky (Garcês et al., 2007).

Regenerácia bôbových rastlín SE sa líši použitým explantátom a rozličnou potrebou rastových regulátorov medzi jednotlivými druhmi (Lakshmanan & Taji, 2000). Je známe, že lucerna siata a ďalšie druhy z rodu *Medicago* môžu byť regenerované prostredníctvom SE. Pre propagáciu lucerny siatej existuje niekoľko úspešných *in vitro* regeneračných protokolov (Saunders & Bingham, 1972; Bingham et al., 1975; Mitten et al., 1984; Shetty & McKersie, 1993). Tvorba novej rastliny pomocou SE zahŕňa päť nasledovných krokov: (1) iniciácia embryonálnej kultúry na médiu s požadovanými rastovými regulátormi, ako je auxín alebo cytokinín; (2) proliferácia na tuhom alebo tekutom médiu s požadovanými rastovými regulátormi; (3) prematurácia odobratím rastových regulátorov, čo stimuluje formovanie a vývoj embrya; (4) maturácia pridaním kyseliny abscisovej (ABA) a/alebo znížením osmotického potenciálu; (5) vývoj rastlín na médiu bez pridaných rastových regulátorov (Von Arnold et al., 2002). Vývoj somatického embrya *in vitro* závisí na mnohých faktoroch, ako je genotyp, druh a stav rastliny, ale aj na vonkajších podmienkach, ako je teplota a svetlo (Gaj, 2004).

Existujú dva spôsoby SE: nepriama somatická embryogenéza (NSE) a priama somatická embryogenéza (PSE). NSE sa vyznačuje tvorbou kalusu, suspenzie alebo kultúry protoplastov, zatiaľ čo PSE vzniká z organizovaných štruktúr ako sú kmeňové bunky alebo bunky v okolí zygoty (Williams & Maheswaran, 1986). Taktiež rozdiel môžeme hľadať v epigenetickom stave buniek. Bunky, ktoré sú embryonické alebo sa nachádzajú blízko embrya, podliehajú ľahšie SE ako diferencované vegetatívne bunky (Bhojwani, 1990).

2.1.1.1 Nepriama somatická embryogenéza

Klasickým poznávacím znakom NSE je vznik embryogénneho kalusu (Von Arnold et al., 2002). Okrem vytvorenia kalusu, je dôležitým krokom NSE vytvorenie proembryogénnej hmoty, ktorá je charakteristická neorganizovanou štruktúrou buniek obsahujúce škrobové zrná (Halperin, 1966). Bolo zistené, že mitotická aktivita úzko súvisí s množstvom škrobových zrn v cytoplazme (Atmane et al., 2000). V porovnaní s ostatnými bunkami v kaluse sú proembryogénne bunky malé, tvarovo izodiametrické s hustou cytoplazmou, nápadným jadrom a tenkou bunkovou stenou (Menéndez-Yuffá & García de García, 1997; Atmane et al., 2000).

Prvá *in vitro* NSE lucerny siatej bola prevedená Saundersom & Binghamom (1972). U lucerny môže byť kalus získaný z rôznych explantátov. Indukovať kalus sa podarilo z nezrelých prašníkov a ovárií, internód stonky, pletiva stopky alebo hypokotylu semenáčikov (Saunders & Bingham, 1972; Bingham et al., 1975; Walker et al., 1979). Zaujímavým príkladom je indukcia kalusu z tenkej vrstvy hypokotylu, pri ktorej boli pozorované oba spôsoby SE (Mohammadi-Nasab et al., 2011). Pomocou androgenézy cez štádium kalusu je možné získať haploidné, ale aj mixoploidné rastliny lucerny. Takáto indukcia kalusu a organogenéza závisí na genotype, zložení média a od vývojového štádia prašníku (Zagorska et al., 1997). Formovať kalus sú schopné aj somatické hybridy získané fúziou protoplastov *M. sativa* a *Lotus corniculatus*, lenže takéto rastliny sa nepodarilo regenerovať (Niize & Saito, 1989).

Podľa protokolu vytvoreného Samacom & Austin-Phillipsom (2006) prebieha regenerácia lucerny siatej NSE v niekoľkých krokoch s rozličnými kultivačnými médiami. Explantát, v tomto prípade list, je sterilizovaný, rozrezaný na polovicu a prenesený na kalus indukujúce médium B5H (Gamborg et al., 1968) s prídavkom Gamborg vitamínov, aminokyselín, auxínu (kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová, 2,4-D) a cytokinínu (kinetín). Po vzniku pozorovateľného zhluku nediferencovaných buniek

je kalus prenesený na B50 médium (rovnaké zloženie ako B5H, ale bez rastových regulátorov), ktoré zodpovedá za formovanie embrya. Vyvinuté embryá sa ďalej prenesú na MMS médium (Murashige & Skoog, 1962) s prídavkom Nitsch & Nitsch vitamínov, sacharózy a myoinozitolu. Toto médium zodpovedá za klíčenie a vývoj rastliny. Pre lepšiu rast koreňa a stonky môže byť do média pridaná kyselina gibberelová (Mohammadi-Nasab et al., 2011). Na udržanie *in vitro* rastlín slúži MS médium (Murashige & Skoog, 1962) s prídavkom sacharózy (Samac & Austin-Phillips, 2006). Na dlhodobú embryogénnu udržateľnosť lucerny siatej bol Sangrou et al. (2019) vyvinutý systém somatickej embryogenézy za použitia SH4K média (Schenk & Hildebrandt, 1972 s prídavkom prolínu, tioprolínu, síranu draselného, kvasničného extraktu, myoinozitolu, sacharózy, 2,4-D a kinetínu). Kalus indukovaný na takomto médiu vykazoval udržateľnosť a vytváral somatické embryá po každom pasážovaní bez významnej straty embryogénneho potenciálu (Sangra et al., 2019).

2.1.1.2 Priama somatická embryogenéza

Tento typ SE vedie k regenerácii rastlín bez tvorby kalusu. PSE u lucerny siatej bola indukovaná z listov, klíčnych listov alebo protoplastov (Kao & Michayluk, 1980; Lu et al., 1983; Dijak & Brown, 1987; Denchev et al., 1991). Ako východiskový explantát pre prípravu protoplastov môžu byť použité kľúčne listy, korene semenáčikov alebo listy. PSE môže prebiehať na tuhom alebo v tekutom médiu. Avšak bolo pozorované, že embryoidy (útvary štruktúrne aj funkčne podobné embryu) sa tvorili rýchlejšie v tekutom ako na tuhom médiu. (Lu et al., 1983).

Kao & Michayluk (1980) uskutočnili prvú PSE lucerny siatej z protoplastov mezofylu. Zistili, že schopnosť tvorby embryoidov a regenerácie rastlín sa líši medzi rastlinami toho istého kultivaru. Ku príkladu slúži, že rastliny toho istého kultivaru sa líšia potrebou rastových regulátorov. Médium s 6-benzylaminopurínom (BA) a kyselinou 1-naftyloctovou (NAA) navodzuje tvorbu embryoidov u jednej rastliny, zatiaľ čo u druhej sú potrebné iné hormóny (zeatín-ribozid a 2,4-D; Kao & Michayluk, 1980).

Štúdium PSE na troch kultivaroch *M. sativa* (Rambler, Regen S, Rangelande) potvrdilo túto rozdielnosť. Protoplasty z kultivarov Rambler a Regen S nie sú schopné podliehať PSE, tvoria iba kalus, ale naopak kultivar Rangelande podlieha PSE, a to nasledovne. Po prvom delení pôvodných protoplastových buniek a pridaní čerstvého média dochádza k agregácii buniek do zhlukov. Na ich povrchu sa začínajú formovať

zelené embryá, ktoré prechádzajú cez globulárne, torpédovité štádium, až vznikne embryo s kľúčnymi listami (Dijak & Brown, 1987). Z histologického hľadiska PSE u lucerny siatej prebieha najpravdepodobnejšie vznikom meristému na povrchu nepravidelne tvarovaných zhlukov buniek, ktorý dá vzniku globulárnemu embryu (Lu et al., 1983).

Dĺžka indukcie PSE ovplyvňuje počet embryí a neskorší vývoj rastliny. Najvyšší podiel embryí bol pozorovaný po 10 dňovej indukcii auxínom (2,4-D). Po 30. dňoch indukcia inhibovala vývoj embrya, čo môže byť vysvetlené spustením sekundárnej diferenciácie bunky. Ďalší vývoj globulárneho embrya bol možný iba za prídavku polyetylénglykolu. Pri maturácii je dôležitým prídavkom do média ABA. Najlepšie sa ukázala štvortýždňová kultivácia na B50 médiu s $30 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ABA (Denchev et al., 1991).

Kultivary lucerny siatej regenerované cez PSE dokážu byť regenerované aj pomocou NSE, avšak opačne to nie je možné. To naznačuje klonálnu variáciu vo faktoroch dôležitých pre schopnosť podliehať PSE a jej spojitosť s viac definovanými vzorcami počiatočného delenia a vývoja z bunkových zhlukov (Dijak & Brown, 1987).

2.2 Mitogénom-aktivované proteínkinázy

2.2.1 Základná charakteristika mitogénom-aktivovaných proteínkináz

Mitogénom-aktivované proteínkinázy (MAPK) sú signálne molekuly zodpovedné za prenos signálu z plazmatickej membrány do vnútra bunky vyvolaný vonkajším podnetom. MAPK slúžia ako signálna kaskáda, ktorá sprostredkováva odpoveď organizmu na vyvolaný stres. MAPK sú prítomné v kvasinkách (Chen & Thorner, 2007), u cicavcov (Chang & Karin, 2001) a v rastlinách (Zhang & Klessig, 2001). V rastlinách sú MAP kinázy zapojené do mnohých procesov, ako je vegetatívny rast, tvorba prieduchov, embryogenéza (Komis et al., 2018), ale taktiež hrajú dôležitú úlohu pri raste koreňových vláskov (Šamaj et al., 2002) a bunkovom delení (Bögge et al., 1999).

MAPK kaskáda je zložená z troch funkčne prepojených proteínkináz. Na začiatku je aktivovaný najvrchnejší člen proteínkinázovej kaskády, MAPK kináza kináza (MAPKKK, MAP3K), ktorá následne fosforyluje a tým aktivuje MAPK kinázu (MAPKK, MAP2K), a tá prenáša signál ďalej na MAPK (MPK; Lewis et al., 1998;

Madhani & Fink, 1998; Schaeffer & Weber, 1999; Colcombet & Hirt, 2008; Šamajová et al., 2013a; Raja et al., 2017).

Boli identifikovaní konkrétni členovia MAPK kaskády, ktorí sú aktivovaní pôsobením príslušného stresu (Nakagami et al., 2006; Qiu et al., 2008). U *Arabidopsis thaliana* pri pôsobení stresu z nízkych teplôt a zasolenia sa spúšťa kaskáda, kde prvým členom je MAPK kináza kináza 1 (Mitogen-activated kinase kinase kinase 1; MEKK1), ktorá ďalej spúšťa MAPK kinázu 2 (Mitogen-activated protein kinase kinase 2; MKK2) a tá fosforyluje kinázy MAPK4 (Mitogen-activated protein kinase 4; MPK4) a MAPK6 (Mitogen-activated protein kinase 6; MPK6; Teige et al., 2004).

U cicavcov sú MAPK rozdelené do troch veľkých skupín: (1) Extracelulárne-signalom-regulované kinázy (Extracellular-signal-regulated kinases, ERK); (2) c-Jun N-terminálne kinázy (c-Jun N-terminal kinases, JNK) a (3) p38/stresom-aktivované proteínkinázy (p38/stress-activated protein kinases, p38/SAPKs; Junttila et al., 2008; Morrison, 2012).

Rastlinné MAPK sú rozdelené do štyroch skupín (A-D) na základe ich fosforylovaného aminokyselinového TXY motívu (treonín-X-tyrozín, kde X môže byť zvyšok glycínu, prolínu, kyseliny glutámovej alebo asparágovej). Skupiny A, B a C majú spoločný aminokyselinový motív TEY (treonín-kyselina glutamová-tyrozín), zatiaľ čo pre skupinu D je typický TDY (treonín-kyselina asparagová-tyrozín) motívom (Ichimura et al., 2002). V genóme modelového organizmu *A. thaliana* bolo identifikovaných 110 génov kódujúcich MAP kinázy. Medzi nimi 80 génov kódujúcich MAPKKK, 10 génov MAPKK a 20 génov kódujúcich MAPK (Ichimura et al., 2002; Colcombet & Hirt, 2008; De Zélicourt et al., 2012; Raja et al., 2017). Fylogenetická analýza genómov ostatných strukovín ukázala porovnateľný počet členov MAPK kaskády. V genóme sóji (*Glycine max*) bolo zatiaľ identifikovaných najviac MAPK, presne 150 MAPKKK génov, 9 MAPKK a 19 MAPK génov (Neupane et al., 2013). Genóm kukurice (*Zea mays*) obsahuje 74 MAPKKK, 9 MAPKK a 19 MAPK génov (Kong et al., 2013). Genóm ryže (*Oryza sativa*) obsahuje 75 MAPKKK, 8 MAPKK a 17 MAPK génov (Xiong et al., 2001; Singh et al., 2012; Wankhede et al., 2013).

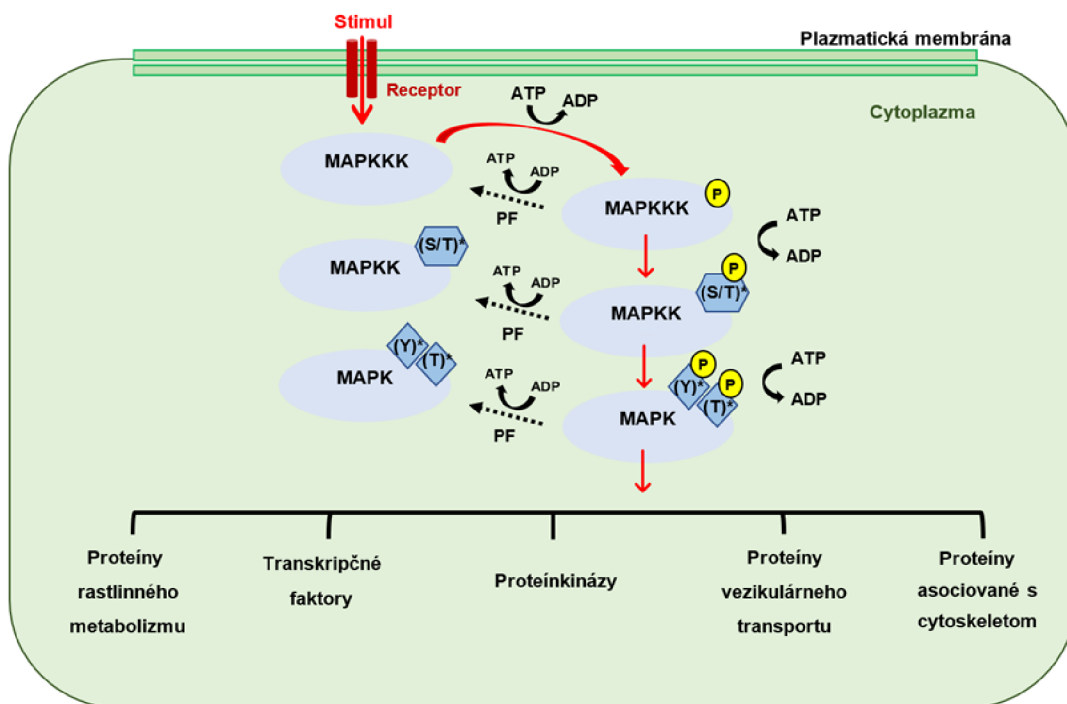
2.2.2 Aktivácia signálnej dráhy

K aktivácii MAPK signálnej dráhy dochádza po zachytení vonkajšieho signálu receptorom na cytoplazmatickej membráne. Môže sa jednať o biotický stimul, napríklad vyvolaný patogénmi (Droillard et al., 2004) alebo abiotický, vyvolaný rôznymi environmentálnymi stresmi ako je chlad, zasolenie alebo sucho (Jonak et al., 1996; Munnik et al., 1999; Jonak et al., 2004). Prenos signálu z plazmatickej membrány môže byť zabezpečený rôznymi spôsobmi. Napríklad receptorom BRI1 s BRI1-asociovanou receptorovou kinázou (BRI1-associated receptor kinase 1; BAK1), ktorý rozpoznáva flagelín a tým spúšťa MAPK kaskádu (Šamajová et al., 2013a), ďalej aktiváciou Ca^{2+} -závislou proteínkinázou (Ca^{2+} -dependent protein kinase; CDPK; Sangwan et al., 2002) alebo Rho GTPázou, ktorá interaguje s MEKK1 (Christerson et al., 2002). Aktivovaná MAPKKK ďalej fosforyluje dvojšpecifickú MAPKK (Bartels et al., 2010).

K aktivácii MAPKK je potrebná fosforylácia na serín a/alebo treonínovom motíve S/TXXXXXS/T (X značí ktorúkoľvek aminokyselinu) u rastlín (Cardinale et al., 2002) a SXXXS/T u cicavcov (Matsuoka et al., 2002). MAPKK ďalej fosforyluje príslušnú MAPK na TXY motíve, u rastlín X môže byť E-kyselina glutamová alebo D-kyselina asparagová (Ichimura et al., 2002). MAPK sú aktivované fosforyláciou na tyrozínovom a serín/treonínovom zvyšku (Stratmann & Ryan, 1997).

Fosforylované MAPK aktivujú cieľové proteíny, čím dochádza k rôznym bunkovým odpovediam (Šamajová, et al., 2013b; Komis et al., 2018). MAPK fosforylujú a regulujú (aktivujú alebo deaktivujú) veľké množstvo substrátov. Môže sa jednať o transkripčné faktory, ktoré spúšťajú adekvátnu génovú expresiu voči stimulu, ktorý celú kaskádu spustil (Kim & Zhang, 2004). Ďalej to môžu byť proteínkinázy, cytoskeletálne komponenty, proteíny zapojené do rastlinného metabolizmu alebo vezikulárneho transportu (Šamajová et al., 2013b; Smékalová et al., 2014).

Konkrétne MAPK3 (Mitogen-activated protein kinase 3; MPK3) a MAPK6 fosforylujú transkripčný faktor WRKY 33 (WRKY33) spúšťajúci expresiu génov zodpovedných za odpoveď voči stresu spôsobeného patogénom (Mao et al., 2011). K fosforylácii dochádza na serínovom zvyšku, ako tomu je u WRKY transkripčného faktoru 8 (WRKY8; Ishihama et al., 2011). U *A. thaliana* boli identifikovaní konkrétni členovia MAPK kaskády ako sú MEKK1, MAPKK4 (Mitogen-activated protein kinase kinase 4; MKK4)/ MAPKK5 (Mitogen-activated



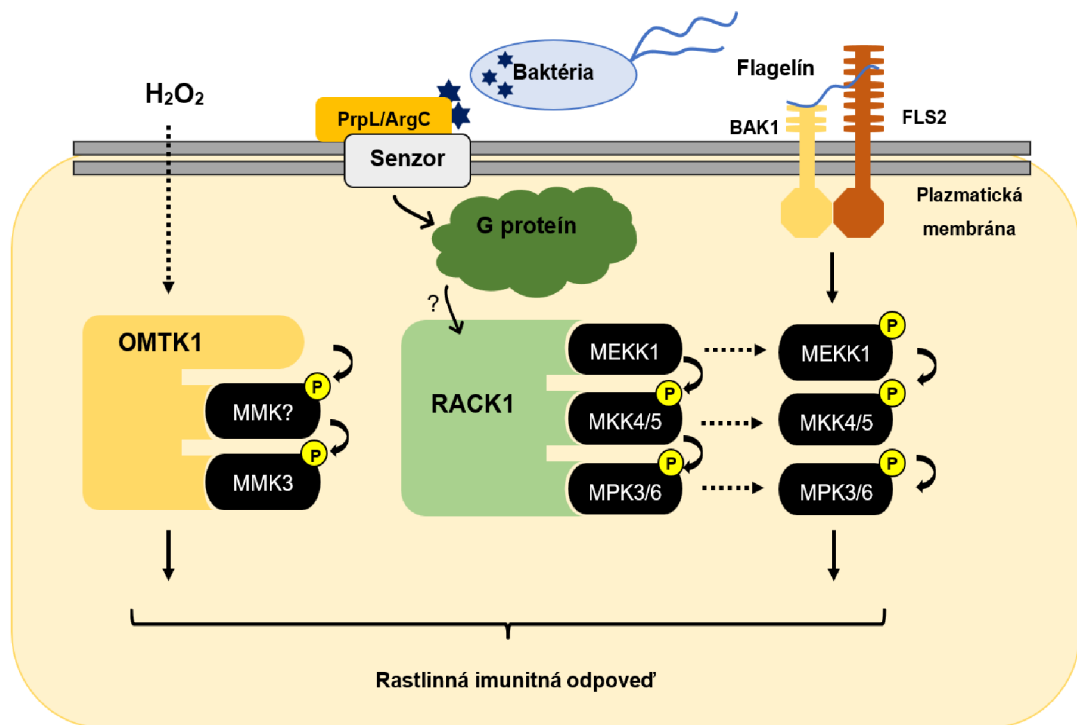
Obrázok 1. Schematické znázornenie aktivácie/inaktivácie MAPK signálnej dráhy od prijatia signálu receptorom až po aktiváciu cieľových proteínov. (S/T)* – serín/treonínový zvyšok; (Y)* – tyrozínový zvyšok; (T)* – treonínový zvyšok; PF – proteín fosfatázy; P – fosfát. Upravené podľa: Taj et al. (2010).

protein kinase kinase 5; MKK5) a MPK3/MPK6, ktoré aktivujú WRKY transkripčný faktor 22 (WRKY22) a WRKY transkripčný faktor 29 (WRKY29). Celá dráha je spúšťaná flagelínovým senzitivným receptorom (Flagellin sensitive 2; FLS2) v reakcii na rozpoznanie flagelínu (Asai et al., 2002). Priebeh aktivácie a inaktivácie signálnej dráhy a prenosu signálu v rámci kaskády MAP proteínkináz na cieľové proteíny je znázornený na Obr. 1.

Pri stabilizácii signálnej MAPK kaskády zohrávajú dôležitú rolu kostrové proteíny a tzv. dokovací motív (Mochly-Rosen et al., 1991). Dokovací motív slúži na špecifickú interakciu MAPK a jej substrátu. Väčšina MAP kináz (skupina A, B a C) obsahuje vo svojej štruktúre, konkrétne v C-terminálnej oblasti, CD-doménu (Common docking site), ktorá slúži na nadviazanie príslušných MAPKK, MAPK fosfatáz alebo MAPK substrátov. Tie na druhú stranu obsahujú D-doménu, nachádzajúcu sa cca 100 aminokyselín od miesta fosforylácie, ktorá interaguje so svojim antagonistom, CD-doménou (Bigeard & Hirt, 2018).

Kostrové proteíny spájajú MAPK dráhu s G proteínom z plazmatickej membrány a majú za úlohu držať pokope celú MAPK kaskádu (Su et al., 2015). Receptor pre aktivovanú C kinázu 1 (Receptor for activated C kinase 1; RACK1) slúži ako kostrový

proteín a viaže všetky tri MAP kinázy jednej signálnej kaskády. RACK1 je aktivovaný heterotrimérnym G proteínom a posúva signál ďalej na MEKK1 počas rastlinnej imunitnej odpovede (Cheng et al., 2015). U *A. thaliana* RACK1 zohráva rolu pri pôsobení rôznych stresov a taktiež interaguje s proteínmi fotosyntézy (Kundu et al., 2013). U lucerny siatej bola objavená Oxidatívnym stresom aktivovaná MAPKKK1 (Oxidative stress-activated MAPKKK 1; OMTK1) kostrová proteínkináza, ktorá priamo aktivuje *Medicago* mitogénom-aktivovanú proteínkinázu 3 (*Medicago* mitogen-activated protein kinase 3; MMK3). MEKK1 a OMTK1 zohrávajú úlohu kostrových proteínov v MAPK kaskáde po aktivácii oxidatívnym stresom (Nakagami et al., 2004, 2006). Príklady kostrových proteínov s konkrétnymi MAPK signálnymi dráhami sú ukázané na Obr. 2.



Obrázok 2. Znázornenie kostrových proteínov a aktivácia konkrétnych MAPK signálnych dráh vyvolaných stresom. BAK1 (BRI1-associated receptor kinase 1); FLS2 (Flagellin sensitive 2); MEKK1 (Mitogen-activated kinase kinase kinase 1); MKK4/5 (Mitogen-activated protein kinase kinase 4/5); MMK? (*Medicago* mitogen-activated protein kinase ?); MMK3 (*Medicago* mitogen-activated protein kinase 3). MPK3/6 (Mitogen-activated protein kinase 3/6); OMTK1 (Oxidative stress-activated MAPKKK 1); P – fosfát; PrpL/ArgC sekretované proteázy z *Pseudomonas aeruginosa* a *Xanthomonas campestris*; RACK1 (Receptor for activated C kinase 1). Upravené podľa: Nakagami et al., 2004; Meng et al., 2015; Su et al., 2015.

2.2.3 Inaktivácia signálnej dráhy

Za inaktiváciu MAPK signálnej dráhy sú zodpovedné špecifické fosfatázy. Skupina hydrolytických enzýmov, ktoré sú schopné odstrániť fosfátovú skupinu z daného substrátu narušením esterovej väzby (Camps et al., 2000; Mishra et al., 2006; Brock et al., 2010; Carrasco et al., 2014; Kuddus et al., 2018). Medzi také fosfatázy patria serín/treonínové fosfatázy (Protein serine/threonine phosphatase, PSTP), proteín tyrozínové fosfatázy (Protein tyrosine phosphatase, PTP), proteínové fosfatázy typu 2C (Protein phosphatase of type 2C, PP2C) a dvojito-špecifické fosfatázy (Dual-specificity phosphatase, DSP; Andreasson & Ellis, 2010; Bartels et al., 2010).

Pri inaktivácii musí dôjsť k odstráneniu oboch fosfátových skupín na TXY motíve. Napríklad fosfatáza PP2C defosforyluje treonín 213 a tyrozín 215 TEY motívu Stresom indukovanej MAPK (Stress-induced MAPK; SIMK; Meskiene et al., 2003). *Medicago* fosfatáza 2 C (*Medicago* phosphatase 2C; MP2C) patrí do skupiny serín/treonínových fosfatáz a v lucerne inaktivuje Stresom aktivovanú MAPK (Stress-activated MAPK; SAMK) kaskádu pri strese spôsobenom poranením. Pri expresii MP2C je *de novo* aktivácia SAMK dráhy inhibovaná (Meskiene et al., 1998). Taktiež bola preukázaná v poranených listoch lucerny defosforylácia SIMK a SAMK spôsobená *de novo* expresiou génu *MP2C* (Meskiene et al., 2003). Príkladom proteín tyrozínovej fosfatázy je *Arabidopsis thaliana* dvojito-špecifická proteín tyrozín fosfatáza (*Arabidopsis thaliana* dual-specificity protein tyrosine phosphatase; AtDsPTP), ktorá je schopná defosforylovať fosfoserín/treonín fosfotyrozín a v *A. thaliana* špecificky defosforyluje MPK4 (Gupta et al., 1998).

2.2.4 Mitogénom-aktivované proteínkinázy u *Medicago truncatula*

V genóme *M. truncatula* boli v roku 2013 *in silico* analýzou identifikované 4 MAPKK a 18 MAPK (Neupane et al., 2013). Ďalšie analýzy identifikovali 7 MAPKK a 25 MAPK (Purayannur et al., 2017). Bioinformatickou analýzou za použitia homológnych génov pre MAPKKK z *A. thaliana* bolo objavených 73 MAPKKK, ktoré sa nachádzajú na všetkých 8 chromozómoch *M. truncatula*. Analýzou expície génov pomocou sekvenovania RNA bolo zistené zapojenie MAPKKK pri pôsobení stresu. Napríklad MAPKKK36 a MAPKKK41 boli nadexprimované pri nízkych teplotách, zatiaľ čo iné vykazovali nadexpresiu pri iných stresoch, ako sú stres zo zasolenia (MAPKKK1 a 4), osmotický stres (MAPKKK32 a 59), stres mrazom (MAPKKK18 a 6) a stres pod vplyvom kyseliny abscisovej (MAPKKK52 a 57).

Len jediná MAPKKK vykazovala zvýšenú expresiu pri všetkých stresoch, a to MAPKKK49 (Li et al., 2016).

Vypnutie génu *MAPKK4* u *M. truncatula* spôsobilo rastové poruchy, čo naznačuje dôležitosť MAPKK4 (Mitogen-activated protein kinase kinase 4) pre správny vývoj a rast. Taktiež bol pozorovaný znížený počet tvorby nodulov (Chen et al., 2017a). Testovaním interakcie s ostatnými MAPK v dvojhybridnom kvasinkovom systéme sa prišlo na interakciu MAPKK4 s MAPK3 (Mitogen-activated protein kinase 3) a MAPK6 (Mitogen-activated protein kinase 6). Štúdium MAPKK4 fúzneho proteínu so zeleným fluorescenčným proteínom (GFP) ukázalo subcelulárnu lokalizáciu v plazmatickej membráne, cytoplazme a jadre. Rovnaký signál bol pozorovaný pre MAPK3 a MAPK6, s výnimkou cytoplazmy, kde bol slabší. Výsledky expsie v jednotlivých orgánoch *M. truncatula* naznačujú prítomnosť MAPK6 predovšetkým v koreni, stonke, listoch a noduloch. (Chen et al., 2017a).

Pri inokulácii symbiotickou baktériou *S. (Ensifer) meliloti* bola pozorovaná zvýšená hladina transkriptov MAPK3, MAPK6 a taktiež došlo k potlačeniu obrannej reakcie na patogén *Pseudomonas syringae* (Chen et al., 2017b).

Použitím dvojhybridného kvasinkového systému sa zistilo, že MAPKK5 (Mitogen-activated protein kinase kinase 5) fosforyluje MAPK3 a MAPK6 v kinázovej kaskáde a táto signálna kaskáda je zodpovedná za negatívne regulovanie tvorby nodulov v koreňoch *M. truncatula* v spolupráci s príslušnými transkripčnými faktormi skorej nodulácie (Ryu et al., 2017).

2.2.5 Mitogénom-aktivované proteínkinázy u *Medicago sativa*

Pomocou homológneho génu z hrachu bola objavená prvá MAPK u *M. sativa*, Mitogénom-aktivovaný proteínkinázový homológ MMK1 (Mitogen-activated protein kinase homolog MMK1; ERK1). Expesia ERK1 v *Escherichia coli* naznačovala, že sa jedná o tyrozín fosforylovanú MAP kinázu. (Duerr et al., 1993). V deväťdesiatych rokoch boli objavené ďalšie MAPK u lucerny a to: *Medicago* mitogénom-aktivovaná proteínkináza 2 (*Medicago* mitogen-activated protein kinase 2; MMK2; Jonak et al., 1995), MMK3 (Bögre et al., 1999) a SAMK (Jonak et al., 1996).

SIMK bola identifikovaná ako soľou alebo elicitorami indukovaná MAPK (Munnik et al., 1999; Cardinale et al., 2000, 2002). SIMK je u lucerny odpoveďou na hyperosmotický stres (Munnik et al., 1999). Bolo ukázané, že SIMK je lokalizovaná v rastúcich špičkách koreňových vláskov, kde dochádza k interakciám s vezikulárnym

transportom a organizáciou aktínu (Šamaj et al., 2002). Hrbáčková et al., (2021) v snahe zvýšiť expresiu SIMK, naklonovali N-terminálny fúzny konštrukt s *GFP* a *SIMK* pod kontrolou 35S konštitutívneho promotóra (*35S::GFP::SIMK*) a stabilne transformovali lucernu siatu týmto konštruktom. Mikroskopia na živých bunkách ukázala lokalizáciu GFP-SIMK predovšetkým v jadrách a v cytoplazme rôznych rastlinných orgánov, ako sú korene a listy. GFP-SIMK fúzny proteín bol taktiež lokalizovaný v špičkách rastúcich koreňových vláskov. Znížená expresia SIMK a Stres indukovanej MAPKK (Stress-induced MAPKK; SIMKK) viedla k celkovému zníženiu dĺžky koreňových vláskov oproti divému typu, zatiaľ čo nadexpresia mala opačný efekt. Rovnaký účinok bol pozorovaný aj pri tvorbe nodulov, čo viedlo k zvýšeniu celkovej biomasy v nadexprimovaných rastlinách lucerny (Hrbáčková et al., 2021).

V odpovedi na stimuly vyvolané látkami z parazitov, v tomto prípade z húb, sa ukázala aktivácia rôznych mitogénom-aktivovaných proteínkináz (MMK). Na chitín, komponent bunkovej steny húb, reagovali SIMK, MMK2 a MMK3. Ergosterol, sterol prítomný v hubách, zase aktivoval SIMK, MMK3 a SAMK. Beta-(1,3)-Glukán, komponent bunkovej steny mnohých húb, aktivoval SIMK, MMK2, MMK3 a SAMK v bunkách lucerny (Cardinale et al., 2000).

Bolo preukázané, že MMK2 a MMK3 sú zapojené do bunkového rastu a bunkového delenia (Bögge et al., 1999). MMK2 je jedna z prvých identifikovaných MAPK zapojených do cytoskeletálnej regulácie. MMK3 bola najviac prítomná v rozvíjajúcich sa orgánoch a pri bližšom skúmaní sa zistila aktivita MMK3 behom mitózy, konkrétne po metafáze a pri formovaní fragmoplastu. Najviac sa vyskytovala v deliacich sa pletivách (Bögge et al., 1999). SAMK bola identifikovaná po pôsobení osmotického stresu (Munnik et al., 1999), po poranení (Bögge et al., 1997) a vplyvom hubových elicitorov (Cardinale et al., 2000).

Sangwan et al. (2002) identifikovali Tepelným šokom mitogénom-aktivovanú proteínkinázu (Heat shock mitogen-activated protein kinase; HAMK) ako antagonistu SAMK. HAMK je aktivovaná stresom z tepla. Ich vzájomná ambivalencia je zabezpečená zmenou priepustnosti (fluidity) cytoplazmatickej membrány. Spolu taktiež zohrávajú úlohu pri remodelácii cytoskeletu. Mikrofilamentový a taktiež mikrotubulový stabilizátor zablokovali aktiváciu SAMK spôsobenú chladom. Vápnikovým influxom na plazmatickej membráne dochádza k aktivácií MAP kináz.

Za to môže byť zodpovedná CDP kináza, ktorá aktivuje príslušnú MAPKKK a tým aktivuje celú MAPK kaskádu (Sangwan et al., 2002).

Pozorovania pod vplyvom stresu spôsobenými ťažkými kovmi (CuCl_2 , CdCl_2) ukázali zvýšenú aktivitu SIMK, MMK2, MMK3 a SAMK, najrýchlejšiu odozvu vykazovala SIMK a to v rámci niekoľkých minút (Jonak et al., 2004). Bola preukázaná aktivácia SIMK a SAMK vyššou kinázou v kaskáde, SIMKK, a to v odpovedi na stres spôsobený CuCl_2 (Jonak et al., 2004). Interakcia a vzájomná špecificita bola potvrdená pomocou dvojhybridného kvasinkového systému. SIMKK skutočne fosforyluje SIMK a to predovšetkým pri pôsobení stresu zo zasolenia (Kiegerl et al., 2000; Cardinale et al., 2002). Pri prenesení SIMKK do *A. thaliana*, bola SIMKK pozorovaná predovšetkým v jadre, avšak po spôsobiť stresu zo zasolenia došlo k čiastočnej relokácií do cytoplazmy. Podobný priebeh bol pozorovaný aj v bunkách koreňa *M. sativa* (Ovečka et al., 2014). Iná MAPKK identifikovaná u lucerny bola na patogén reagujúca MAPKK (Pathogen-Responsive MAPKK; PRKK). PRKK spolu so SIMKK vykazovali najsilnejšiu interakciu so SIMK (Cardinale et al., 2002).

2.3 Technológia CRISPR/Cas9

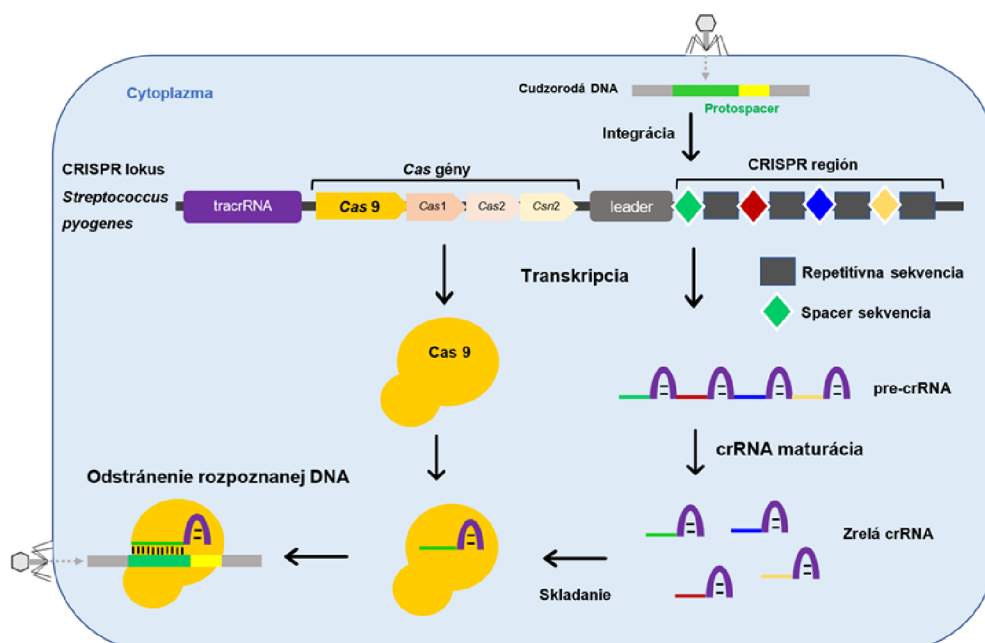
2.3.1 Základná charakteristika CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9 technológia je moderná metóda používaná v génovom inžinierstve na vyvolanie relatívne presnej zmeny genetickej informácie organizmu. Skladá sa z jednovláknovej navádzacej RNA (single guide RNA; sgRNA) a proteínu CRISPR asociovaný proteín 9 (CRISPR associated Protein 9; Cas9) s endonukleázovou aktivitou schopného spôsobiť ciele zlomky na oboch vláknach DNA súčasne. Skratka CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) značí zoskupené pravidelne rozmiestnené krátke palindromické opakovania.

Bola objavená u prokaryot, ktorým CRISPR/Cas slúži ako adaptívny obranný mechanizmus v boji proti vírusom a cudzím plazmidom. CRISPR adaptívna imunita u baktérií a archeí je nadobudnutá nasledovne: krátka sekvencia (protospacer) z fága je vložená ako spacer sekvencia do CRISPR regiónu CRISPR-associated (Cas) proteínmi. Pri ďalšom stretnutí s fágom dochádza k transkripcii prekursorovej crisprRNA (pre-crRNA), ktorá je zostrihávaná na crisprRNA (crRNA) a taktiež dochádza k expresii trans-aktivujúcej RNA (tracrRNA) a Cas proteínu. Následne sa crRNA spáruje s tracrRNA a naviaže sa na Cas9 endonukleázu, ktorú následne navádza na homológnu sekvenciu fágovej DNA. Tam hrá dôležitú úlohu krátka

sekvencia, tzv. PAM (protospacer adjacent motif), väčšinou trojnukleotidová sekvencia NGG (N značí hocijakú bázu). Po jej nájdení dochádza k rozmotaniu dvojzávitnice a komplementárnemu naviazaniu navádzacej RNA (guide RNA, gRNA). Následne dôjde k dvojvláknovému zlomu pomocou endonukleázových jednotiek na proteíne Cas9 (Fineran & Charpentier, 2012; Barrangou & Marraffini, 2014).

CRISPR lokusy sú typickým znakom všetkých CRISPR/Cas systémov. CRISPR lokus sa skladá vo všeobecnosti z CRISPR regiónu (CRISPR array) a *Cas* génov. CRISPR región pozostáva z neopakujúcich sa/ nerepetitívnych (spacer) sekvencií (neopakujúce sa sekvencie DNA pochádzajúce z fága alebo plazmidu), ktoré sú oddelené nefágovými opakujúcimi sa/ repetitívnymi úsekmi DNA (20 – 50 bp; Makarova et al., 2015). Súhrne je CRISPR región tvorený spacer-repetícia-spacer usporiadaním. Oblasť *Cas* génov sa nachádza pred CRISPR regiónom a tieto gény sú prepisované na proteíny. CRISPR lokus *Streptococcus pyogenes* sa skladá z *Cas9*, *Cas1*, *Cas2*, *Csn2* génov, CRISPR regiónu a *tracrRNA* (Liao & Beisel, 2021). *Cas9* izolovaná zo *S. pyogenes* (*SpCas9*) je dnes najčastejšie využívanou endonukleázou na editovanie DNA (Jiang & Doudna, 2017). Znázornenie CRISPR lokusu a bakteriálnej adaptívnej imunity je zobrazené na Obr. 3.



Obrázok 3. Schéma *Sp*CRISPR/Cas lokusu a CRISPR/Cas9 bakteriálnej adaptívnej imunity v odpovedi na cudziu DNA. *Sp*CRISPR/Cas lokus obsahuje *tracrRNA*, *Cas* gény (*Cas9*, *Cas1*, *Cas2*, *Csn2*), vedúcu (leader) sekvenciu a CRISPR región. Upravené podľa: Bondy-Denomy & Davidson, 2014; Jiang & Doudna, 2017; Liao & Beisel, 2021.

Vedúca (leader) sekvencia sa nachádza tesne pred CRISPR regiónom a slúži ako promótor. Promótor CRISPR 1 regiónu, *Pcrispr1*, je zodpovedný za transkripciu pre-CRISPR. *Cas* gény obsahujú svoj vlastný promótor, *Pcas*, nachádzajúci sa pred *Cas* génmi. Usmerňuje transkripciu polycistronickej mRNA všetkých 5 génov v kaskáde (Pul et al., 2010).

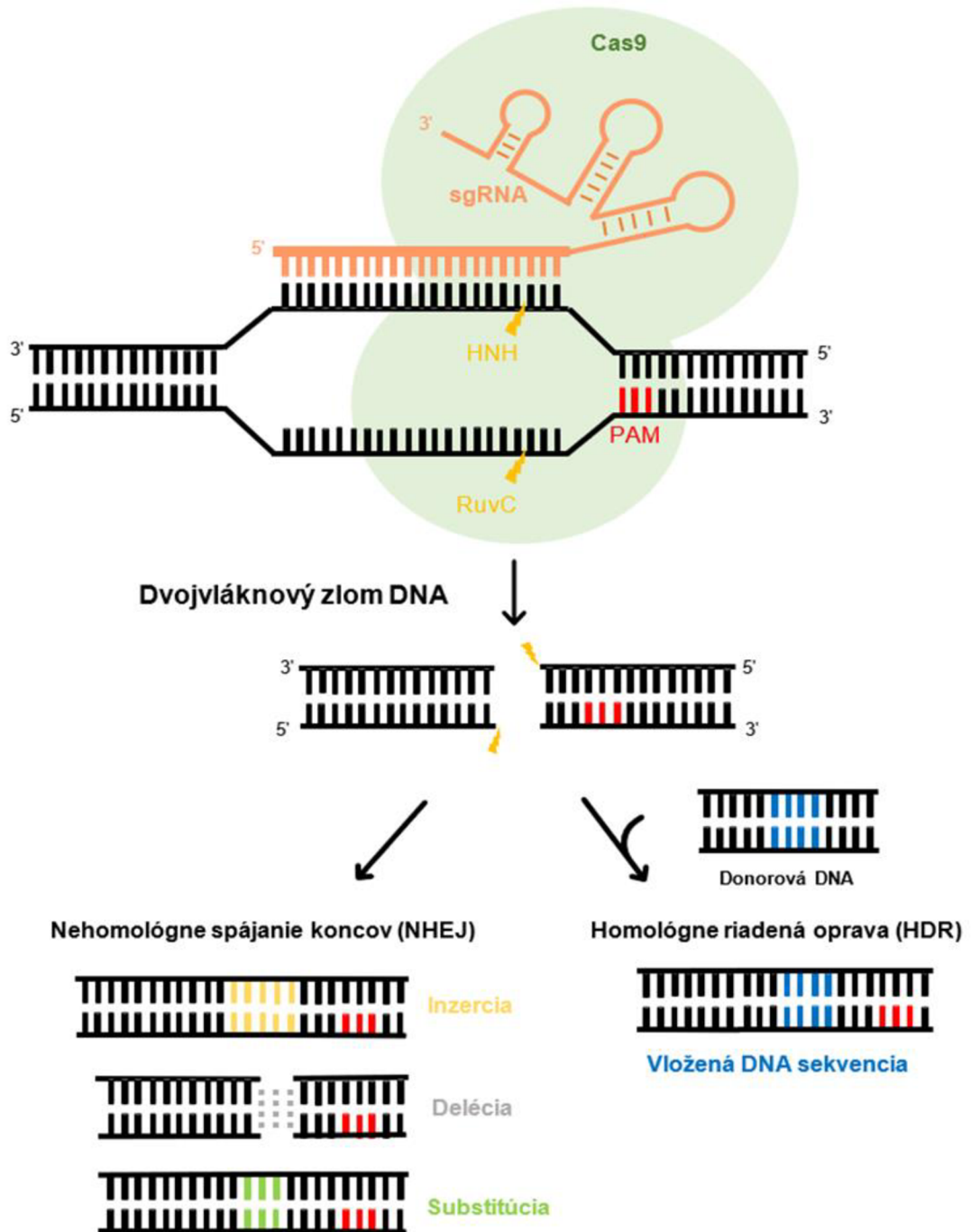
Cas proteín pozostáva z dvoch rozdielnych lalokov (častí). Prvý lalok sa nazýva alfa-helikálny rozpoznávajúci lalok (alpha-helical recognition lobe; REC) a jeho úlohou je rozpoznávanie cieľovej DNA. Druhý lalok je nukleázový lalok (nuclease lobe; NUC). Laloky sú spojené dvoma segmentami: arginín-bohatým helikálnym mostom (arginine-rich bridge helix) a nepravidelnými linkerami (disordered linker). REC lalok sa skladá z 3 alfa-helikálnych domén (Hel-I, Hel-II, and Hel-III). NUC obsahuje konzervovanú HNH doménu, RuvC nukleázovú doménu a variabilnú C-terminálnu doménu (C-terminal domain; CTD; Jinek et al., 2014; Jiang & Doudna, 2017).

HNH doména je typická pre jej histidínové a asparagínové zvyšky a je zodpovedná za zlom komplementárnej DNA. RuvC doména tvorí štrukturálne jadro NUC laloku. Štruktúra RuvC domény je tvorená šesťvláknovým beta listom obklopeným štyrmi alfa helikázami, pričom všetky tri konzervované subdomény prispievajú katalytickými zvyškami do aktívneho miesta. Spôsobuje zlom nekomplementárneho vlákna DNA (Jinek et al., 2012).

Dvojvláknový zlom DNA spôsobený Cas9 endonukleázou spúšťa v bunke opravu DNA. K oprave DNA dochádza dvoma spôsobmi: nehomológnym koncovým spájaním (nonhomologous end-joining; NHEJ) alebo homológnou priamou opravou (homology-directed repair; HDR). Pri NHEJ oprave dochádza k chybám, čím vznikajú malé delécie, inzercie alebo substitučné mutácie DNA. HDR je takzvaná bezchybová DNA oprava, ktorá potrebuje opravný templát v podobe homológnej donorovej sekvencie (Zhang et al., 2014).

Molekula sgRNA kombinuje crRNA a tracrRNA. Tým je docielený jednotný RNA traskript. Zmenou sgRNA sekvencie je možné zacieliť ktorúkoľvek DNA sekvenciu a spôsobiť mutáciu (NHEJ) alebo vložiť požadovanú donorovú sekvenciu (HDR oprava) na určené miesto, kde nastal zlom (Jinek et al., 2012). Molekula sgRNA interaguje s Cas9 proteínom prostredníctvom repetícia-antirepetícia duplexu (repeat-antirepeat duplex), kmeňovej slučky 1 (stem loop 1), Hel-I domény, arginín-bohatým

helikálnym mostom a CTD doménou (Jiang & Doudna, 2017). Znáznornenie CRISPR/Cas9 editačného mechanizmu je zobrazené na Obr. 4.



Obrázok 4. Schéma mechanizmu CRISPR/Cas9 metódy spôsobujúceho dvojláknové zlomy DNA a následná oprava DNA. HNH konzervovaná nukleázová doména; PAM - protospacer adjacent motif; RuvC nukleázová doména; sgRNA - single-guide RNA. Upravené podľa: Jiang & Doudna, 2017.

2.3.1.1 Využitie CRISPR/Cas9 technológií v poľnohospodárstve

Metóda CRISPR/Cas9 bola použitá na mnohých dôležitých plodinách, či už hospodársky alebo vedecky významných. Úspešne sa podarilo editovať gény *Nicotiana benthamiana* (Jansing et al., 2019), jačmeňa (*Hordeum vulgare*; Gasparis et al., 2018), sóje (*G. max*; Jacobs et al., 2015), ryže (*O. sativa*) a *A. thaliana* (Feng et al., 2013). CRISPR/Cas9 je vhodný na editáciu génov jednoklíčnolistových, tak aj dvojklíčnolistových rastlín. Úspešne sa podarilo editovať polyploidné rastliny, ako sú ľuľok zemiakový (*Solanum tuberosum*) alebo pšenica (*Triticum aestivum*; Johansen et al., 2019).

Konkrétnym príkladom využitia CRISPR/Cas9 je zvýšenie výnosu u pšenice, kde pri vypnutí génu *TaCKX2* (*Triticum aestivum* cytokinin oxidase/dehydrogenase), čo je gén pre tvorbu cytokinín oxidázy/dehydrogenázy, došlo k tvorbe väčšieho množstva zrn (Zhang et al., 2019). Taktiež sa dá pomocou CRISPR dosiahnuť zlepšenie kvality pšenice a to editovaním génov zodpovedných za tvorbu lepku, spôsobujúceho celiakiu. Bola vytvorená pšenica s nízkym obsahom lepku, ktorá znižovala imunoreakciu až o 85 % (Sánchez-León et al., 2018). Editovaním promotora génu *CsLOB1* (*Citrus sinensis* lateral organ boundaries 1) sa zvýšila rezistencia v citrusoch voči patogénu *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, spôsobujúceho rakovinu citrusového plodu (Peng et al., 2017). Za použitia adenín bázového editora (adenine base editor), ktorý sa skladá z tRNA adenozin deaminázy spojenej s Cas9 nikázou (SpCas9 nickase) sa podarilo zameniť tymín za cytozín v géne *ACC* (*acetyl-coenzyme A carboxylase*), čo viedlo k rezistencii ryže (*O. sativa*) voči herbicídu (Li et al., 2018).

2.3.2 História CRISPR/Cas9

Prvá zmienka o CRISPR sa objavila v roku 1987 pri študovaní génu alkalickéj fosfatázy (*Alkaline phosphatase gene*; *IAP*) v *E. coli*. Boli objavené opakujúce sa nukleotidové sekvencie, ktoré boli netypicky prerušované neopakujúcimi sa sekvenciami (Ishino et al., 1987). Následne v roku 1993 boli podobné sekvencie objavené aj u archea, konkrétne u *Haloferax mediterranei* (Mojica et al., 1993).

V roku 2000 boli publikované poznatky, že CRISPR, vtedy ešte nazývaný Short Regularly Spaced Repeats (SRSRs), skratka pre Krátke pravidelne oddelené opakovania, sa vyskytuje po celej ríši prokaryot. Konkrétne v rodoch baktérií ako cyanobaktérie, proteobaktérie, hypertermofilné baktérie a pravdepodobne vo všetkých

archea (Mojica et al., 2000). Pojem CRISPR bol zavedený v roku 2002 výskumnými skupinami Mojica et al. (2000) a Jansen et al. (2002) ako skratka pre Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats. *In silico* analýzou boli objavené štyri CRISPR-asociované gény (*CRISPR-associated genes*; *Cas* gény), *Cas1-Cas4*, ktoré sú v asociácii s CRISPR regiónom (Jansen et al., 2002).

V roku 2005 sa podarilo trom výskumným skupinám nezávisle na sebe objasniť funkciu CRISPR u prokaryotických organizmov. Objavili, že spacer sekvencie, teda neopakujúce sa sekvencie, odpovedajú nukleotidovým sekvenciám pochádzajúcim z patogéna. Predostreli hypotézu, že CRISPR môže slúžiť ako imunitný systém pre prokaryoty tým, že zabudováva cudziu DNA, čím poskytuje ochranu proti cudzorodej DNA pochádzajúcej buď z bakteriofága alebo konjugatívneho plazmidu (Bolotin et al., 2005; Mojica et al., 2005; Pourcel et al., 2005). Táto hypotéza bola potvrdená zistením, že vírusy nie sú schopné infikovať bunky archeí, ktoré obsahujú ich vlastnú vírusovú DNA (Mojica et al., 2005).

Prvý experimentálny dôkaz o funkcii CRISPR ako adaptívnej imunity prokaryot prišiel v roku 2007. Výsledky výskumu naznačovali, že baktéria majúca CRISPR neopakujúcu sa (spacer) sekvenciu odpovedajúcu fágovej sekvencii, bola rezistentná voči fágu. Pri odstránení odpovedajúcej tejto sekvencie, rezistencia voči fágu nenastala (Barrangou et al., 2007). Ďalší posun nastal v roku 2008 odhalením transkripcie neopakujúcej sa sekvencie na crRNA, ktorá slúži ako navádzacia sekvencia. Výsledky ukázali, že za zostrihávanie pre-crRNA je zodpovedný CasE proteín, ktorý zostriháva pre-crRNA transkript na dozretú crRNA. Domnievajú sa, že transkripcia neopakujúcej sa sekvencie na pre-crRNA a následne zostrihanie na crRNA Cas proteínom, je hlavný princíp antivirálny obrany prokaryot CRISPR/Cas systému (Brouns et al., 2008).

V roku 2008 taktiež potvrdili, že CRISPR/Cas systém môže slúžiť ako obranný mechanizmus nielen voči vírusom, ale aj horizontálnemu prenosu génov spôsobeného plazmidmi (Marraffini & Sontheimer, 2008). Rok na to sa preukázalo, že crRNA v spolupráci s Cas proteínom zameriava cudziu virálnu mRNA tak, že sa na ňu naviaže na princípe komplementárneho párovania bázy (Hale et al., 2009). V tom istom období sa objasnil mechanizmus a špecifikoval gén pre Cas proteín, na ktorý sa viaže crRNA. Jednalo sa o *Cas5* gén, dnes už známy pod názvom *Cas9*. *In vivo* bola preukázaná schopnosť CRISPR/Cas systému odstraňovať fágovú a plazmidovú DNA. Po inaktivácii *Cas5* génu nedošlo k odstráneniu virálnej DNA. To viedlo k záveru,

že endonukleázová aktivita Cas5 proteínu je podstatná pre CRISPR/Cas systém (Garneau et al., 2010).

O niekoľko mesiacov neskôr výskumná skupina Deltcheva et al. (2011) odkryla ďalšie významy komponent CRISPR skladačky. Objavili tracrRNA, ktorá slúži ako lešenie pre naviazanie crRNA na Cas proteín. A taktiež zohráva dôležitú rolu pri dozrievaní pre-crRNA (Deltcheva et al., 2011).

Objavy ako endonukleázová aktivita Cas9 proteínu a variabilnosť crRNA viedli k otázke, či by sa CRISPR/cas9 systém nedal využiť pre génové inžinierstvo ako RNA navádzací nástroj pre editáciu genómu. Tento zámer potvrdil prenos CRISPR/Cas modulu zo *Streptococcus thermophilus* do *E. coli*, ktorý poskytol rezistenciu transgénnej *E. coli* voči plazmidovej a virálnej infekcii (Sapranaukas et al., 2011).

Veľký prelom nastal v roku 2012, keď sa medzinárodnej skupine Jinek et al. (2012) podarilo zostrojiť sgRNA spojením tracrRNA a crRNA. To prinieslo zjednodušenie celej metódy a umožnilo lepšie navádzať Cas9 endonukleázu do cieľového miesta a efektívne zacieliť a vystrihnúť požadovanú DNA sekvenciu. Taktiež potvrdili úlohu nukleázových domén HNH and RuvC, ktoré sú zodpovedné za dvojvláknové zlomy (Jinek et al., 2012). Následne bol CRISPR/cas9 po prvýkrát použitý na editáciu genetickej informácie v ľudských bunkách (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013).

Celý potenciál a význam CRISPR/Cas9 metódy potvrdzuje udelenie Nobelovej ceny za chémiu v roku 2020 dvom vedkyniam, Jennifer Doudna a Emmanuelle Charpentier, ktoré sa s veľkým príspevom zaslúžili o pretransformáciu CRISPR imunitného systému prokaryot na vysoko efektívnu a široko zaužívanú génovú editačnú techniku, ktorá mala v poslednom desaťročí veľký dopad na génové inžinierstvo a biotechnológie naprieč všetkými odvetvami.

2.3.3 CRISPR/Cas9 u *Medicago sativa*

2.3.3.1 Použitie single guide CRISPR/Cas9 systému (sgCRISPR/Cas9)

Prvýkrát bol CRISPR/Cas9 u lucerny použitý na editáciu génu *MsSPL9* (*Medicago sativa* *Squamosa promoter binding protein like 9*). K editácii bola použitá sgRNA, vklonovaná do plazmidového vektora pod *A. thaliana* *U6* (*Arabidopsis thaliana* *ubiquitin U6*) promótorom spolu s dicot plants Cas9 (dpCas9) pod ubiquitinovým promótorom. Pri porovnaní efektivity editácie s dostupnými informáciami na príbuznom druhu *M. truncatula*, výsledky na lucerne ukázali veľmi nízke percento

frekvencie mutácií (približne 2,2 %) a žiadna z modifikovaných rastlín nevykazovala pozmenený fenotyp. Nízke percento mutácií je pravdepodobne spôsobené tetraploidným genómom lucerny a náročným zacielením a vyradením všetkých štyroch alel naraz (Gao et al., 2018).

Ďalší pokus využitia sgCRISPR/Cas9 systému bol použitý na vyradenie génu *PDS* (*Phytoene desaturase*; Chen et al., 2020). Vyradenie tohto génu vykazovalo ľahko pozorovateľný albino trpasličí vzhľad, čo bolo odskúšané na evolučne najbližšom organizme lucerny, *M. truncatula* (Meng et al., 2017). Podarilo sa vytvoriť dve rastliny so zmutovaným fenotypom a celková efektivita editácie dosahovala 0,57 %. Taktiež sa pokúsili o mutáciu v géne *MsPALM1* (*Medicago sativa palmate-like pentafoliata1*) s úspešnosťou 1,72 % (Chen et al., 2020).

Výskumnej skupine Singer et al. (2020) sa podarilo pomocou sgRNA dosiahnuť mutácie na 3 zo 4 alel v géne *MsSPL8* (*Medicago sativa Squamosa promoter binding protein like 8*). Nedošlo k mimocieleným (off-target) mutáciám na sekvenčne podobných miestach ku gRNA, čo bolo overené pomocou Sanger sekvenovania. V porovnaní s prázdnyim vektorom vykazoval genotyp SPL8-1 redukciu v dĺžke internód, zmenšenie plochy listov a zrýchlené kvitnutie. Testovaním voči stresu mal tento genotyp zlepšenú odolnosť voči suchu a zasoleniu oproti lucerne s prázdnyim vektorom (Singer et al., 2020).

2.3.3.2 Aplikovanie multiplex guide RNA-CRISPR/Cas9 systému

Multiplex gRNA-CRISPR/Cas9 systém sa skladá z polycistronickej tRNA-gRNA (PTG). Je založený na tandemovo opakujúcom sa usporiadaní tRNA a gRNA. Každá gRNA obsahuje špecifickú navádzajúcu sekvenciu, ktorá odpovedá cieľovej sekvencii v genóme a sekvenciu pre gRNA kostru (scaffold), ktorá slúži na naviazanie sa na Cas proteín. Primárny transkript je následne zostrihaný pomocou RNázy P a RNázy Z, ktoré v eukaryotických bunkách prirodzene štiepia prekurzorovú tRNA. Vzniká samostatná gRNA (Xie et al., 2015). U rastlín bol multiplex gRNA-CRISPR/Cas9 systém použitý už niekoľkokrát (Xing et al., 2014; Lowder et al., 2015; Ma et al., 2015; Wang et al., 2015) .

Po nízkych frekvenciách mutácií sgRNA CRISPR/cas9 metódy u lucerny (2,2 % Gao et al., 2018; 0,57 % a 1,72 % Chen et al., 2020; 2,5 % Wolabu et al., 2020) sa výskumná skupina pod vedením Wolabu rozhodla použiť metódu multiplex guide RNA na navádzanie Cas9 endonukleázy (Wolabu et al., 2020).

Na dosiahnutie vyššej efektivity mutagenézy boli zostrojené tri multiplex gRNA-CRISPR/Cas9 vektory pre editáciu génu *MsSGR* (*Medicago sativa stay green*), kedy každý vektor obsahoval štyri *MsSGR*-gRNA navrhnuté na zacielenie štyroch dvadsať nukleotidových sekvencií na troch exónoch génu *MsSGR*. Prvý vektor obsahoval *35S* promótor poháňajúci *Cas9*, zatiaľ čo druhý sa nelíšil promótorom, ale pozmenenou sekvenciou gRNA kostry (scaffold). Tretí mal zmenený promótor pre *Cas9* gén, a to *AtUBQ10*. Použitie prvého vektora viedlo k 31 % účinnosti mutagenézy, druhého vektora k 23 % účinnosti mutagenézy a použitie tretieho vektora viedlo až k 49 % účinnosti tejto metódy (Wolabu et al., 2020). Použitie promótoru *AtUBQ10* viedlo k najvyššej mutagenéze, zatiaľ čo zmena sekvencie gRNA kostry viedla k zníženiu efektivity. Promótor *35S* vykazoval nižšiu efektívnosť ako promótor *AtUBQ10* pre navádzanie *Cas9* proteínu. Druhý a tretí vektor bol schopný vyprodukovať 100 % tetraalelických homozygotov. Taktiež sa podarilo pozorovať silný pozmenený fenotyp u rastlín lucerny, čo len potvrdzuje úspešnosť multiplex gRNA-CRISPR/Cas9 metódy (Wolabu et al., 2020).

Multiplex systém CRISPR/Cas9 zameraný na rôzne miesta toho istého génu súčasne drasticky zvýšil účinnosť úpravy genómu lucerny, čo prinieslo perspektívu pre editáciu nielen lucerny, ale aj ostatných polyploidných rastlín.

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál

3.1.1 Bakteriálny materiál

Pri príprave vektorov pre CRISPR/Cas9 mutagenézu *SIMK* génu sa používali bakteriálne kmene:

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

3.1.2 Rastlinný materiál

Ako rastlinný materiál boli v experimentálnej časti použité rastliny lucerny siatej (*M. sativa* L.) kultivaru Regen-SY (RSY). Rastliny lucerny siatej určené k stabilnej transformácii pomocou *A. tumefaciens* nesúce konštrukty (pDe-Cas9 + SIMKgRNA4; pDe-Cas9 + SIMKgRNA5; pDe-Cas9 + SIMKgRNA6; pDe-Cas9 + SIMKgRNA7; pDe-Cas9 + SIMKgRNA8; pDe-Cas9 + SIMKgRNA9) boli pripravené prostredníctvom somatickej embryogenézy a pestované do veľkosti vhodnej na presadenie do pôdy v kultivačnej miestnosti s konštantnými hodnotami teploty, osvetlenia, fotoperiódou a vlhkosti (21 °C, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 16/8, 70 %). Z dospelej rastliny kultivaru RSY boli odobrané stredne staré, nepoškodené listy a bez napadnutia patogénmi, ktoré boli použité pre účely stabilnej transformácie.

3.1.3 Použité plazmidy pre Multisite Gateway® klonovací systém

Pri príprave konštruktov pre CRISPR/Cas9 mutagenézu *SIMK* génu sa používal pEn-Chimera vstupný (entry) vektor s ampicilínovou (Amp^{R}) rezistenciou kódujúci gRNA. Sekvencie gRNA (navádzacie sekvencie) boli v plazmide pEn-Chimera riadené pod *U6-26* promótorom z arábkovky. Ako destinačný vektor sa používal pDe-Cas9 vektor so spektinomycínovou (Spe^{R}) rezistenciou pre baktérie a fosfínocínovou (Ppt^{R}) rezistenciou pre selekciu v rastlinách. Jedná sa o binárny T-DNA vektor, ktorý je zároveň expresným vektorom SpyCas9. SpyCas9 je riadený konštitutívnym promótorom *Ubi4-2* z petržľenu.

3.1.4 Chemikálie

Alfa Aesar: Gellan Gum

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

Thermo Fisher Scientific: 2X Phire Plant Tissue PCR pufor, 6x DNA Loading Dye, 10x DreamTaq pufor, 10x T4 DNA, dNTP Mix 2 mmol·l⁻¹, DreamTaq DNA Polymeráza, Gateway[®] LR Clonase II Enzyme mix, 10x Ligase pufor, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Phire Hot Start II DNA Polymeráza, Proteínkináza K, T4 DNA ligáza

New England BioLabs: 10x NEB pufor 2.1, NEB *BbsI*-HF, RNAsa A

Nippon Genetics: Midori Green Advance

Sigma Aldrich: 2(*N*-morfolino)etánsulfónová kyselina (MES), 1000X Schenk & Hildebrant vitamíny, adenín, agaróza, dodecylsulfát sodný, dusičnan draselný (KNO₃), etanol, etylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA), glukóza, glutamín, glycerol, heptahydrát síranu horečnatého (MgSO₄·7H₂O), hovädzí sérový albumín (BSA), hydroxid sodný (NaOH), hypochlorid sodný (NaClO), chlorid draselný (KCl), chlorid horečnatý (MgCl₂), chlorid sodný (NaCl), chlorid vápenatý (CaCl₂) kvasničný extrakt, kyselina octová, L-glutatión, Luria Bertani (LB) Broth (Miller), LB Broth s agarom (Miller), metanol, Na₂EDTA·2H₂O, octan draselný, prolín, sacharóza, Schenk & Hildebrant základná zmes solí, serín, trypton, Tris(hydroxymetyl)amino-metán, Tris-hydrochlorid, Tween-20

3.1.5 Kultivačné média

Luria Bertani pevné médium

40 g·l ⁻¹	LB Broth s agarom
	milliQ voda
	sterilizované autoklávaním

Luria Bertani tekuté médium

25 g·l ⁻¹	LB Broth
	milliQ voda
	pH 7,2; sterilizované autoklávaním

B5H médium

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

B5Hmédium + antibiotiká

3,1 g·l ⁻¹	Gamborg B5 základná zmes solí
0,5 g·l ⁻¹	KNO ₃
0,25 g·l ⁻¹	MgSO ₄ ·7H ₂ O
0,5 g·l ⁻¹	prolín
30 g·l ⁻¹	sacharóza
4,5 g·l ⁻¹	Gellan Gum
1 ml·l ⁻¹	1000x Gamborg vitamíny (pridáva sa po autoklávovaní)
30 ml·l ⁻¹	roztok aminokyselín (pridáva sa po autoklávovaní)
1 mg·l ⁻¹	2,4-D (pridáva sa po autoklávovaní)
0,1 mg·l ⁻¹	kinetín (pridáva sa po autoklávovaní)
15 mg·l ⁻¹	fosfinitricín (pridáva sa po autoklávovaní)
500 mg·l ⁻¹	tikarcilín
	milliQ voda
	pH 5,7; sterilizované autoklávovaním

B50 médium

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

B50 médium + antibiotiká

3,1 g·l ⁻¹	Gamborg B5 základná zmes solí
0,5 g·l ⁻¹	KNO ₃
0,25 g·l ⁻¹	MgSO ₄ ·7H ₂ O
0,5 g·l ⁻¹	prolín
30 g·l ⁻¹	sacharóza
4,5 g·l ⁻¹	Gellan Gum
1 ml·l ⁻¹	1000x Gamborg vitamíny (pridáva sa po autoklávovaní)
30 ml·l ⁻¹	roztok aminokyselín (pridáva sa po autoklávovaní)
15 mg·l ⁻¹	fosfinotricín (pridáva sa po autoklávovaní)
500 mg·l ⁻¹	tikarcilín (pridáva sa po autoklávovaní)
	milliQ voda
	pH 5,7; sterilizované autoklávovaním

MMS médium

4,3 g·l ⁻¹	Murashige & Skoog základná zmes solí
30 g·l ⁻¹	sacharóza
0,1 g·l ⁻¹	myoinozitol
4,5 g·l ⁻¹	Gellan Gum

1 ml·l⁻¹ 1000x Nitsch & Nitsch vitamíny (pridáva sa po autoklávovaní)
milliQ voda
pH 5,7; sterilizované autoklávovaním

MMS médium + antibiotiká

4,3 g·l⁻¹ Murashige & Skoog základná zmes solí
30 g·l⁻¹ sacharóza
0,1 g·l⁻¹ myoinozitol
4,5 g·l⁻¹ Gellan Gum
1 ml·l⁻¹ 1000x Nitsch & Nitsch vitamíny (pridáva sa po autoklávovaní)
15 mg·l⁻¹ fosfinotricín (pridáva sa po autoklávovaní)
500 mg·l⁻¹ tikarcilín (pridáva sa po autoklávovaní)
milliQ voda
pH 5,7; sterilizované autoklávovaním

MS médium

4,3 g·l⁻¹ Murashige & Skoog základná zmes solí
30 g·l⁻¹ sacharóza
4,5 g·l⁻¹ Gellan Gum
milliQ voda
pH 5,7; sterilizované autoklávovaním

SH médium

3,2 g·l⁻¹ Schenk & Hildebrant základná zmes solí
1 ml·l⁻¹ 1000X Schenk & Hildebrant vitamíny (pridáva sa po autoklávovaní)
30 g·l⁻¹ sacharóza
0,5 g·l⁻¹ 2(*N*-morfolino)etánsulfónová kyselina (MES)
milliQ voda
pH 5,7; sterilizované autoklávovaním

SOC médium

5 g·l ⁻¹	kvasnicový extrakt
20 g·l ⁻¹	trypton
0,584 g·l ⁻¹	NaCl
0,186 g·l ⁻¹	KCl
3,6 g·l ⁻¹	glukóza
0,952 g·l ⁻¹	MgCl ₂
	milliQ voda
	pH 7,5; sterilizované autoklávaním

3.1.6 Roztoky a pufry

TE pufoer

10 mmol·l ⁻¹	Tris-HCl pH 8,0
0,1 mmol·l ⁻¹	EDTA
	miliQ voda
	sterilizované autoklávaním

10x koncentrovaný Restriction digest buffer (restrikčný pufoer)

0,5 ml	50 mmol·l ⁻¹ Tris-HCl pH 7,5
0,1 ml	10 mmol·l ⁻¹ MgCl ₂
1 ml	100 mmol·l ⁻¹ NaCl
0,1 ml	1 % BSA (w/v)
8,3 ml	milliQ voda
	sterilizácia cez bakteriologický filter

1x koncentrovaný Restriction digest buffer (restrikčný pufoer)

1 µl	10x koncentrovaný restričný pufoer
9 µl	milliQ voda

Roztok ampicilínu

0,25 g	ampicilín
5 ml	milliQ voda
	sterilizácia cez bakteriologický filter

Roztok spektinomycínu

0,5 g	spektinomycín
5 ml	milliQ voda
	sterilizácia cez bakteriologický filter

Roztok rifampicín

0,25 g	rifampicín
5 ml	metanol
	sterilizácia cez bakteriologický filter

Roztok fosfinotricínu

0,25 g	fosfinotricín
5 ml	milliQ voda
	sterilizácia cez bakteriologický filter

Roztok kinetínu

1 mg	kinetín
20 μ l	1 mol \cdot l ⁻¹ NaOH
10 ml	milliQ voda
	sterilizácia cez bakteriologický filter

Roztok aminokyselín

6,65 g	glutamín
0,004 g	adenín
0,83 g	serín
0,083 g	L-glutatión
250 ml	milliQ voda
	sterilizácia cez bakteriologický filter

2,4-D roztok

10 mg	2,4-dichlórfenoxyoctová
150 μ mol.l ⁻¹	1 mol.l ⁻¹ NaOH
50 μ l	etanol
10 ml	milliQ voda

sterilizácia cez bakteriologický filter

EDTA (0,5 mol·l⁻¹ zásobný roztok)

18,61 g	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O
80 ml	milliQ voda
	pH 8,0

50x koncentrovaný TAE pufor

121 g	Tris
28,55 ml	kyselina octová
50 ml	0,5 mol·l ⁻¹ EDTA
421,45 ml	milliQ voda
	pH 8,0

1x koncentrovaný TAE pufor

20 ml	50x TAE pufor
980 ml	ddH ₂ O

1 % agarózový gél

1 g	agaróza
100 ml	1x TAE pufor
1 µl	Midori Green Advance

Roztok A

10 mmol·l ⁻¹	Tris-HCl pH 7,6
100 mmol·l ⁻¹	MgCl ₂
	milliQ voda
	sterilizácia cez bakteriologický filter

Roztok B

10 mmol·l ⁻¹	Tris-HCl pH 7,5
100 mmol·l ⁻¹	CaCl ₂
	milliQ voda

sterilizácia cez bakteriologický filter

Roztok C

10 mmol·l⁻¹ Tris-HCl pH 7,5
100 mmol·l⁻¹ CaCl₂
15 % glycerol
milliQ voda
sterilizácia cez bakteriologický filter

Roztok P1

50 mmol·l⁻¹ Tris-HCl pH 8
10 mmol·l⁻¹ EDTA
100 μ·ml⁻¹ RNase A
milliQ voda
sterilizácia cez bakteriologický filter

Roztok P2

200 mmol·l⁻¹ NaOH
1 % SDS (w/v)
milliQ voda
sterilizácia cez bakteriologický filter

Roztok P3

3 mol·l⁻¹ octan draselný
milliQ voda
pH 5,5; sterilizácia cez bakteriologický filter

3.1.7 Prístrojové vybavenie a komerčné kity

Analytické váhy XA110/2X (Radwag; Poľsko), autokláv Sterivap HP IL (MMM Group; Nemecko), centrifúga ROTANTA 460R (Schoeller Instruments, Česko), centrifúga Scan Speed 1730 MR (Scala Scientific; Holandsko), elektroforetická vaňa (Bio-Rad; USA), elektromagnetická miešačka MSH-420 (Boeco; Nemecko),

inkubátor s nastaviteľnou teplotou (Verkon; Česko), laboratórne navážky S1502 (BEL-Engineering; Taliansko), kultivačná miestnosť (Weiss Gallenkamp; Nemecko), Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up XS Kit (Thermo Fisher Scientific; USA), mikrocentrifúga Microfuge16 (Beckman Coulter; USA), MyFuge™ Mini (Benchmark Scientific, USA), NanoDrop (Thermo Fisher Scientific; USA), PCR termocyklér MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad; USA), PCR termocyklér T100 Thermal Cycler (Bio-Rad; USA), pH meter PC 2700 (Eurotech Instruments; Singapur), Phire Plant Direct PCR Kit (ThermoFisher Scientific, USA), plastové tuby (Eppendorf; Nemecko), Plant Direct PCR Kit (Thermo Fisher Scientific; USA), QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN; Nemecko), QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN; Nemecko), spektrofotometr Smart Spec™ plus (Bio-Rad; USA), sterilný laminárny box (Merci; Česko), teplotný sterilizátor (Schuett-biotec; Nemecko), termoblok ThermoStat C (Eppendorf; Nemecko), trepačka s nastaviteľnou teplotou inkubácie ES-20 (Biosan; Lotyšsko), UV transiluminátor (Bio-Rad; USA), UV vizualizátor Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad; USA), vortex Microspin FV2400 (Labnet; USA)

3.1.8 Software

ApE - A plasmid Editor, ImageLab (BioRad; USA), Microsoft 365, SnapGene (Insightful Science; USA), SnapGene Viewer (Insightful Science; USA); Zeiss Zen 3.5 (blue edition, Nemecko)

3.2 Metódy

3.2.1 Príprava chemokompetentných buniek

Chemokompetentné bunky boli v tejto práci využité na transformáciu tepelným šokom. *E. coli* One Shot™ TOP10 slúžili na propagáciu vstupného a destinačného vektora. Chemokompetentné bunky *A. tumefaciens* GV3101 slúžili k propagácii destinačných vektorov a boli použité k stabilnej transformácii lucerny. Príprava jednotlivých chemokompetentných buniek je uvedená nižšie.

3.2.1.1 *Escherichia coli* One Shot™ TOP10 chemokompetentné bunky

Pre prípravu chemokompetentných buniek *E. coli* bola použitá kryokonzerva buniek *E. coli* kmeňa TOP10. Zo zamrznutej konzervy bola sterilne v laminárnom boxe za pomoci sterilnej plastovej špičky odškrabnutá malá časť kultúry do plastovej nádoby

(50 ml tuba) s objemom 3 ml tekutého LB média bez antibiotík. Pripravená kultúra v plastovej nádobe bola umiestnená do inkubátora a kultivovaná cez noc, za stáleho miešania pri 200 RPM a 37 °C.

Druhý deň ráno boli pripravené tri roztoky (A, B a C). Roztok A slúžil k rozrušeniu bunkových stien gram-negatívnych buniek *E. coli*. Roztok B slúžil k vypláchnutiu zvyškov $MgCl_2$ obsiahnutého v roztoku A. Roztok C slúžil k uchovávaní chemokompetentných kultúr *E. coli* TOP10 v mrazničke pri -80 °C.

Kultúra buniek *E. coli* TOP10 v 3 ml LB tekutého média, ktorá rástla cez noc v inkubátore, bola v laminárnom boxe sterilne preliata do čistých Erlenmayerových baniek s obsahom 100 ml LB tekutého média bez antibiotík. Takto pripravené banky boli prekryté sterilným alobalom a ponechané v inkubátore na 37 °C, 200 RPM do namerania $OD_{600nm} = 0,4 - 0,6$. Parameter OD_{600nm} bol priebežne meraný na spektrofotometri. Po dosiahnutí cieľenej hodnoty optickej denzity, bola kultúra buniek sterilne preliata do dvoch 50 ml plastových tub, ponechaná na ľade 10 min. a následne stočená pri 4 °C, 6800 g, 20 min.

Po centrifugácii boli 50 ml plastové tuby vybraté z centrifúgy a supernatanty zliate. Sedimenty boli rozpustené v 1250 μ l na 4 °C vychladenom roztoku A v laminárnom boxe a ponechané na ľade 30 min. Následne boli kultúry buniek v roztoku A stočené v centrifúge pri 4 °C, 6800 g, 20 min. Po centrifugácii boli supernatanty zliate. Sedimenty boli rozpustené v 1250 μ l na 4 °C vychladenom roztoku B v laminárnom boxe a ponechané na ľade 30 min. Následne boli kultúry buniek v roztoku B stočené v centrifúge pri 4 °C, 6800 g, 20 min. Supernatanty boli zliate a sedimenty rozpustené v 2 ml na 4 °C vychladenom roztoku C.

Takto pripravené kultúry chemokompetentných buniek *E. coli* TOP10 boli pomocou pipety za stáleho chladenia na ľade prenesené po 50 μ l do sterilných, vychladených, plastových, uzatvárateľných skúmaviek. Následne boli zmrazené v tekutom dusíku a skladované v mrazničke pri -80 °C.

3.2.1.2 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 chemokompetentné bunky

Pre prípravu chemokompetentných buniek *A. tumefaciens* bola použitá narastená vyselektovaná kolónia *A. tumefaciens* rastúca na LB pevnom médiu, ktorá bola odobratá sterilným špáratkom do 5 ml tekutého LB média s príslušným antibiotikom (Rif^R) a nechala sa kultivovať pri 28 °C v tme za stáleho miešania pri 200 RPM cez noc.

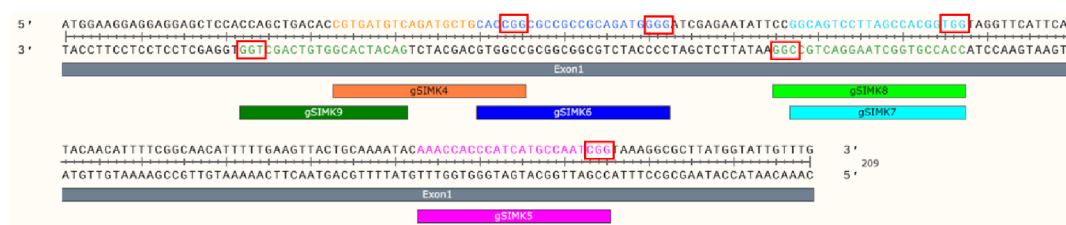
Kultúra buniek *A. tumefaciens* GV3101 v 5 ml LB tekutého média, ktorá rástla cez noc v inkubátore, bola v laminárnom boxe sterilne preliata do čistých Erlenmayerových baniek s obsahom 100 ml LB tekutého média bez antibiotík. Takto pripravené banky boli prekryté sterilným alobalom a ponechané v inkubátore na 28 °C, 200 RPM do namerania $OD_{600nm} = 0,4 - 0,6$. Parameter OD_{600nm} bol priebežne meraný na spektrofotometri. Po dosiahnutí cieľenej hodnoty optickej denzity, bola kultúra buniek sterilne preliata do dvoch 50 ml plastových tub, ponechaná na ľade 30 min. a následne stočená pri 4 °C, 6800 g, 20 min.

Po centrifugácii sa supernanant vylial a sediment sa rozpustil v 2 ml vychladeného $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ CaCl}_2$. Rozpustený sediment sa nechal inkubovať na ľade 3 h. Po inkubácii sa k suspenzii buniek pridal glycerol (20 % koncentrácia k celkovému objemu) a suspenzia sa preniesla po 100 μl do vymrazených (-80°C) plastových skúmaviek. Takto pripravené chemokompetentné bunky *A. tumefaciens* GV3101 boli zmrazené v tekutom dusíku a skladované v mrazničke pri -80 °C.

3.2.2 Metodický postup pri príprave konštruktov pre CRISPR/Cas9 mutagenézu *SIMK* génu

3.2.2.1 Návrh navádzacích sekvencií gRNA

Pre každú kandidátnu cieľovú sekvenciu (protospacer) bol objednaný priamy alebo spätný primer. Navádzacie sekvencie gRNA boli navrhnuté pomocou programu CRISPR-P 2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>). Sekvencia *SIMK* génu bola získaná z referenčnej databázy lucerny siatej, kultivar XinJianDaYe (MS.gene39573; Chen et al., 2020). Pre editovanie *SIMK* génu boli vybraté tie gRNA, ktoré mali maximálnu špecifickosť zacielenia (vysoké on-skóre) a zároveň čo najnižšiu aktivitu nešpecifického zacielenia (nízke off-skóre) nachádzajúce sa na 1. exóne génu *SIMK*. Jednotlivé *SIMK*gRNA4-9 sekvencie a ich zacielenie je znázornené na Obr. 5.



Obrázok 5. Sekvencia 1. exónu *SIMK* génu u lucerny siatej. Farebne vyznačené navádzacie *SIMK*gRNA4-9 s trojnukleotidovými prvkami (NGG), označované ako PAM sekvencia (červený obdĺžnik), pred ktorým by malo nastať štiepenie DNA a tým vzniknúť mutácia.

Pre následnú ligáciu bolo potrebné pridať pred navrhnuté gRNA štvornukleotidové presahy, ktoré slúžia ako lepidlo konce pre ligáciu do vstupného vektora pEn-Chimera:



- Priama (forward) sekvencia: 5' - ATTG + SIMKgRNA
- Spätná (reverse) sekvencia: 5' - AAAC + obrátená sekvencia SIMKgRNA

Jednotlivé primery gRNA so štvornukleotidovými presahmi sú prehľadne uvedené v Tab. 1. Pripravené vektory obsahujúce navádzacie SIMKgRNA sekvencie boli overené pomocou PCR alebo pomocou Sanger sekvenovania s použitím primerov uvedených v Tab. 2.

Tab. 1: Sekvencie použitých primerov pre gén *SIMK* so štvornukleotidovými presahmi ATTG pred priamou (žlto zvýraznené) a s AAAC pred spätnou gRNA sekvenciou (červeno zvýraznené).

Názov primera	Sekvencia primerov 5' → 3'
SIMKgRNA4 fw	ATTG CGTGATGTCAGATGCTGCAC
SIMKgRNA4 rev	AAAC GTGCAGCATCTGACATCACG
SIMKgRNA5 fw	ATTG AAACCACCCATCATGCCAAT
SIMKgRNA5 rev	AAAC ATTGGCATGATGGGTGGTTT
SIMKgRNA6 fw	ATTG CACCGGCGCCGCCGCAGATG
SIMKgRNA6 rev	AAAC CATCTGCGGCGGCCGCCGGTG
SIMKgRNA7 fw	ATTG GGCAGTCCTTAGCCACGG
SIMKgRNA7 rev	AAAC CCGTGGCTAAGGACTGCC
SIMKgRNA8 fw	ATTG CCACCGTGGCTAAGGACTGC
SIMKgRNA8 rev	AAAC GCAGTCCTTAGCCACGGTGG
SIMKgRNA9 fw	ATTG GACATCACGGTGTGTCAGC
SIMKgRNA9 rev	AAAC GCTGACACCGTGATGTC

Fw = forward (priama) sekvencia; rev = reverse (spätná) sekvencia.

Tab. 2: Použité primery pre PCR reakcie a sekvenovanie.

Názov primera	Sekvencia primerov 5' → 3'
SS42	TCCCAGGATTAGAATGATTAGG
SS43	CGACTAAGGGTTTCTTATATGC
SS61	GAGCTCCAGGCCTCCCAGCTTTCG
SS129	CACAGGAAACAGCTATGAC

Primery použité k PCR a navádzacie gRNA primery boli objednané u firmy Eurofins Genomics AT. Všetky primery boli nariadené podľa údajov od výrobcu. Následne boli riedené 10x v objeme 100 µl. K 10µl primeru bolo pridané 90 µl PCR vody.

3.2.2.2 Dimerizácia navádzacích gRNA sekvencií (primer annealing)

Do mikroskúmavky s 25 µl PCR vody sa pridalo 10 µl priameho primeru (SIMKgRNA4-9 fw) a 10 µl spätného primeru (SIMKgRNA4-9 rev). Následne sa pridalo 5 µl 1x koncentrovaného restričného pufru. Mikroskúmavky boli prenesené do termobloku nahriateho na 95 °C a zohrievali sa po dobu 5 min. Následne boli prenesené na ľad a chladili sa 10 min. Vzniknuté dimerizované primery (SIMKgRNA4-9) boli 10x zriedené. Tento postup bol použitý u všetkých navrhnutých primerov.

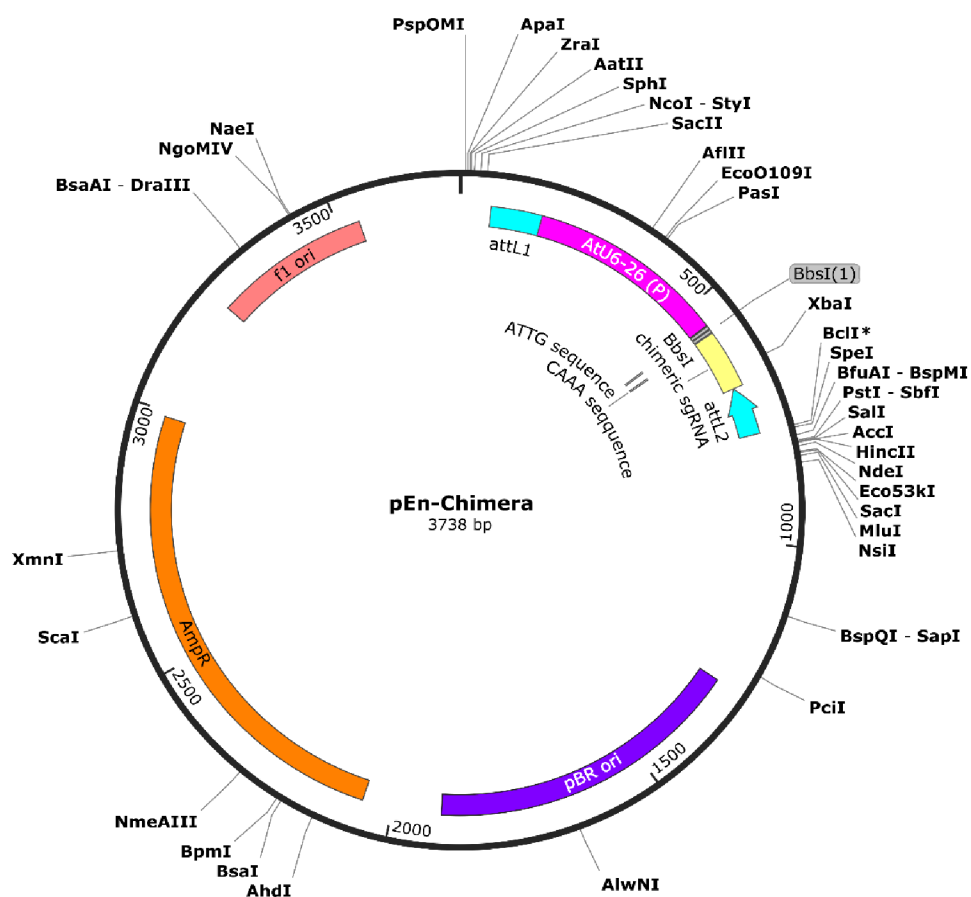
3.2.2.3 Restričné štiepenie vstupného vektora pEn-Chimera

Ako vstupný vektor bol použitý komerčný vektor pEn-Chimera (Obr. 6) nesúci gén pre rezistenciu voči ampicilínu (Amp^R; Fauser et al., 2014). Vo vektore za miestom vloženia dimerizovaných navádzacích gRNA sekvencií sa nachádza sgRNA kostra (scaffold), ktorá slúži na naviazanie endonukleázy Cas9. Kompletná sgRNA je exprimovaná pod promótorom *Arabidopsis thaliana*; (*AtU6-26*). Celá táto sekvencia je ohraničená úsekmi attL1 a attL2, ktoré slúžia k správnej vložení do destinačného vektora pDe-Cas9 v LR reakcii pomocou Multisite Gateway[®] klonovania.

Pre restričné štiepenie vstupného vektora pEn-Chimera bol použitý restričný enzým *BbsI-HF*, vďaka ktorému vznikli lepivé konce pre správnu ligáciu dimerizovaných navádzacích gRNA sekvencií so štvornukleotidovými presahmi. Zloženie restričnej zmesi je uvedené v Tab. 3. Reakcia prebiehala po dobu 4 h pri teplote 37 °C.

Tab. 3: Restričné štiepenie vstupného plazmidu pEn-Chimera restričným enzýmom *BbsI-HF*.

Použité chemikálie	Množstvo
Vstupný vektor pEn-Chimera (nerozštiepený)	14 µl
10x NEB pufo 2.1	5 µl
NEB <i>BbsI-HF</i>	2,5 µl
PCR voda	28,5 µl



Obrázok 6. Mapa vstupného vektora pEn-Chimera.

3.2.2.4 DNA agarózová elektroforéza

Vstupný vektor pEn-Chimera bol po restričnom štiepení overený pomocou DNA agarózovej elektroforézy. Metóda agarózovej elektroforézy bola použitá v práci niekoľkokrát pre rôzne účely, ale hlavne na overenie PCR produktov. Nižšie je uvedený základný postup, ktorý sa nelíši v celej práci.

Do Erlemayerovej banky bolo pridaných 0,9 g agarózy spolu s 90 ml 1x TAE pufu. Táto zmes bol zahriatá približne 2 min. v mikrovlnnej rúre a schladená vo vaničke s vodou. Následne bolo pridané fluorescenčné farbivo Midori Green Advance a gél bol naliaty do formy s hrebeňom. Stuhnutý gél bol prenesený do elektroforetickej vane s obsahom 1x TAE pufu. K 5 množstvám vzorky bolo pridané 1 množstvo 6x Loading Dye (nanášací pufor) a po odstránení hrebeňa boli vzorky nanesené do jamiek gélu. Ako marker molekulej veľkosti slúžilo 5 μ l GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder. Vaňa bola prikrytá a pripojená k zdroju. Nastavilo sa konštantné napätie 80 V, v elektrickom prúde 400 mA po dobu 40 min. Po rozdelení vzoriek sa gél vyvolal vo vizualizátore Gel Doc™ EZ Imager v programe ImageLab.

3.2.2.5 Extrakcia DNA z agarózového gélu

Po skončení restrikčného štiepenia vstupného vektora bolo k 50 µl reakčnej zmesi pridaných 10 µl 6x Loading Dye a pripravená zmes bola nanosená na agarózový gél. Overený restrikčne naštiepený vstupný vektor pEn-Chimera bol následne extrahovaný z 1 % agarózového gélu. DNA extrakcia z agarózového gélu bola urobená pomocou komerčného kitu Macherey-Nagel™ NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up XS. Vyrezaný pás gélu s požadovanou veľkosťou sa preniesol do predom odvážanej 2 ml plastovej skúmavky a obsah sa zväžil. Na každých 100 mg gélu sa pridalo 200 µl neriedeného NTI roztoku. Zmes sa ponechala v termobloku pri 50 °C do úplného rozpustenia gélu.

Do NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up XS kolonky, sa pridalo 700 µl vzorky. Na kolonke došlo k zachyteniu DNA na membránu oxidu kremičitého. Následná centrifugácia prebehla pri 11 000 g, 1 min. pri izbovej teplote. Supernatant sa vylial a kolonka sa prečistila pridaním 700 µl NT3 roztoku a centrifugáciou pri 11 000 g, po dobu 1 min. pri izbovej teplote. Pre dôsledné premytie sa tento krok zopakoval ešte raz. Po premytí sa kolonka vysušila centrifugáciou pri izbovej teplote, 11 000 g, 3 min.

Na membránu sa pridalo 10 µl PCR vody. Zachytená DNA sa vplyvom vody uvolnila do novej plastovej skúmavky. Výsledná koncentrácia extrahovaného vektora pEn-Chimera bola zmeraná pomocou NanoDropu.

3.2.2.6 Ligácia gRNA do rozštiepeného vstupného vektora pEn-Chimera

Ligácia prebiehala medzi 6 dimerizovanými navádzacími gRNA sekvenciami a rozštiepeným vstupným vektorom pEn-Chimera. Zloženie ligačnej zmesi je uvedené v Tab. 4. Táto zmes bola inkubovaná cez noc pri 16 °C a T4 DNA ligáza bola následne inhibovaná pri 65 °C po dobu 10 min.

Tab. 4: Zloženie ligačnej zmesi.

Použité chemikálie	Množstvo
Lineárny vstupný vektor pEn-Chimera (rozštiepený)	60 ng
Dimerizované gRNA primery	1 µl
10x T4 DNA Ligase buffer (ligačný pufor)	2 µl
T4 DNA ligáza	1 µl
PCR voda	Doplňte do 20 µl

3.2.2.7 Transformácia *Escherichia coli* vstupným vektorom pEn-Chimera s inzertom

K transformácii vektora pEn-Chimera s inzertom cieľovej navádzacej gRNA sekvencie boli použité pripravené chemicky kompetentné bunky *E. coli* TOP10 podľa postupu uvedeného v podkapitole 3.2.1.1. Postup transformácie:

K 50 μ l chemicky kompetentných buniek *E. coli* TOP10 bolo pridaných 5 μ l z predchádzajúcej ligačnej zmesi pre každú variantu dimerizovaných gRNA primerov samostatne. Zmes sa nechala inkubovať 30 min. na ľade. Po inkubácii na ľade bola suspenzia umiestnená do termobloku nahriateho na 42 °C po dobu 45 s a bezprostredne potom sa suspenzia opäť schladila po dobu 3 min. na ľade. K suspenzii buniek bolo pridaných 300 μ l SOC média a zmes bola kultivovaná vo vodorovnej polohe pri 37 °C po dobu 1,5 h v inkubátore za stáleho miešania pri 190 RPM. Suspenzia transformovaných buniek v objeme 150 μ l sa rozotrela na vopred pripravené okrúhle Petriho misky s 25 ml LB tuhým médiom, ktoré obsahovalo 50 μ l selekčného antibiotika (Amp^R). Kultivácia baktérií na pevnom LB médiu (Amp^R) prebiehala cez noc pri 37 °C.

3.2.2.8 Metóda colony PCR

Metóda colony PCR (polymerázová reťazová reakcia) slúžila na overenie narastených kolónií transformovaných baktérií. Touto metódou je možné zistiť, či vyselektované kolónie na pevnom LB médiu so selekčným antibiotikom naozaj obsahujú vstupný plazmid. Pre colony PCR sa využíva dvojica primerov, vďaka ktorým sa amplifikuje požadovaný úsek DNA o známej molekulovej veľkosti. PCR produkt je následne overený pomocou 1 % DNA agarózovej elektroforézy.

Pre každú variantu klonovaného inzertu gRNA bol náhodne vybraný určitý počet kolónií. Tie sa pomocou plastovej sterilnej pipetovej špičky preniesli do 10 μ l PCR vody a obsah sa premiešal. Následne bola pripravená PCR reakčná zmes uvedená v Tab. 5. Na amplifikáciu DNA úseku bol použitý priamy primer SIMKgRNAX a spätný SS129 primer. Reakčná zmes bola prenesená pomocou automatickej pipety do PCR skúmaviek po 9 μ l do každej skúmavky a nakoniec sa pridal 1 μ l vzorky pripravenej z jednotlivých kolónií transformovaných baktérií. PCR reakcia prebiehala v PCR termocykléri s nastaveným programom uvedeným v Tab. 6. PCR produkt bol overený pomocou DNA agarózovej elektroforézy.

Tab. 5: Zloženie PCR reakčnej zmesi pre DreamTaq polymerázu.

Použité chemikálie	Množstvo
PCR voda	6,75 μ l
10X DreamTaq pufor	1 μ l
2 mmol·l ⁻¹ dNTP Mix	0,2 μ l
10 mmol·l ⁻¹ SIMKgRNA4-9 fw	0,5 μ l
10 mmol·l ⁻¹ SS 129 primer	0,5 μ l
DreamTaq DNA Polymeráza	0,05 μ l
pDNA	1 μ l
Celkové množstvo reakcie	10 μl

Tab. 6: Teplotný program colony PCR s použitím DreamTaq polymerázy.

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklov
Vstupná denaturácia	95 °C	3 min.	1x
Denaturácia	95 °C	30 s	
Nasadanie primerov	56 °C	30 s	30x
Elongácia	72 °C	1 min.	
Finálna elongácia	72 °C	15 min.	1x
Schladenie	4 °C	∞	-

3.2.2.9 Kultivácia pozitívnych transformovaných kolónií *Escherichia coli* so vstupným vektorom pEn-Chimera s inzertom

Po skončení PCR reakcie boli PCR produkty overené pomocou DNA agarózovej elektroforézy. Pre každú klonovanú variantu (dimerizované navádzacie gRNA sekvencie) bolo vybratých aspoň 5 kolónií, ktoré boli následne kultivované v 10 ml tekutého LB média so selekčným antibiotikom (Amp^R). Tekuté LB médium s bakteriálnymi kultúrami bolo kultivované cez noc pri 37 °C za stáleho trepania pri 200 RPM.

3.2.2.10 Izolácia plazmidovej DNA pomocou miniprepu P1P2P3

Na získanie plazmidovej DNA (pDNA) bola použitá cez noc narastená kultúra *E. coli* transformovaná vstupným vektorom pEn-Chimera s príslušným inzertom pre navádzaciu gRNA sekvenciu. Zo zakalených tekutých bakteriálnych suspenzií boli odobraté 2 ml pre izoláciu pDNA a prenesené do 2 ml plastových skúmaviek (Eppendorf). Plastové skúmavky boli stočené v centrifúge pri izbovej teplote po dobu 3 min. na 15600 g. Po centrifugácii bol supernatant vyliaty a k sedimentu sa pridalo 250 μ l P1 roztoku. P1 roztok obsahoval RNAsu A. Sediment s P1 pufrom bol resuspendovaný za využitia vortexu. Následne sa k sedimentu pridalo 250 μ l P2 roztoku, ktorý slúžil k lýze buniek. Nakoniec sa pridalo 250 μ l P3 roztoku. P3 roztok

zaist'oval neutralizáciu a vyzrážanie bunkových stien baktérií. Takto pripravené 2 ml plastové tuby boli vložené do centrifúgy a stočené pri izbovej teplote po dobu 20 min. pri 15600 g. Po centrifugácii bol supernatant prenesený do čistých vychladených 2 ml plastových túb s objemom 1 ml absolútneho etanolu. Vzorky boli uložené do mrazničky na -20 °C po dobu 30 min., k precipitácii pDNA. Po tejto dobe boli vzorky stočené v centrifúge pri izbovej teplote po dobu 30 min. pri 15600 g. Následne bol supernatant odstránený a vzniknutý sediment sa nechal vysušiť a rozpustiť v 30 µl PCR vody.

Pripravené vzorky s pDNA boli následne prečistené pomocou komerčného kitu QIAprep Spin Miniprep. K celému objemu 30 µl sa pridalo 150 µl PB pufru a celý obsah plastovej tuby sa preniesol na špeciálne kolonky určené k záchytu pDNA. Kolonky so supernatantom boli vložené do centrifúgy a stočené po dobu 1 min. pri izbovej teplote pri 15600 g. Pretečená tekutina bola zachytená v spodnej časti koloniek a po stočení vyliata. Na kolonky bolo aplikovaných 750 µl PE pufru a stočené v centrifúge pri izbovej teplote 1 min. pri 15600 g. Zvyšok tekutiny bol odliaty. Takto prázdne kolonky sa stočili ešte ďalších 6 min. pri izbovej teplote, 15600 g, aby sa kolonky vysušili. Následne sa aplikovalo 20 µl PCR vody. Voda slúžila k uvoľneniu pDNA z kolonky a jej elúciu. Kolonky s nanosenou PCR vodou sa ponechali asi 1 min. pri izbovej teplote a následne boli stočené pri izbovej teplote 2 min. pri 15600 g. Takto pripravené vzorky s pDNA boli následne overené sekvenáciou a určené pre následnú rekombináciu do destinačného vektora pDe-Cas9. Koncentrácia vyizolovanej pDNA bola zmeraná pomocou NanoDropu.

3.2.2.11 Sekvenovanie vstupného vektora pEn-Chimera s inzertom

Sekvenovanie vzoriek bolo urobené firmou SEQme a pre sekvenáciu bol použitý primer SS42 uvedený v Tab. 2. Z každej klonovanej varianty vyizolovaných plazmidov (pEn-Chimera + inzert cieľovej navádzacej gRNA) boli pripravené vždy 2 vzorky pre sekvenovanie. Obidve vzorky obsahovali 500 ng plazmidu a 2,5 µl (10 mmol·l⁻¹) SS42 primeru, objem vzoriek bol doplnený na 10 µl PCR vodou. Výsledky sekvenovania takto pripravených vzoriek potvrdili, či sa vo vstupnom vektore pEn-Chimera nachádza inzert s cieľovou sekvenciou. K porovnaniu sekvencií bol použitý program ApE.

3.2.2.12 Tvorba bakteriálnych konzerv

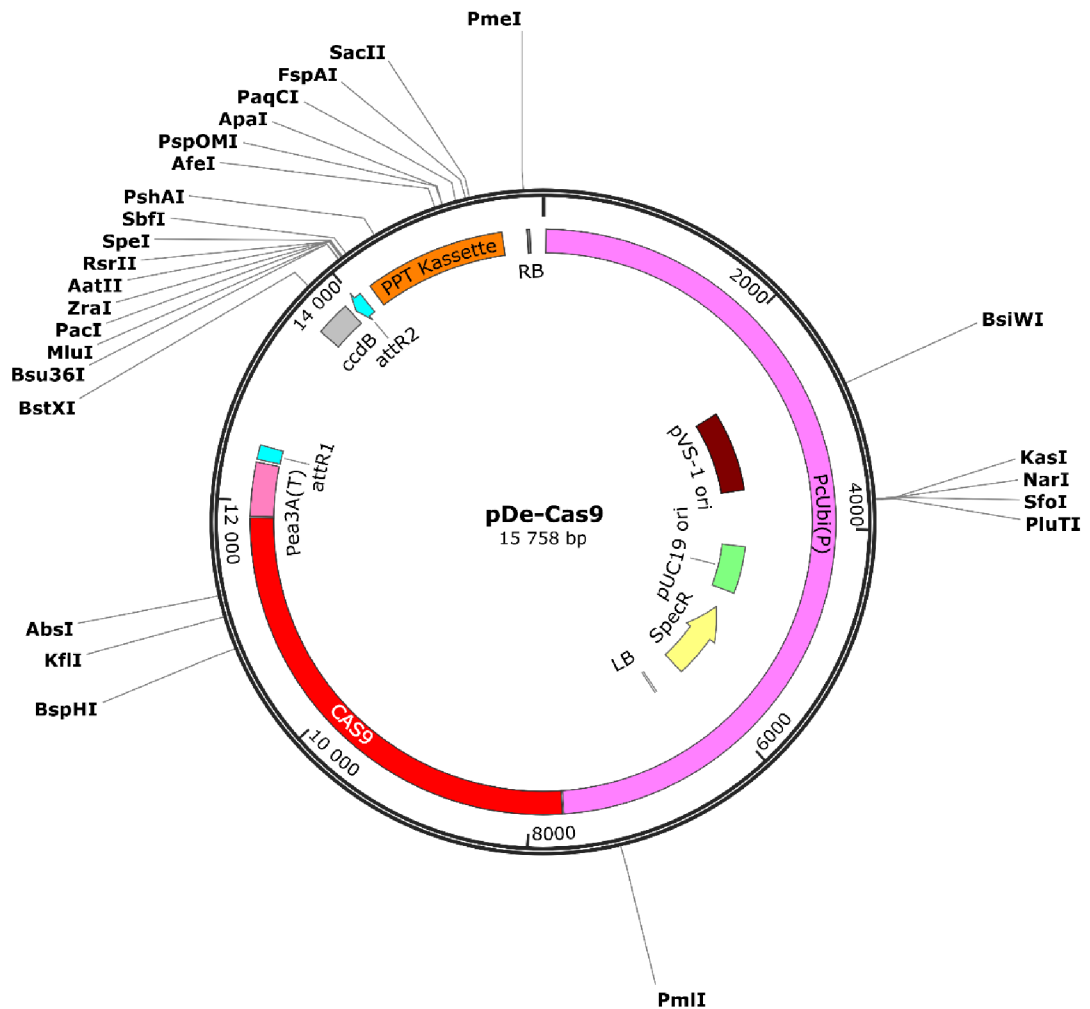
Osekvenované bakteriálne kolónie transformovaných buniek *E. coli* s cieľovým inzertom boli kultivované v 4 ml tekutého LB média so selekčným antibiotikom (Amp^R) počas noci za stáleho miešania pri 200 RPM a pri teplote 37 °C. Z narastených bakteriálnych kultúr bolo odobratých 600 µl a prenesených sterilne v laminárnom boxe do sterilnej 2ml plastovej skúmavky. K tomuto objemu bolo pridaných 600 µl 50 % glycerolu. Vzorky boli poriadne premiešané, zmrazené v tekutom dusíku a uložené do mrazničky na -80 °C.

3.2.2.13 Príprava finálneho destinačného vektora pDe-Cas9 s inzertom

Ako destinačný vektor pre prípravu konštruktov na CRISPR/Cas9 mutagenézu *SIMK* génu bol použitý komerčne dostupný plazmid pDe-Cas9 (Obr. 7; Fauser et al., 2014). Vektor obsahuje gén pre endonukleázu Cas9, ktorá je exprimovaná pod ubiquitínovým promótorom z petržlenu (*Petroselinum crispum* ubiquitin; *PcUbiP*). Vektor nesie rezistenciu voči Spe^R. Požadovaná sekvencia (attL1 - *AtU6-26* – sgRNA – attL2) zo vstupného vektora pEn-Chimera bola vložená pomocou rekombinácie v LR reakcii Multisite Gateway[®] klonovacieho systému do miesta medzi sekvenciami attR1 a attR2. Medzi attR miestami sa nachádza *ccdB* gén, ktorý bol behom LR reakcie s využitím LR klonázy II vymenený za sekvenciu zo vstupného vektora pEn-Chimera s inzertom. Tým bola prenesená finálna sgRNA vrátane promótoru za vzniku finálneho konštrukt (expresný klon). Zloženie zmesi použitej pri LR reakcii je uvedené v Tab. 7. Pred samotnou LR reakciou sa vektory nariadili na požadované množstvá uvedené v Tab. 7. Vzorky sa nechali kultivovať cez noc pri 25 °C. Ráno po inkubácii sa vzorky ošetrili Proteínkinázou K po dobu 10 min. pri 37 °C, čím došlo k inaktivácii LR klonázy II. Takto pripravené vzorky boli následne transformované do chemokompetentých buniek *E. coli* TOP10 pripravené podľa protokolu uvedeného v podkapitole 3.2.1.1.

Tab. 7: Zloženie reakčnej zmesi pre LR reakciu.

Použité chemikálie	Množstvo
Vstupný vektor s inzertom	25 ng
Destinačný vektor	100 ng
TE pufor pH 8,0	2 µl
LR klonáza II	1 µl
Proteínkináza K	0,5 µl



Obrázok 7. Schéma destinačného vektora pDe-Cas9.

3.2.2.14 Transformácia *Escherichia coli* destinačným vektorom pDe-Cas9 s inzertom

K transformácii boli použité pripravené chemicky kompetentné bunky *E. coli* TOP10 podľa postupu uvedeného v podkapitole 3.2.1.1. Konzervy chemokompetentných buniek *E. coli* TOP10 v 2 ml uzatvárateľných skúmavkách, umiestnených v mrazničke na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, boli vytiahnuté a ponechané na ľade rozmraziť. Po skončení LR reakcie v príprave destinačného vektora pDe-Cas9 bolo 5 μl reakčnej zmesi pridané k chemokompetentným bunkám *E. coli* TOP10 a bola prevedená transformácia tepelným šokom podľa postupu uvedenom v podkapitole 3.2.2.7. Jediný rozdiel spočíval v použití selekčného antibiotika. Pre selekciu transformovaných buniek s destinačným vektorom pDe-Cas9 bolo použité antibiotikum Spe^R.

3.2.2.15 Metóda colony PCR a DNA agarózová elektroforéza

Metóda colony PCR bola použitá k overeniu *E. coli* transformovaných buniek destinačným vektorom pDe-Cas9 s inzertom cieľovej navádzacej gRNA sekvencie. Základný postup použitý pri overovaní je uvedený v podkapitole 3.2.2.8. Na overenie prítomnosti destinačného vektora pDe-Cas9 s inzertom bola použitá Phire polymeráza, priamy SS61 primer a spätný gRNA (SIMKgRNAX rev) primer. Zloženie PCR reakčnej zmesi pre Phire polymerázu je uvedený v Tab. 8. PCR reakcia prebiehala v PCR termocykléri s nastaveným programom uvedeným v Tab. 9.

PCR produkty boli overené pomocou 1 % DNA agarózovej elektroforézy podľa postupu uvedenom v podkapitole 3.2.2.4. Kultivácia bakteriálnych buniek *E. coli* s vneseným vektorom pDe-Cas9 s inzertom bola prevedená obdobným spôsobom ako je uvedené v podkapitole 3.2.2.9. Jediným rozdielom bolo použitie Spe^R. Suspenzie kultúr boli kultivované cez noc pri 37 °C za neustáleho miešania pri 200 RPM. Na druhý deň bola zo suspenzie kultúr narastených transformovaných buniek *E. coli* s destinačným vektorom s inzertom vyizolovaná pDNA.

Tab. 8: Zloženie PCR reakčnej zmesi pre Phire polymerázu.

Použité chemikálie	Množstvo
PCR voda	2,3 µl
2x Phire Plant Tissue PCR pufor	5 µl
10 µmol·l ⁻¹ SS61 primer	1 µl
10 µmol·l ⁻¹ SIMKgRNA4-9 rev	1 µl
Phire Hot Start II DNA Polymeráza	0,2 µl
pDNA	0,5 µl
Celkový objem reakcie	10 µl

Tab. 9: Tepelný program pre colony PCR s použitím Phire polymerázy.

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

3.2.2.16 Izolácia plazmidovej DNA pomocou QIAprep Spin Miniprep Kitu

Pre izoláciu pDNA bola použitá cez noc narastená bakteriálna suspenzia. Do 2 ml plastovej skúmavky boli prenesené 2 ml bakteriálnej suspenzie, ktorá bola stočená v centrifúge pri izbovej teplote 3 min. pri 6800 g. Supernatant sa vylial a k sedimentu bolo pridaných sa 250 μ l P1 roztoku. Následne bolo pridaných 250 μ l roztoku P2 a 350 μ l N3 roztoku. Vzniknutá zmes bola stočená pri izbovej teplote 10 min. 15600 g.

Po centrifugácii bolo 800 μ l supernatantu prenesených do QIAprep 2.0 spin kolonky a zmes bola stočená v centrifúge 1 min. pri 15600 g.

Na kolonky bolo následne aplikovaných 750 μ l PE pufri, skúmavky boli stočené v centrifúge pri izbovej teplote 1 min. pri 15600 g. Zvyšok tekutiny bol odliaty. Prázdne kolonky sa stočili ďalších 6 min. pri izbovej teplote, aby sa kolonky vysušili. Následne sa na kolonky aplikovalo 20 μ l PCR vody. Voda slúžila pre uvoľnenie pDNA z kolonky. Kolonky s nanosenou PCR vodou boli stočené pri izbovej teplote 2 min. pri 15600 g. Koncentrácia vyizolovanej pDNA bola zmeraná pomocou NanoDropu.

3.2.2.17 Sekvenovanie destinačného vektora pDe-Cas9 s inzertom

Sekvenovanie vzoriek bolo urobené firmou SEQme a pre sekvenáciu bol použitý primer SS42 a SS61 uvedený v Tab. 2. Z každej klonovanej varianty vyizolovaných plazmidov (pDe-Cas9 + inzert cieľovej navádzacej gRNA) boli pripravené vždy 2 vzorky pre sekvenovanie. Obidve vzorky obsahovali 500 ng plazmidu a 2,5 μ l ($10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) SS42 primeru alebo SS61 primeru, objem vzoriek bol doplnený na 10 μ l PCR vody. Výsledky sekvenovania takto pripravených vzoriek potvrdili, či sa v destinačnom vektore pDe-Cas9 nachádza inzert s cieľovou sekvenciou. K porovnaniu sekvencií bol použitý program ApE.

3.2.2.18 Tvorba bakteriálnych konzerv

Osekvenované bakteriálne kolónie transformovaných buniek *E. coli* s cieľovým inzertom boli kultivované v 4 ml tekutého LB média so selekčným antibiotikom (Spe^R) počas noci za stáleho miešania pri 200 RPM, pri teplote 37 °C. Z narastených bakteriálnych kultúr bolo odobratých 600 μ l a sterilne prenesených v laminárnom boxe do sterilnej 2 ml plastovej skúmavky. K tomuto objemu bolo pridaných 600 μ l 50 % glycerolu. Vzorky boli poriadne premiešané, zmrazené v tekutom dusíku a uložené do mrazničky na -80 °C.

3.2.2.19 Transformácia *Agrobacterium tumefaciens* destinačným vektorom pDe-Cas9 s inzertom

Chemokompetentné bunky *A. tumefaciens* GV3101 boli transformované destinačným vektorom pDe-Cas9 s inzertom cieľovej navádzacej gRNA sekvencie.

Postup transformácie: K 200 μ l chemokompetentných buniek *A. tumefaciens* GV3101 v 2 ml plastových skúmavkách bolo pridaných 10 μ l vyzolovanej pDNA destinačného vektora pDe-Cas9 s cieľovým inzertom. Bakteriálna suspenzia sa opatrne premiešala špičkou pipety a nechala sa inkubovať na ľade po dobu 40 min. Po inkubácii boli 2 ml plastové skúmavky zmrazené po dobu 5 min. v tekutom dusíku. Po vybratí z tekutého dusíka boli vzorky inkubované 15 min. pri izbovej teplote. K zmesi bolo pridaných 400 μ l SOC média a zmes sa nechala inkubovať pri 28 °C aspoň 2 h v tme za neustáleho miešania pri 200 RPM. Bakteriálna suspenzia bola rozotretá na Petriho misky s 25 ml pevného LB média, ktoré obsahovalo špecifické antibiotiká (Spe^R a Rif^R). Takto pripravené misky sa nechali kultivovať v tme pri 28 °C, dva dni. Narastené kolónie boli overené metódou colony PCR (podkapitola 3.2.2.8) s primermi SS61 a SIMKgRNA4- 9 rev. Po overení sa pozitívne bakteriálne bunky kultivovali v 10 ml LB tekutého média s prídavkom antibiotík cez noc v tme pri 28°C za neustáleho miešania pri 200 RPM.

3.2.2.20 Metóda colony PCR, DNA agarózová elektroforéza a tvorba bakteriálnych konzerv

Metóda colony PCR bola použitá k overeniu *A. tumefaciens* transformovaných buniek destinačným vektorom pDe-Cas9 s inzertom cieľovej navádzacej gRNA sekvencie. Základný postup použitý pri overovaní je uvedený v podkapitole 3.2.2.8. Na overenie prítomnosti destinačného vektora pDe-Cas9 s inzertom cieľovej navádzacej gRNA sekvencie bol použitý protokol uvedený v podkapitole 3.2.2.11.

Pozitívne a overené bakteriálne kolónie natransformovaných buniek *A. tumefaciens* s cieľovým inzertom boli kultivované v 4 ml tekutého LB média so selekčným antibiotikom (Spe^R a Rif^R) počas noci za stáleho miešania pri 200 RPM a pri teplote 28 °C. Z narastených bakteriálnych kultúr bolo odoberánych 600 μ l a prenesených sterilne v laminárnom boxe do sterilnej 2 ml plastovej skúmavky. K tomuto objemu bolo pridaných 600 μ l 50 % glycerolu. Vzorky boli poriadne premiešané, zmrazené v tekutom dusíku a uložené do mrazničky na -80 °C.

3.2.3 Stabilná transformácia lucerny siatej s využitím somatickej embryogenézy

Stabilná transformácia slúžila na vloženie destinačného vektora pDe-Cas9 s cieľovým inzertom do listov lucerny s využitím somatickej embryogenézy (SE). K získaniu transgénnych línií lucerny siatej boli použité listové explantáty z 2. až 5. stonkového uzlu nekvitnúcich rastlín. Bol použitý protokol stabilnej transformácie popísaný Samacom & Austin-Phillipsom (2006). Celý proces stabilnej transformácie pomocou somatickej embryogenézy prebiehal v aseptických podmienkach v laminárnom boxe. Nástroje pre prácu boli v priebehu opakovane sterilizované v 96 % etanole a teplotnom sterilizátore. V priebehu experimentu boli jednotlivé misky s explantátami kultivované v kultivačnej miestnosti s konštantnými hodnotami teploty, osvetlenia, fotoperiód a vlhkosti (21 °C, 80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 16/8, 70 %).

3.2.3.1 Sterilizácia rastlinného materiálu lucerny siatej

Z rastlín kultivovaných v *in vivo* podmienkach boli odtrhnuté zdravé listy do 50 ml tuby s vodou z vodovodu. Používané roztoky boli sterilizované cez bakteriálny filter. Odtrhnuté listy boli sterilizované v 25 ml 70 % etanolu po dobu 10 s. Následne boli listy prenesené do 40 ml roztoku milliQ vody so 40 μl Tween-20. V ďalšom kroku boli listy prenesené do roztoku milliQ vody (35 ml), hypochloridu sodného (5 ml) s prídavkom Tween-20 (40 μl). Listy boli v tomto roztoku ponechané 1,5 min. Nakoniec boli sterilizované listy opláchnuté trikrát v Petriho miskách s milliQ vodou.

3.2.3.2 Stabilná transformácia explantátov lucerny siatej

Deň pred stabilnou transformáciou lucerny sa bakteriálna kultúra *A. tumefaciens* nesúca konštrukty pDe-Cas9 s inzertami pre SIMKgRNA4-9 sterilne preniesla do tekutého LB média s prídavkom antibiotík (Rif^R a Spe^R) a nechala sa kultivovať cez noc v tme, pri 28 °C, za stáleho miešania pri 200 RPM. Ráno sa zmerala optická denzita. Bakteriálna kultúra s OD600 medzi 0,6 – 0,8 bola použitá k stabilnej transformácii. Vhodná bakteriálna kultúra bola stočená v centrifúge pri izbovej teplote 5 min. na 3000 g. Supernatant bol zliaty a sediment bol rozpustený v čistom tekutom LB médiu bez obsahu antibiotík.

Sterilizované listy boli rozdelené na polovicu pomocou sterilného skalpela a boli vložené do 50 ml uzatvárateľnej tuby. K listovým explantátom bolo pridaných 12 ml SH média a 3 ml pripravenej tekutej kultúry *A. tumefaciens* s požadovanými konštruktami pDe-Cas9. V plastových tubách bolo SH médium s bakteriálnou

suspenziou a s listami ponechané za jemného miešania 30 min. v tme. Následne boli explantáty umiestnené na filtračný papier, osušené a prenesené na čisté B5H médium.

3.2.3.3 Kultivácia lucerny siatej na B5H médiu

Osušené inokulované explantáty boli prenesené na B5H médium bez obsahu antibiotík. Toto médium obsahovalo fytohormóny (2,4-D a kinetín) pre spustenie kalusogenézy. Po 7 dňoch kultivácie sa na povrchu explantátov vytvoril povlak narastených baktérii *A. tumefaciens*. Kultúra sa opakovaným premývaním explantátov v sterilnej milliQ vode omyla. Omyté a osušené explantáty sa preniesli na nové B5H médium, ktoré obsahovalo selekčné antibiotiká Ppt^R a Tic^R.

3.2.3.4 Kultivácia lucerny siatej na B50 médiu

Po uplynutí dvoch týždňov boli vzniknuté kalusy sterilne prenesené na B50 médium (Ppt^R a Tic^R), ktoré už neobsahovalo fytohormóny. Bez ich prídavku dochádzalo k formovaniu somatických embryí v priebehu nasledujúcich 2 až 3 týždňov.

3.2.3.5 Kultivácia lucerny siatej na MMS médiu

Vzniknuté somatické embryá boli jednotlivito prenesené na MMS médium s obsahom antibiotík (Ppt^R, Tic^R). Embryá sa umiestnili na médium tak, aby radikula embrya smerovala nadol. Na MMS médiu dochádzalo ku klíčeniu a vytváraniu koreňovej sústavy.

3.2.3.6 Kultivácia lucerny siatej na MS médiu

Po kultivácii embryí na MMS médiu sa klíčence s dobre vytvoreným koreňom opatrne prenesli na MS médium. MS médium už neobsahovalo antibiotiká. Na MS dochádzalo ku kompletnému vývoju rastlín.

3.2.4 PCR genotypovanie transgénnych rastlín lucerny siatej

Úspešnosť transformácie, t. j. prítomnosť požadovaného konštruktú v lucerne siatej bola overená genotypovaním za použitia PCR. Jedná sa o klasickú PCR reakciu so špeciálnymi primermi, ktoré amplifikujú sekvenciu transformovaného konštruktú v rastline. Na PCR genotypovanie bol použitý Phire Plant Direct PCR Kitu. Z transformovaných a zároveň vyselektovaných rastlín (SIMKgRNA5) získaných v procese stabilnej transformácie s využitím somatickej embryogenézy (podkapitola 3.2.3) boli sterilne odstrihnutý mladý list. Ten bol prenesený do 20 µl dilučného pufru. Za pomoci sterilnej pipetovacej špičky boli listy rozdrvené krátkymi opakovanými

stlačeními proti stene mikroskúmavky. Následne sa rozdrvené listy nechali inkubovať 1 h na ľade a boli krátko stočené na stolnej centrifúge. Supernatant bol prenesený do novej mikroskúmavky.

PCR reakčná zmes bola pripravená podľa Tab. 10. Ako priamy primer bol použitý SS42 primer a ako spätný SS43 primer (Tab. 2), ktoré amplifikovali sekvenciu destinačného vektora pDe-Cas9 s inzertom o veľkosti 1194 bp. Samotná PCR reakcia bola spustená podľa programu uvedenom v Tab 11.

PCR produkty boli overené pomocou 1 % DNA agarózovej elektroforézy podľa postupu uvedenom v podkapitole 3.2.2.4.

Tab. 10: Zloženie PCR reakčnej zmesi pre Phire polymerázu.

Použité chemikálie	Množstvo
PCR voda	5,6 μ l
5x Phire Plant Tissue PCR pufor	2 μ l
2 mmol·l ⁻¹ dNTP	0,2 μ l
10 μ mol·l ⁻¹ SS 42 primer	0,5 μ l
10 μ mol·l ⁻¹ SS 43 primer	0,5 μ l
Phire Hot Start II DNA Polymeráza	0,2 μ l
templátová DNA	0,5 μ l
Celkový objem reakcie	10 μl

Tab. 11: Teplotný program pre PCR genotypovanie s použitím Phire polymerázy.

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklov
Vstupná denaturácia	98 °C	30 s	1x
Denaturácia	98 °C	30 s	
Nasadenie primerov	58,4 °C	30 s	35x
Elongácia	72 °C	1 min	
Finálna elongácia	72 °C	10 min.	1x
Schladenie	12 °C	∞	-

4 VÝSLEDKY

Výsledky dosiahnuté počas bakalárskej práce sú prezentované v nasledujúcej kapitole a sú rozdelené do dvoch samostatných častí. Výsledky sú zoradené v chronologickom poradí v akom prebiehali. V prvej časti je popísaný postup pri príprave vektorov určených k editovaniu *SIMK* génu pomocou CRISPR/Cas9 technológie. Druhá časť je zameraná na stabilnú transformáciu lucerny siatej pripravenými konštruktami v prvej časti.

4.1 Príprava konštruktov pre CRISPR/Cas9 editáciu *SIMK* génu

Prvotným predpokladom pre úspešnú prípravu vektorov slúžiacich ku CRISPR/Cas9 editácii *SIMK* génu je správne navrhnutie primerov pre inzerciu sekvencie do vhodného destinačného vektora. Táto sekvencia musí byť komplementárna k vybranému cieľovému miestu na géne, ktorý chceme editovať. Primery pre klonovanie boli navrhnuté s využitím rôznych softvérov. V referenčnej databáze kultivaru lucerny siatej, XinJianDaYe (Chen et al., 2020), bola nájdená sekvencia *SIMK* génu (MS.gene39573). Získaná sekvencia *SIMK* bola vo formáte FASTA vložená do programu CRISPR-P 2.0, ktorý navrhol niekoľko vhodných cieľových miest (protospacer sekvencia susediaca s PAM 5'-NGG sekvenciou) na oboch reťazcoch DNA. Sekvencia cieľových miest môže mať dĺžku v rozsahu 15-22 nukleotidov. Bol daný maximálny dôraz na to, aby potenciálne cieľové sekvencie boli súčasťou exónov (najlepšie prvý exón). Z ponúknutých cieľových sekvencií boli vybraté tie, ktoré mali maximálnu špecifickosť zacielenia (vysoké on-skóre) a zároveň čo najnižšiu aktivitu nešpecifického zacielenia (nízke off-skóre).

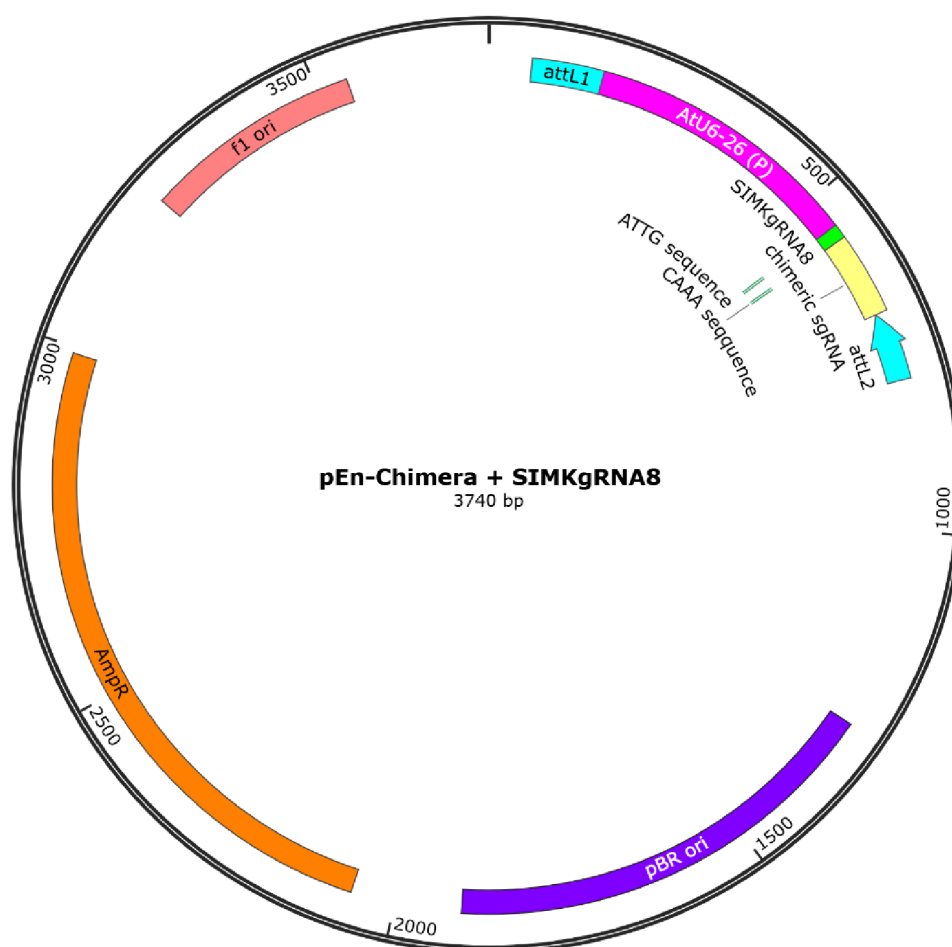
4.1.1 *In silico* príprava vektorových máp nesúcich navádzacie sekvencie gRNA

Mapa vektora reprezentuje schematické znázornenie daného plazmidu s vyznačenými sekvenciami. Tieto sekvencie môžu predstavovať rôzne elementy, ako napr. promotory, gény záujmu, gény rezistencie k antibiotiku (selekčný marker), či počiatok replikácie. Veľkou výhodou vektorovej mapy je znázornenie miest pre restriktčné štiepenie rôznymi restriktčnými endonukleázami. Za pomoci programu môže byť urobená *in silico* predpríprava a vizualizácia experimentu. Zhotovenie vektorových máp s inzertami cieľových navádzacích sekvencií gRNA bolo prevedené v programe SnapGene.

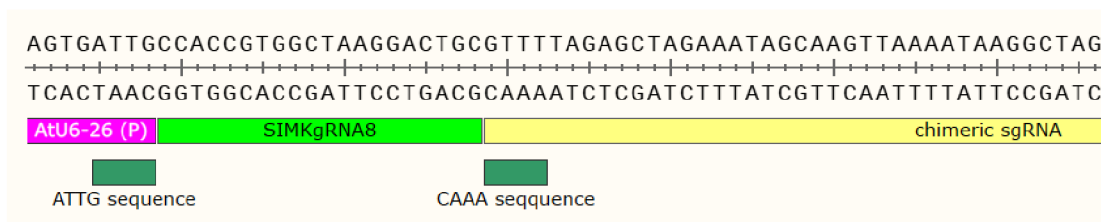
V nasledujúcich kapitolách sú uvedené plazmidové mapy vrátane klonovaných konštruktov využitých pri Multisite Gateway[®] klonovaní.

4.1.1.1 Vstupný vektor pEn-Chimera s inzertom

Vstupný vektor pEn-Chimera obsahuje špecifické restrikčné miesto na vloženie sekvencie záujmu. Pomocou restrikčného štiepenia restrikčnou endonukleázou *BbsI*-HF a inzerčného klonovania v programe SnapGene bola vložená navádzacia sekvencia gRNA do miesta štiepenia. Na Obr. 8 je znázornená plazmidová mapa vstupného vektora pEn-Chimera pre vybraný inzert SIMKgRNA8, ktorý obsahuje štvornukleotidové presahy slúžiace k ligácii dimerizovaných primerov do vstupného vektora. Na Obr. 9 je detailná ukážka určitej časti sekvencie vybraného konštrukt, ktorý obsahuje promótor *AtU6-26*, zaklonovaný inzert SIMKgRNA8 a gRNA kostru (scaffold). Sekvencia je z dôvodu prehľadnosti znázornená lineárne.



Obrázok 8. *In silico* zhotovená mapa vstupného vektora pEn-Chimera s inzertom SIMKgRNA8. Zhotovené v programe SnapGene.



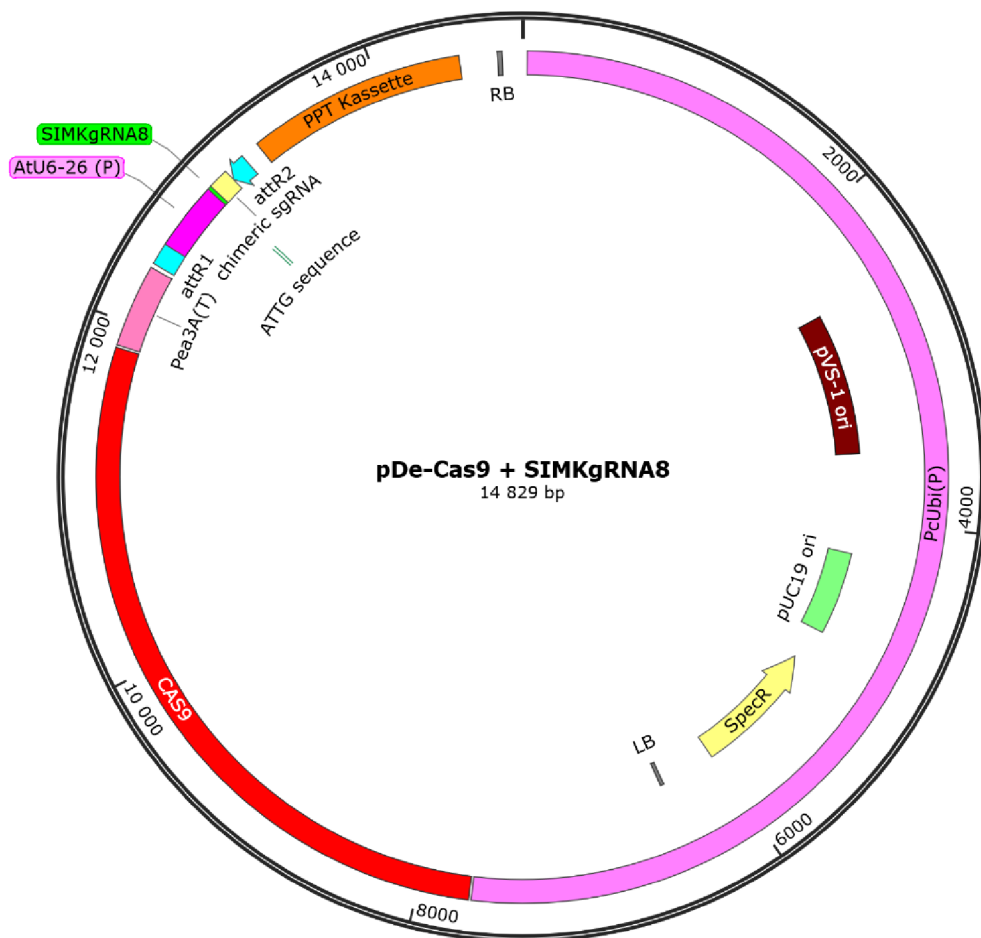
Obrázok 9. Detail vybratej sekvencie vstupného vektora pEn-Chimera s inzertom SIMKgRNA8 ohraničeného štvornukleotidovými presahmi (ATTG, CAAA). Zhotovené v programe Snapgene.

4.1.1.2 Destinačný vektor pDe-Cas9 s inzertom

Vstupné vektory obsahujúce jednotlivé zaklonované inzerty boli pomocou Multisite Gateway[®] klonovacieho systému v LR reakcii vnesené do destinačného vektora pDe-Cas9. Finálne konštrukty tvorené *Cas9*, jednotlivými gRNA kazetami a s promótorami boli pomocou *A. tumefaciens* v podobe T-DNA vnesené do rastlinných buniek lucerny siatej prostredníctvom stabilnej transformácie. Vstupný vektor pDe-Cas9 obsahuje špecifické sekvencie attR1 a attR2, ktorá slúžia pre správnu rekombináciu s attL1 a attL2 úsekmi nachádzajúcimi sa na vstupnom vektore pEn-Chimera. Na Obr. 10 je detailná ukážka vybratej časti sekvencie konštruktu, ktorý obsahuje kúsok sekvencie attR1, promótor *AtU6-26*, zaklonovaný inzert SIMKgRNA8, gRNA kostru (scaffold) a kúsok sekvencie attR2. Sekvencia je z dôvodu prehľadnosti znázornená lineárne. Na Obr. 11 je znázornená plazmidová mapa destinačného vektora pDe-Cas9 pre vybraný inzert SIMKgRNA8.



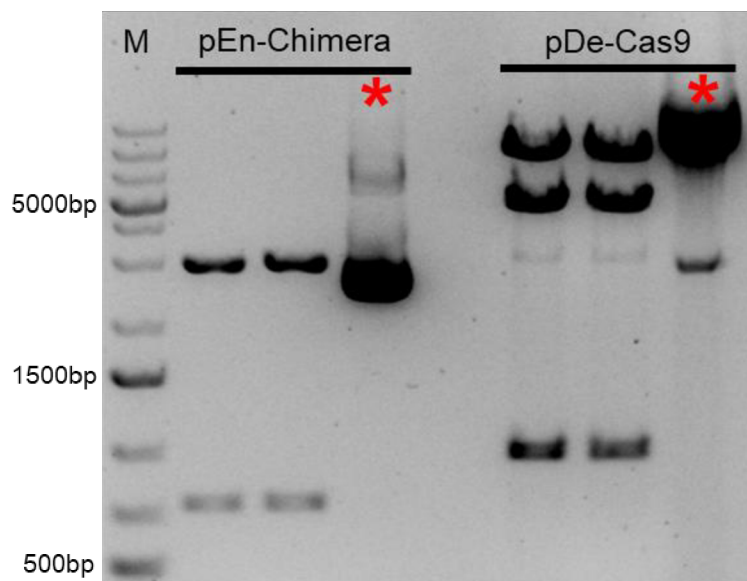
Obrázok 10. Detail vybratej časti sekvencie destinačného vektora pDe-Cas9 s inzertom SIMKgRNA8. Zhotovené v programe Snapgene.



Obrázok 11. *In silico* zhotovená mapa destinačného vektora pDe-Cas9 so SIMKgRNA8. Zhotovené v programe Snapgene.

4.1.2 Overenie vstupného vektora a destinačného vektora pomocou restričného štiepenia

Obidva typy vektorov (vstupný a destinačný), do ktorých boli postupne zaklonované inzerty cieľových navádzacích gRNA sekvencií, boli overené pomocou restričného štiepenia. K overeniu pomocou restričného štiepenia bol použitý enzým *EcoRI*. Restričná endonukleáza *EcoRI* spôsobuje štiepenie na jednom mieste vstupného plazmidu pEn-Chimera. Tak vznikajú dva úseky o veľkosti 2997 bp a 743 bp. V destinačnom vektore pDe-Cas9 dochádza k štiepeniu na dvoch miestach s tromi očakávanými úsekmi s veľkosťou 9672 bp, 5108 bp a 978 bp. Očakávané veľkosti úsekov sú znázornené na Obr. 12. Ako kontroly boli použité nenaštiepené vektory (červená hviezdička, Obr. 12).

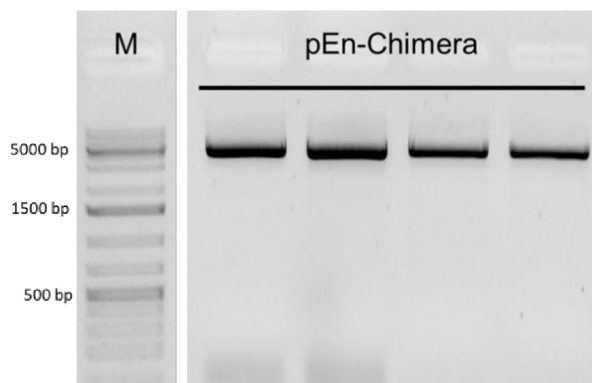


Obrázok 12. Reprezentatívny elektroforetický obrázok restričného štiepenia vstupného vektora pEn-Chimera a destinačného vektora pDe-Cas9. Enzymatické štiepenie vstupného vektora pEn-Chimera (2997 + 743 bp) a destinačného vektora pDe-Cas9 pomocou restričného enzýmu *EcoRI* (9672 + 5108 + 978 bp). Červená hviezdička – nenaštiepený vstupný vektor pEn-Chimera a destinačný vektor pDe-Cas9. M – marker GeneRuler 1kb Plus DNA ladder.

4.1.3 Príprava vstupného vektora pEn-Chimera s inzertom

Príprava vstupného vektora pEn-Chimera s jednotlivými inzertami cieľových navádzacích gRNA sekvencií zahŕňala restričné štiepenie prázdneho vstupného vektora pomocou restričnej endonukleázy *BbsI*-HF (Obr. 13). Vznikol lineárny vektor s veľkosťou 3730 bp s lepivými koncami. Po overení pomocou DNA agarózovej elektroforézy, bol poštiepený vstupný vektor pEn-Chimera vyrezaný z gélu. V ligačnej zmesi bol pomocou T4 DNA ligázy linearizovaný vstupný vektor spojený s dimerizovanými primermi pripravenými pre jednotlivé klonovacie varianty (SIMKgRNA4-9). Dimerizované primery obsahovali štvornukleotidové presahy slúžiace k samotnej ligácii.

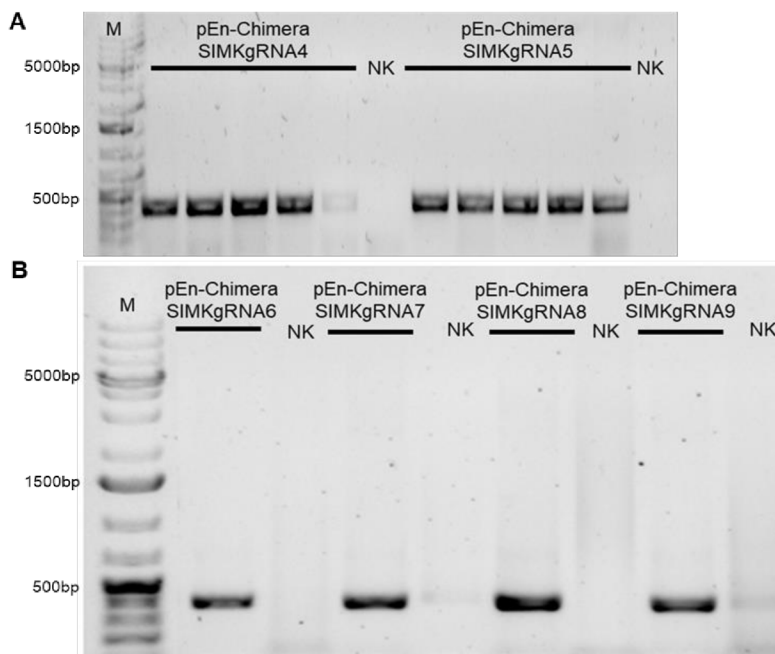
Po ligácii boli pripravené vstupné konštrukty pEn-Chimera s inzertom SIMKgRNA4-9 transformované do chemokompetentných bakteriálnych buniek *E. coli* TOP10.



Obrázok 13. Restričné štiepenie vstupného vektora pEn-Chimera restričným enzýmom *BbsI*-HF (3730 bp). M – marker GeneRuler 1kb Plus DNA ladder.

4.1.3.1 Overenie bakteriálnych kolónií *Escherichia coli* transformovaných vstupným vektorom s inzertom

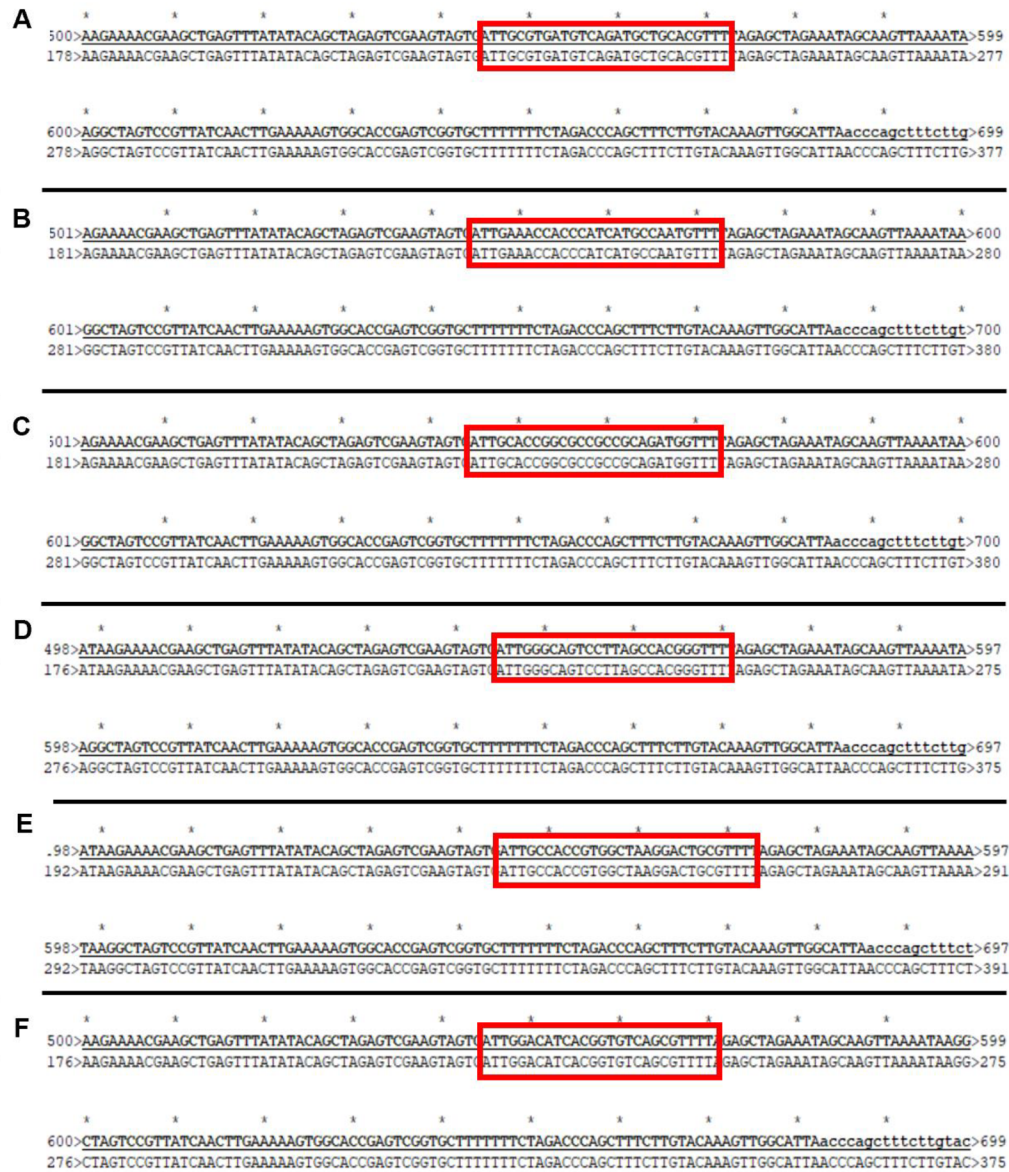
K overeniu, či narastené bakteriálne kolónie kultivované na pevnom LB médiu s prídavkom príslušného antibiotika (Amp^{R}) naozaj po transformácii obsahovali inzertnú DNA, bola urobená colony PCR amplifikácia. Pre všetky klonovacie vektory boli použité príslušné páry primerov. Amplifikovaný úsek mal veľkosť 370 bp (Obr. 14A, B) Ako negatívna kontrola bola použitá PCR voda. Boli overené všetky klonovacie varianty SIMKgRNA4-9.



Obrázok 14. Reprezentatívne elektroforetické obrázky colony PCR náhodne vybratých transformovaných chemokompetentých buniek *E. coli* TOP10 so vstupným vektorom pEn-Chimera. Použité primery: priamy primer SIMKgRNA4-5 a spätný primer SS129 (A) a priamy primer SIMKgRNA6-9 a spätný primer SS129 (B) . Veľkosť PCR produktu je 370 bp. M – hmotnostný marker GeneRuler 1kb Plus DNA ladder; NK- negatívna kontrola.

4.1.3.2 Sekvenovanie vstupných vektorov pEn-Chimera s inzertom

Vstupný vektor pEn-Chimera, do ktorého boli postupne zaklonované inzerty cieľových navádzacích gRNA sekvencií, boli overené pomocou sekvenovania. Z výsledkov sekvenácie pDNA s integrovaným inzertom možno zistiť, či bol daný inzert do vektora vložený a zaklonovaný správne. Rozhodujúca je správna sekvencia inzertu (zhodná s primermi pre klonovanie gRNA) a samotná orientácia inzertu.



Obrázok 15. Výsledok sekvenovania časti pDNA pEn-Chimera s inzertom SIMKgRNA4 (A), SIMKgRNA5 (B), SIMKgRNA6 (C), SIMKgRNA7 (D), SIMKgRNA8 (E), SIMKgRNA9 (F) pomocou špecifického primeru SS42. *In silico* pripravená sekvencia pEn-Chimera + SIMKgRNA (prvý riadok) bola porovnaná v programe ApE so sekvenciou vyzizolovanej pDNA (druhý riadok). Označená sekvencia (červený obdĺžnik) predstavuje SIMKgRNA s presahmi (ATTG, CAAA) pre ligáciu do vstupného vektora pEn-Chimera.

U všetkých klonovacích variant (SIMKgRNA4-9) boli výsledky sekvenovania porovnané pomocou programu ApE. Na Obr. 15A-F sú ukázané úseky sekvencií jednotlivých navádzacích cieľových gRNA sekvencií (SIMKgRNA4-9), ktoré potvrdzujú prítomnosť a správnu orientáciu zaklonovaných inzertov vo vstupnom vektore pEn-Chimera.

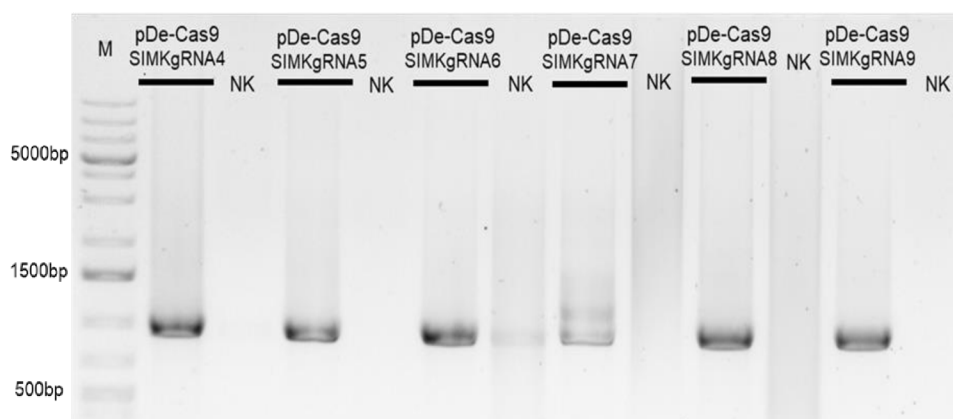
4.1.4 Príprava destinačného vektora pDe-Cas9 s inzertom

Po overení vstupného vektora pEn-Chimera s klonovacími inzertami pomocou sekvenovania boli jednotlivé konštrukty vklonované do destinačného vektora pDe-Cas9 v LR reakcii Multisite Gateway[®] klonovacieho systému a transformované do chemokompetentných bakteriálnych buniek *E. coli* TOP10.

4.1.4.1 Overenie bakteriálnych kolónií *Escherichia coli* transformovaných destinačným vektorom s inzertom

Prítomnosť destinačného vektora s inzertom bola overená pomocou colony PCR (Obr. 16). Boli náhodne vybrané kolónie pre každú klonováciu variantu SIMKgRNA4-9. Ako primery použité k amplifikácii DNA slúžili priamy primer SS61 a špecifický spätný primer pre jednotlivé SIMKgRNA4-9. Amplifikoval sa úsek o veľkosti 1033 bp (Obr. 16). Ako negatívna kontrola bola použitá PCR voda.

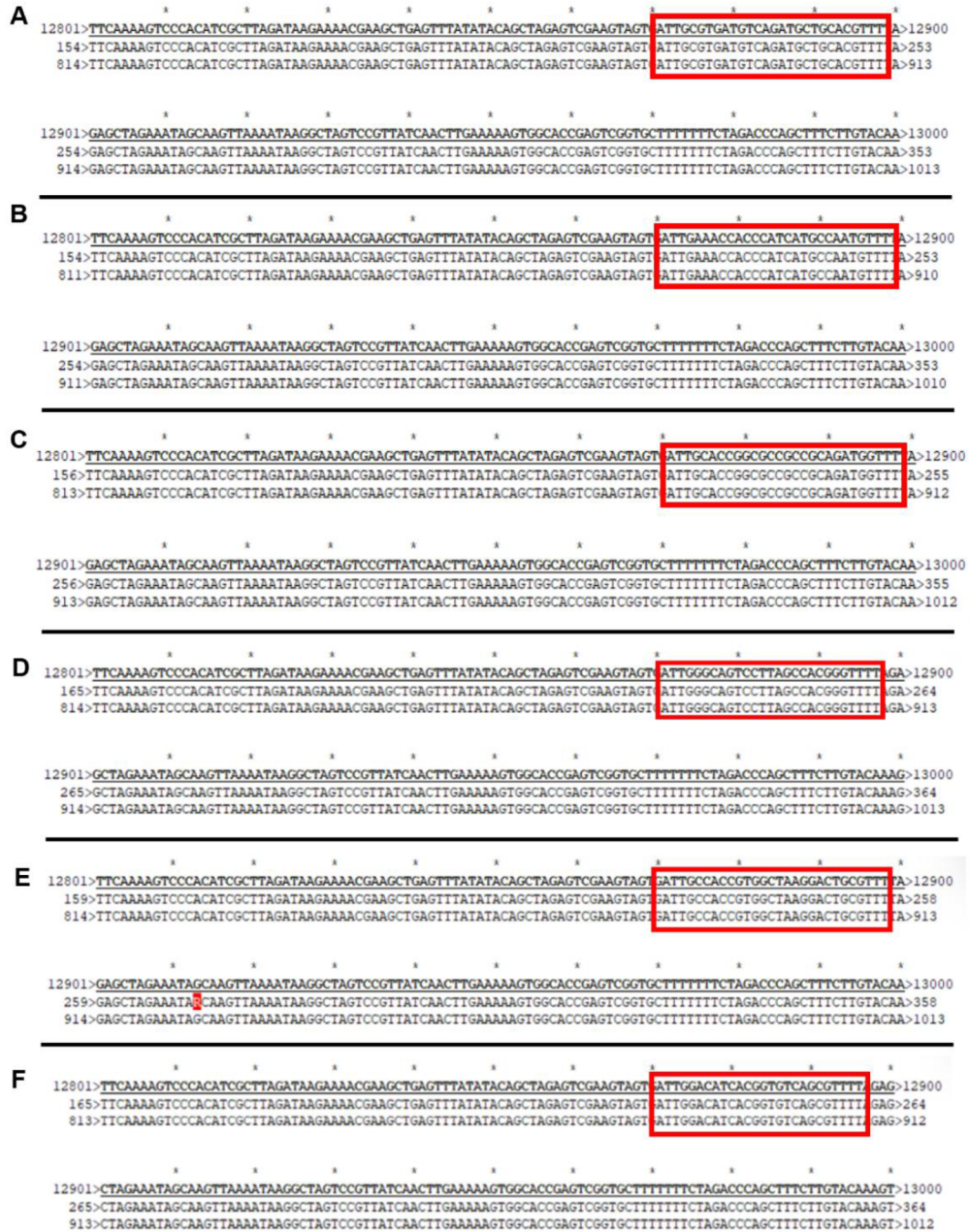
Na Obr. 16 je ukázané, že u všetkých transformovaných buniek bola potvrdená prítomnosť destinačného vektora pDe-Cas9 s požadovanou navádzacou sekvenciou gRNA.



Obrázok 16. Reprezentatívny elektroforetický obrázok colony PCR náhodne vybraných transformovaných chemokompetentných buniek *E. coli* TOP10 s destinačným vektorom pDe-Cas9 s inzertom SIMKgRNA4-9. Použité primery – priamy primer SS61 a špecifický spätný primer SIMKgRNA4-9. Veľkosť PCR produktu je 1033 bp. M – hmotnostný marker GeneRuler 1kb Plus DNA ladder; NK - negatívna kontrola.

4.1.4.2 Sekvenovanie destinačných vektorov pDe-Cas9 s inzertom

Destinačný vektor pDe-Cas9, do ktorého boli postupne zaklonované inzerty cieľových navádzacích gRNA sekvencií, boli overené pomocou sekvenovania.



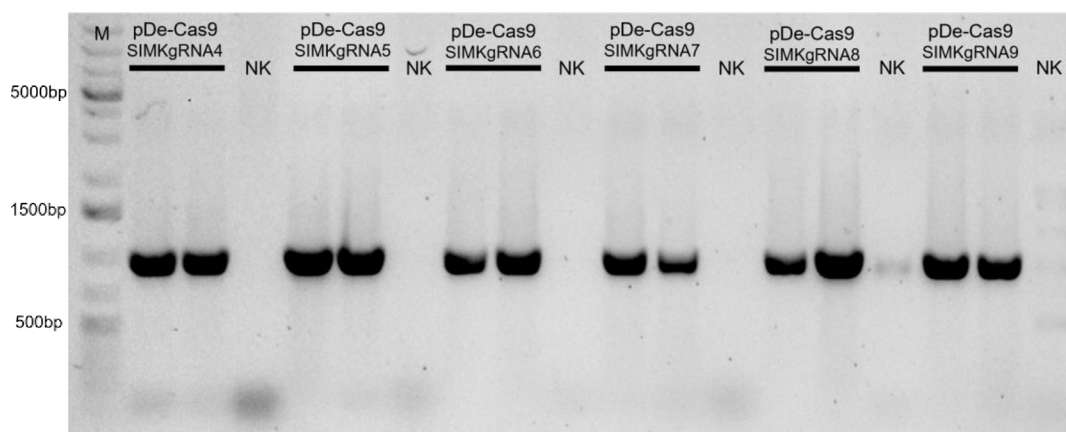
Obrázok 17. Výsledok sekvenovania časti plazmidovej DNA destinačného vektora pDe-Cas9 s inzertom SIMKgRNA4 (A), SIMKgRNA5 (B), SIMKgRNA6 (C), SIMKgRNA7 (D), SIMKgRNA8 (E), SIMKgRNA9 (F) pomocou špecifických primerov SS42 (druhý riadok), SS61 (tretí riadok). *In silico* pripravená sekvencia pDe-Cas9 + SIMKgRNA (prvý riadok) bola porovnaná v programe ApE so sekvenciou vyzolovanej pDNA (druhý a tretí riadok). Označená sekvencia (červený obdĺžnik) predstavuje SIMKgRNA4-9 s presahmi (ATTG, CAAA) po správnej rekombinácii vstupného vektora pEn-Chimera s destinačným vektorom pDe-Cas9 pomocou Multisite Gateway® klonovacieho kitu.

U všetkých klonovacích variant (SIMKgRNA4-9) boli výsledky sekvenovania porovnané v programe ApE. Na Obr. 17A-F sú ukázané úseky sekvencií jednotlivých navádzacích cieľových gRNA (SIMKgRNA4-6), ktoré potvrdzujú prítomnosť a správnu orientáciu zaklonovaných inzertov v destinačnom vektore pDe-Cas9. Sekvenovanie prebehlo za použitia špecifických primerov SS42 a SS61.

4.1.4.3 Overenie bakteriálnych kolónií *Agrobacterium tumefaciens* transformovaných destinačným vektorom s inzertom

Po overení destinačného vektora pDe-Cas9 s klonovacími inzertami pomocou sekvenovania boli jednotlivé konštrukty transformované do expresných baktérií *A. tumefaciens* GV3101. Úspešnosť transformácie *A. tumefaciens* bola overená pomocou colony PCR (Obr. 18), kedy boli náhodne vybraté dve kolónie pre každú klonováciu variantu SIMKgRNA4-9. Primery použité k amplifikácii DNA boli priamy primer SS61 a špecifický spätný primer pre jednotlivé SIMKgRNA4-9. Veľkosť PCR produktu bola 1033 bp. Ako negatívna kontrola bola použitá PCR voda (Obr. 18).

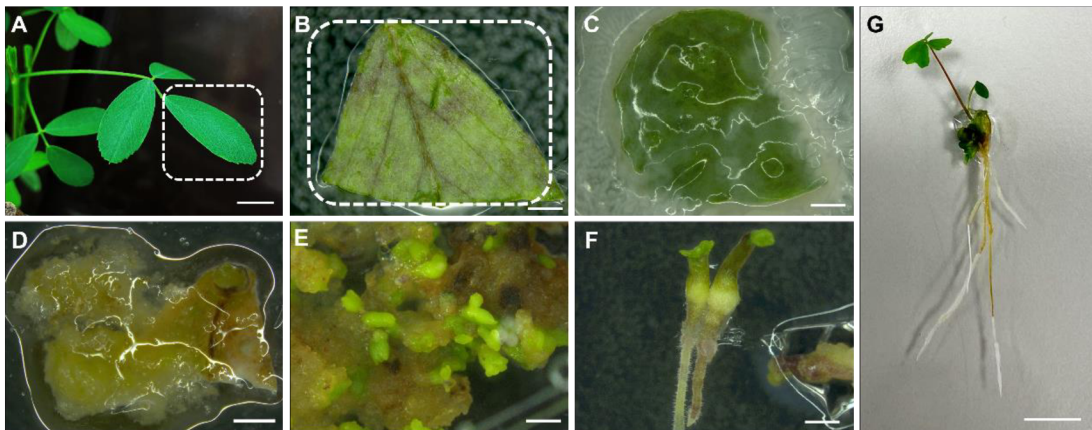
Bola potvrdená prítomnosť destinačného vektora pDe-Cas9 pre všetky klonované varianty SIMKgRNA4-9 vo všetkých testovaných kolóniách (Obr. 18).



Obrázok 18. Reprezentatívny elektroforetický obrázok colony PCR náhodne vybraných transformovaných chemokompetentých buniek *A. tumefaciens* GV3101 s destinačným vektorom pDe-Cas9 s inzertom SIMKgRNA4-9. Použité primery – priamy primer SS61 a špecifický spätný primer SIMKgRNA4-9. Veľkosť PCR produktu je 1033 bp. M – hmotnostný marker GeneRuler 1kb Plus DNA ladder; NK - negatívna kontrola.

4.2 Stabilná transformácia lucerny siatej

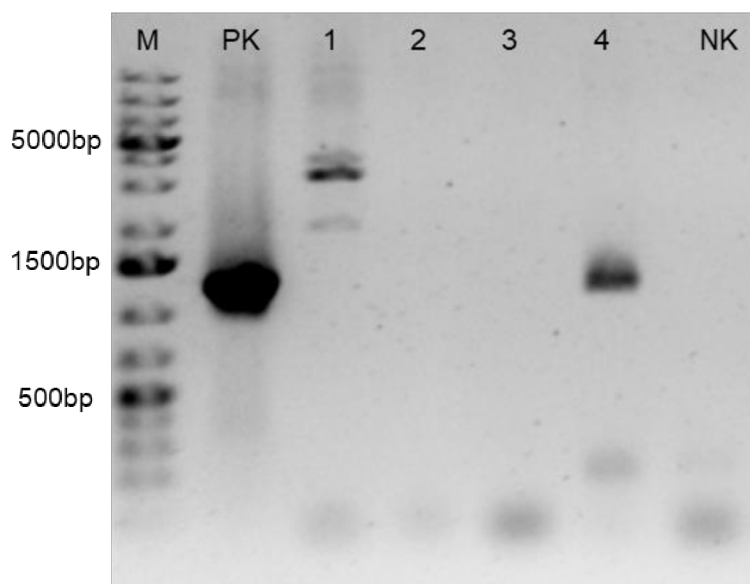
Po overení bakteriálnych kolónií *A. tumefaciens* obsahujúce destinačný vektor pDe-Cas9 s inzertami SIMKgRNA4-9 pomocou colony PCR, boli tieto bakteriálne suspenzie použité k stabilnej transformácii lucerny siatej. Regenerácia rastlín prebehla nepriamou somatickou embryogenézou (Obr. 19). Ako explantáty boli použité sterilizované mladé listy lucerny siatej (Obr. 19A) narezané na polovicu (Obr. 19B). Tie boli ko-kultivované na B5H médiu s *A. tumefaciens* obsahujúcim požadovaný vektor s inzertom (Obr. 19C). *A. tumefaciens* po týždni kultivácie obrástlo explantát listu (Obr. 19C). Explantáty boli omyté vo vode a prenesené na B5H médium so selekčným antibiotikom (Ppt^R) a eliminačným antibiotikom pre baktérie (Tic^R). Došlo k indukcii a tvorbe kalusu (Obr. 19D). Kompaktný kalus s dediferencovanými bunkami bol prenesený na B50 Ppt^R/Tic^R médium. Došlo k vytváraniu embryí (Obr. 19E). Zrelé embryá boli prenesené na MMS Ppt^R/Tic^R médium, aby došlo k indukcii rastu koreňov. Klíčence s vyvíjajúcimi sa koreňmi pozorujeme na Obr. 19F. Dostatočne vyvinuté klíčence boli prenesené na MS médium a boli získané nové regenerované rastliny lucerny siatej procesom somatickej embryogenézy (Obr. 19G). Prvé regenerované rastliny lucerny boli overené pomocou PCR genotypovania.



Obrázok 19. Reprezentatívna schéma stabilnej transformácie lucerny siatej *in vitro* propagáciou rastlín pomocou somatickej embryogenézy. Mladé listy lucerny siatej (A) sú kultivované s *A. tumefaciens* nesúci požadovaný konštrukt a explantát je umiestnený na B5H médiu (B). *A. tumefaciens* po týždni kultivácie obrástlo explantát listu (C), explantáty boli omyté vo vode a prenesené na B5H médium so selekčným antibiotikom (D). Ďalší krok regenerácie zahŕňal tvorbu embryí na B50 médiu (E). Zrelé embryá boli prenesené na MMS médium, aby došlo k indukcii rastu koreňov (F) a klíčence s vyvíjajúcimi sa koreňmi a nadzemnou časťou boli kultivované na MS médiu (G). Mierka: 0,5 cm (A), 2 mm (B-F), 1 cm (G).

4.2.1 Genotypovanie rastlín lucerny siatej

Genotypovanie štyroch rastlín lucerny siatej slúžila ako prostriedok k potvrdeniu selekcie transgénnych rastlín lucerny transformovaných *A. tumefaciens* nesúcich konštrukty pDe-Cas9 s inzertom SIMKgRNA5. Boli použité špecifické primery SS42 a SS43 (Tab. 2) pre očakávaný PCR produkt s veľkosťou 1194 bp (Obr. 20). Ako pozitívna kontrola bola použitá pDNA konštruktu pDe-Cas9 s inzertom SIMKgRNA5 izolovaná z *E. coli* overená sekvenovaním. Ako negatívna kontrola slúžila PCR voda. Zo štyroch testovaných rastlín kultivovaných na MS médiu, jedna obsahovala transgén s očakávanou veľkosťou (Obr. 20, dráha č. 4). Táto rastlina bude následne podrobená ďalšej analýze ako je Western blot, aby sa zistilo, či došlo k vyradeniu alebo k zníženiu abundancie SIMK proteínu.



Obrázok 20. Reprezentatívny elektroforetický obrázok po PCR genotypovaní na prítomnosť transgénu pDe-Cas9 s inzertom SIMKgRNA5 v stabilne transformovaných rastlinách lucerny siatej. Pomocou primerov SS42/SS43 boli detekované odpovedajúce veľkosti 1194 bp u pozitívnej kontroly (pDNA pDe-Cas9 so SIMKgRNA5; PK) a v dráhe číslo 4. M – hmotnostný marker GeneRuler 1kb Plus DNA ladder; PK – pozitívna kontrola; NK - negatívna kontrola.

5 DISKUSIA

Strukoviny sú významnou skupinou rastlín, a to pre ich vysoký obsah proteínov a symbiotický vzťah s pôdnymi baktériami fixujúcich dusík, čo vedie k prirodzenému obohacovaniu pôdy. Medzi strukoviny sa radí aj lucerna siata, ktorá je pestovaná pre mnoho významných dôvodov. Napríklad pre tvorbu rekombinantných proteínov na fytofarmaceutické účely, na obohacovanie pôdy alebo ako krmná plodina (Hrbáčková et al., 2020). Z jej významných vlastností pramení celosvetový biotechnologický záujem o zvýšenie výnosu a vylepšenie odolnosti lucerny. A jedným z možných nástrojov pre zlepšenie vlastností lucerny siatej je génové editovanie za pomoci CRISPR/Cas9 metódy.

CRISPR/Cas9 sa stal preferovaným nástrojom v oblasti vylepšovania vlastností rastlín, lebo poskytuje jednoduchú, univerzálnu a presnú manipuláciu genetickej informácie, čo bolo demonštrované na mnohých významných kultúrnych plodinách (Jiang et al., 2013; Upadhyay et al., 2013; Liang et al., 2014; Jacobs et al., 2015). Jedným z možných využití CRISPR/Cas9 metódy je štúdium funkcie génu a následného pozorovania fenotypu rastliny, tzv. príprava „knock-out“ mutantov. Fenotypové vlastnosti získaných mutantov sa porovnávajú s vlastnosťami rastliny divokého typu.

Jedným z hlavných cieľov práce bolo navrhnutie navádzacích gRNA sekvencií a príprava konštruktov pre úspešnú editáciu *SIMK* génu v lucerne siatej. Boli vybrané navádzacie gRNA sekvencie na zacielenie prvého exónu *SIMK* génu. Editácia prvého exónu by mala poskytnúť vyššiu efektivitu pri vyradení požadovaného génu (Gerashchenkov et al., 2020). Najdôležitejšou časťou gRNA sekvencie pre rozpoznanie a štiepenie cieľovej DNA je tzv. „seed sequence“, 8-12 nukleotidov dlhá sekvencia za regiónom PAM (Jinek et al., 2012; Cong et al., 2013; Gerashchenkov et al., 2020). Tieto vlastnosti spolu s výberom navádzacích gRNA sekvencií s maximálnou špecifitou zacielenia (vysoké on-skóre) a zároveň s čo najnižšou aktivitou nešpecifického zacielenia (nízke off-skóre), by mali viesť k čo najpresnejšiemu vyradeniu *SIMK* génu.

Ďalším dôležitým faktorom pri dosiahnutí „knock-out“ mutantu lucerny siatej je vyradenie všetkých 4 aliel génu, keďže sa jedná o tetraploidnú rastlinu ($2n = 4x = 32$, s veľkosťou chromozómov 800 – 1000 Mb). Doterajšie výsledky za použitia gRNA vykazovali nízke percentá mutácií (2,2 % Gao et al., 2018; 0,57 % a 1,72 % Chen

et al., 2020; 2,5 % Wolabu et al., 2020). Najbližšia fylogeneticky príbuzná rastlina *M. truncatula* vykazovala celkovú efektívitu 10,35 % v T0 generácii a boli získané monoalelické a bialelické homozygotné línie (Meng et al., 2017). Riešením tohto problému sa javí byť použitie multiplex gRNA-CRISPR/Cas9 systému (Wolabu et al., 2020).

Dôležitú úlohu pri efektívite mutagenézy zohráva promótor, pod ktorými sú Cas9 a gRNA exprimované. V práci boli použité konštitutívne promótory. Navádzacia gRNA sekvencia bola exprimovaná pod *AtU6* ubiquitínovým promótorom z arábkovky a expresia endonukleázy Cas9 bola riadená *Ubi4-2* ubiquitínovým promótorom pochádzajúcim z petržlenu. Použitie rozličných promótorov môže zohrávať rolu pri efektívite mutácií v lucerne siatej. Odzrkadľuje to príklad, pri ktorom autori štúdie testovali dva bežné konštitutívne promótory. Expresia Cas9 pod *35S* promótorom vykazovala nižšiu efektívitu mutagenézy, naopak expresia pod promótorom *AtUBQ10* ukázala vyššiu efektívitu (Wolabu et al., 2020).

Na základe dostupnej literatúry sa môžeme iba domnievať aký fenotypový prejav by vykazoval mutant s deletovaným proteínom SIMK. Indíciu môže poskytnúť vyradenie ortológnej MAPK k SIMK v iných rastlinných druhoch. Príkladom môže byť *AtMPK6*, ktorá je homológom SIMK (Šamaj et al., 2002). Rastliny homozygotné pre T-DNA nulové alely *AtMPK6* vykazovali zníženú samčiu plodnosť a abnormálny vývoj prašníkov (Bush & Krysan, 2007). Mutanty v géne *OsMPK1* z ryže (ortológ *AtMPK6*), získané metódou editácie multiplex gRNA-CRISPR/Cas9, vykazovali zakrpatený a sterilný fenotyp a úplné vyradenie *OsMPK1* viedlo k letalite (Minkenberg et al., 2017). Ďalším príkladom môže byť potlačená expresia *LjMPK6* (ortológ SIMK) pomocou RNA interferencie, kedy v strukovine *Lotus japonicus* viedla k zníženej tvorbe nodulových primordií. Expresia bola potlačená o 20 – 35 % v stabilných transgénnych T1 líniách. Zatiaľ čo nadexpresia zvýšila množstvo nodulov, nodulových primordií a infekčných vlákien (Yin et al., 2019).

SIMK sa nachádza v rastúcich špičkách koreňových vláskoch alebo v jadrách buniek (Šamaj et al., 2002; Hrbáčková et al., 2021). Zníženou expresiou *SIMK* a *SIMKKK* transkriptov za použitia RNA interferencie v *SIMKK RNAi* líniách došlo k rastu kratších koreňových vláskov, k nižšej tvorbe nodulov a celkovej biomasy oproti divokému typu (Hrbáčková et al., 2021). To môže naznačovať, že vyradenie SIMK proteínu pomocou CRISPR/Cas9 by mohlo viesť k vytváraniu veľmi krátkych koreňových vláskov a k zníženej alebo žiadnej tvorbe nodulov. Taktiež by vyradenie

SIMK proteínu mohlo viesť až k jasne pozorovateľnému fenotypu, akým bol trpasličí vzrast preukázaný u ryže pri vyradení OsMPK1 (Minkenberg et al., 2017).

Príprava „knock-out“ mutantov pripravených CRISPR/Cas9 metódou môže odhaľovať podstatnosť jednotlivých MAPK a umožňuje funkčný objav predtým nedostupných génov alebo domén s fenotypmi maskovanými letalitou alebo redundanciou, ako tomu bolo v štúdií vypracovanej Minkenbergom et al. (2017), kde objavili esenciálny význam OsMPK1 a OsMPK6 pri vývoji ryže (Minkenberg et al., 2017). Biotechnologický potenciál CRISPR/Cas9 u lucerny siatej by mohlo mať zacielenie iného génu, respektíve inej MAPK. Mutanty rajčiaku *mapk3* (*Solanum lycopersicum* MAPK3) získané prostredníctvom metódy CRISPR/Cas9 vykazovali vyššiu toleranciu na stres z vysokých teplôt ako needitovaný divý typ (Yu et al., 2019). Vypnutím hybridného proteínu SIHyPRP1 (*Solanum lycopersicum* hybrid proline-rich protein) bohatého na prolín v rajčiaku, ktorý negatívne reguluje odpoveď na stres zo zasolenia, došlo k pozorovateľnej zvýšenej tolerancii na tento stres (Tran et al., 2021). Jednou z ďalších možností by mohlo byť vypnutie fosfatázy zodpovednej za inaktiváciu MAPK. MAPK fosfatáza 1 (MAPK phosphatase 1; MKP1) u *A. thaliana* reguluje aktivitu MPK3 a tým zvyšuje ochranu vodivých pletív. Získaný mutant *mkp1* bol citlivejší voči patogénu *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. (Lin et al., 2022), ktorý napadá vodivé pletivá rastlín.

Ďalším cieľom práce bola stabilná transformácia lucerny siatej. Jedná sa o permanentné a dedičné zavedenie transgénu do rastliny. Transformácia bola v tejto práci sprostredkovaná *A. tumefaciens* podľa upraveného protokolu (Samac & Austin-Phillips, 2006) pre kmeň GV3101.

Dosiahnutie stabilných línií rastlín editovaných CRISPR/Cas9 môže byť zabezpečené rôznymi spôsobmi. Najčastejším spôsobom je *A. tumefaciens* sprostredkovaná transformácia. Získané mutantné línie môžu byť získané metódou stabilnej transformácie Floral dip, ktorá sa najviac využíva pre *A. thaliana* (Mao et al., 2013). Ďalej transformáciou nezrelých embryí (*Sorghum bicolor*; Jiang et al., 2014), kľúčnych listov (*Solanum lycopersicum*; Brooks et al., 2014), pravých listov (*Nicotiana tabacum*; Gao et al., 2015) alebo transformáciu *A. rhizogenes* na tvorbu vláskových koreňov (*Solanum lycopersicum*; Ron et al., 2014).

V dostupnej literatúre sa uvádza, že lucernu siatu je možné transformovať a regenerovať nepriamou SE použitím listov ako explantátu s dobou ko-kultivácie 24-36 h (Wolabu et al., 2020) alebo predkultivovať explantáty (listy narezané

na polovicu) na SH2K médiu (Schenk & Hildebrandt, 1972) a po 2 dňoch explantáty infikovať *A. tumefaciens* (Tian et al., 2002). Kalusy je možné transformovať aj za stáleho miešania (Chen et al., 2020). Rôzne kultivary môžu inak reagovať na rôzne spôsoby regenerácie (Dijak & Brown, 1987). V práci bola popísaná transformácia a regenerácia lucerny podľa protokolu vypracovaného Samacom & Austin-Phillipsom (2006), kde explantáty, narezané listy na polovicu, boli ko-kultivované s *A. tumefaciens* v tekutom SH médiu a prenesené na kalus indukujúce médium. Spôsob transformácie a regenerácie, dĺžka ko-kultivácie, vybraný explantát a kultivar lucerny či použité média, to všetko môže ovplyvniť úspešnosť transformácie a vytvorenie novej stabilnej transgéennej línie lucerny siatej.

Pri príprave transgénnych línií sa robí selekcia väčšieho počtu línií z dôvodu, že efektívnosť transformácie môže byť veľmi rôznorodá v závislosti od miesta integrácie T-DNA v rastlinnom genóme (Bortesi & Fischer, 2015).

Na záver práce bolo urobené PCR genotypovanie prvých regenerovaných rastlín, ktoré ukázali prítomnosť transgénu v transformovaných líniách. Pre overenie vyradenia SIMK proteínu je nutné použiť ďalšie metódy, ako je Western blot analýza so špecifickými protilátkami. Výsledky Western blotu by mohli ukázať zníženú abundanciu SIMK proteínu alebo úplnú absenciu v získaných transgénnych líniách. Vlastná úspešnosť genetickej editácie sa vyhodnocuje sekvenovaním rastlinnej genómovej DNA. Overenie a validácia transgénnych rastlín bude náplňou ďalšej práce.

6 ZÁVER

V teoretickej časti práce bol zhrnutý prehľad súčasného stavu riešenej problematiky. Bol predstavený modelový organizmus *M. sativa* a bližšie ukázaný spôsob jeho regenerácie somatickou embryogenézou. Taktiež boli popísané MAPK, ich aktivácia a inaktivácia so špeciálnym dôrazom na rod *Medicago*, kde sa radí aj MAP kináza záujmu SIMK. V neposlednom rade bola ukázaná perspektíva metódy CRISPR/Cas9 na ciele editáciu požadovanej DNA.

Experimentálna časť práce popisuje prípravu konštruktov pre CRISPR/Cas9 editáciu *SIMK* génu a stabilnú transformáciu lucerny siatej. Hlavnou súčasťou prípravy konštruktov ku CRISPR/Cas9 mutagenéze bol návrh navádzacích gRNA sekvencií a dimerizácia týchto primerov. V tejto forme boli zaklonované do vhodných vektorov a transformované do *E. coli* a *A. tumefaciens*. Prítomnosť správne zaklonovaných inzertov SIMKgRNA4-9 v bakteriálnych plazmidoch bola overená metódou colony PCR a sekvenovaním.

Chemokompetentné bunky *A. tumefaciens* boli použité na stabilnú transformáciu lucerny a propagácia transgénneho materiálu prebehla pomocou somatickej embryogenézy. K overeniu transgénu prítomného v rastlinách lucerny slúžilo PCR genotypovanie, ktoré ukázalo jednu transgénnu líniu lucerny siatej SIMKgRNA5. Overenie ďalších transgénnych rastlín bude náplňou nasledujúcej experimentálnej práce.

7 LITERATÚRA

- Andreasson, E., & Ellis, B. (2010). Convergence and specificity in the *Arabidopsis* MAPK nexus. *Trends in Plant Science*, 15(2), 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.12.001>
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M., Chiu, W. L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F., & Sheen, J. (2002). Map kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, 415(6875), 977–983. <https://doi.org/10.1038/415977a>
- Atmane, N., Blervacq, A. S., Michaux-Ferriere, N., & Vasseur, J. (2000). Histological analysis of indirect somatic embryogenesis in the marsh clubmoss *Lycopodiella inundata* (L.) Holub (Pteridophytes). *Plant Science*, 156(2), 159–167. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00244-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00244-2)
- Babić, K. H., Schauss, K., Hai, B., Sikora, S., Redžepović, S., Radl, V., & Schloter, M. (2008). Influence of different *Sinorhizobium meliloti* inocula on abundance of genes involved in nitrogen transformations in the rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Environmental Microbiology*, 10(11), 2922–2930. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01762.x>
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richardss, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., & Horvath, P. (2007). CRISPR Provides Against Viruses in Prokaryotes. *Science*, 315(March), 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- Barrangou, R., & Marraffini, L. A. (2014). CRISPR-cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. *Molecular Cell*, 54(2), 234–244. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.011>
- Bartels, S., Besteiro, M. A. G., Lang, D., & Ulm, R. (2010). Emerging functions for plant MAP kinase phosphatases. *Trends in Plant Science*, 15(6), 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.04.003>
- Bhojwani, S. S. (1990) Plant Tissue Culture: Applications and Limitations. Elsevier Science Publishers, 461 strán.
- Bigéard, J., & Hirt, H. (2018). Nuclear signaling of plant MAPKs. *Frontiers in Plant Science*, 9(April), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00469>
- Bingham, E. T., Hurley, L. V., Kaatz, D. M., & Saunders, J. W. (1975). Breeding Alfalfa Which Regenerates from Callus Tissue in Culture. *Crop Science*, 15(5), 719–721. <https://doi.org/10.2135/cropsci1975.0011183x001500050032x>
- Blondon, F., Marie, D., Brown, S., & Kondorosi, A. (1994). Genome size and base composition in *Medicago sativa* and *M. truncatula* species. *Genome*, 37(2), 264–270. <https://doi.org/10.1139/g94-037>
- Bögre, L., Calderini, O., Binarova, P., Mattauch, M., Till, S., Kiegerl, S., Jonak, C., Pollaschek, C., Barker, P., Huskisson, et al. (1999). A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *Plant Cell*, 11(1), 101–113. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.1.101>
- Bögre, L., Zwerger, K., Meskiene, I., Binarova, P., Csizmadia, V., Planck, C., Wagner, E., Hirt, H., & Heberle-Bors, E. (1997). The cdc2Ms kinase is differently regulated in the cytoplasm and in the nucleus. *Plant Physiology*, 113(3), 841–852. <https://doi.org/10.1104/pp.113.3.841>
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., & Dusko Ehrlich, S. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151(8), 2551–2561. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>
- Bondy-Denomy, J., & Davidson, A. R. (2014). To acquire or resist: The complex biological effects of CRISPR-Cas systems. *Trends in Microbiology*, 22(4), 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.01.007>
- Bora, K. S., & Sharma, A. (2011). Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: A review. *Pharmaceutical Biology*, 49(2), 211–220. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.504732>
- Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and

- beyond. *Biotechnology Advances*, 33(1), 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006>
- Brock, A. K., Willmann, R., Kolb, D., Grefen, L., Lajunen, H. M., Bethke, G., Lee, J., Nürnberger, T., & Gust, A. A. (2010). The *arabidopsis* mitogen-activated protein kinase phosphatase PP2C5 affects seed germination, stomatal aperture, and abscisic acid-inducible gene expression. *Plant Physiology*, 153(3), 1098–1111. <https://doi.org/10.1104/pp.110.156109>
- Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z. B., & Van Eck, J. (2014). Efficient Gene Editing in Tomato in the First Generation Using the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated9 System. *Plant Physiology*, 166(3), 1292–1297. <https://doi.org/10.1104/PP.114.247577>
- Brouns, S. J. J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slijkhuis, R. J. H., Snijders, A. P. L., Dickman, M. J., Makarova, K. S., Koonin, E. V., & Van Der Oost, J. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 321(5891), 960–964. <https://doi.org/10.1126/science.1159689>
- Bush, S. M., & Krysan, P. J. (2007). Mutational evidence that the *Arabidopsis* MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development. *Journal of Experimental Botany*, 58(8), 2181–2191. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm092>
- Buxton, D. R., Harrison, J. H., & Muck, R. E. (2003). *Silage Science and Technology Agronomy Series*. 1st edition, American Society of Agronomy, 927 strán.
- Camps, M., Nichols, A., & Arkinstall, S. (2000). Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *The FASEB Journal*, 14(1), 6–16. <https://doi.org/10.1096/fasebj.14.1.6>
- Cardinale, F., Jonak, C., Ligterink, W., Niehaus, K., Boller, T., & Hirt, H. (2000). Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *Journal of Biological Chemistry*, 275(47), 36734–36740. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007418200>
- Cardinale, F., Meskiene, I., Ouaked, F., & Hirt, H. (2002). Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *Plant Cell*, 14(3), 703–711. <https://doi.org/10.1105/tpc.010256>
- Carrasco, J. L., Castelló, M. J., Naumann, K., Lassowskat, I., Navarrete-Gómez, M., Scheel, D., & Vera, P. (2014). Arabidopsis protein phosphatase DBP1 nucleates a protein network with a role in regulating plant defense. *PLoS ONE*, 9(3), e90734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090734>
- Chang, L., & Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 410(6824), 37–40. <https://doi.org/10.1038/35065000>
- Chen, H., Zeng, Y., Yang, Y., Huang, L., Tang, B., Zhang, H., Hao, F., Liu, W., Li, Y., Liu, Y., et al. (2020). Allele-aware chromosome-level genome assembly and efficient transgene-free genome editing for the autotetraploid cultivated alfalfa. *Nature Communications*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16338-x>
- Chen, R. E., & Thorner, J. (2007). Function and regulation in MAPK signaling pathways: Lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1311–1340. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2007.05.003>
- Chen, T., Duan, L., Zhou, B., Yu, H., Zhu, H., Cao, Y., & Zhang, Z. (2017). Interplay of Pathogen-Induced Defense Responses and Symbiotic Establishment in *Medicago truncatula*. *Frontiers in Microbiology*, 0(5), 973. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00973>
- Chen, T., Zhou, B., Duan, L., Zhu, H., & Zhang, Z. (2017). MtMAPKK4 is an essential gene for growth and reproduction of *Medicago truncatula*. *Physiologia Plantarum*, 159(4), 492–503. <https://doi.org/10.1111/PPL.12533>
- Cheng, Z., Li, J.-F., Niu, Y., Zhang, X.-C., Woody, O. Z., Xiong, Y., Djonović, S., Millet, Y., Bush, J., McConkey, et al. (2015). Pathogen-secreted proteases activate a novel plant immune pathway. *Nature*, 521(7551), 213–216. <https://doi.org/10.1038/nature14243>
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J. D. G., Felix,

- G., & Boller, T. (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, 448(7152), 497–500. <https://doi.org/10.1038/nature05999>
- Christerson, L. B., Gallagher, E., Vanderbilt, C. A., Whitehurst, A. W., Wells, C., Kazempour, R., Sternweis, P. C., & Cobb, M. H. (2002). p115 Rho GTPase activating protein interacts with MEKK1. *Journal of Cellular Physiology*, 192(2), 200–208. <https://doi.org/10.1002/JCP.10125>
- Colcombet, J., & Hirt, H. (2008). *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *The Biochemical journal*, 413(2), 217–226. <https://doi.org/10.1042/BJ20080625>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Davletova, S., Mészáros, T., Miskolczi, P., Oberschall, A., Török, K., Magyar, Z., Dudits, D., & Deák, M. (2001). Auxin and heat shock activation of a novel member of the calmodulin like domain protein kinase gene family in cultured alfalfa cells. *Journal of Experimental Botany*, 52(355), 215–221. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.355.215>
- De Zélicourt, A., Diet, A., Marion, J., Laffont, C., Ariel, F., Moison, M., Zahaf, O., Crespi, M., Gruber, V., & Frugier, F. (2012). Dual involvement of a *Medicago truncatula* NAC transcription factor in root abiotic stress response and symbiotic nodule senescence. *Plant Journal*, 70(2), 220–230. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04859.x>
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J., & Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602–607. <https://doi.org/10.1038/nature09886>
- Denchev, P., Velcheva, M., & Atanassov, A. (1991). A new approach to direct somatic embryogenesis in *Medicago*. *Plant Cell Reports*, 10(6–7), 338–341. <https://doi.org/10.1007/BF00193154>
- Dijak, M., & Brown, D. C. W. (1987). Patterns of direct and indirect embryogenesis from mesophyll protoplasts of *Medicago sativa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 9(2), 121–130. <https://doi.org/10.1007/BF00044247>
- Droillard, M. J., Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H., & Laurière, C. (2004). Involvement of MPK4 in osmotic stress response pathways in cell suspensions and plantlets of *Arabidopsis thaliana*: Activation by hypoosmolarity and negative role in hyperosmolarity tolerance. *FEBS Letters*, 574(1–3), 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.08.001>
- Duerr, B., Gawienowski, M., Ropp, T., & Jacobs, T. (1993). MsERK1: A mitogen-activated protein kinase from a flowering plant. *Plant Cell*, 5(1), 87–96. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.1.87>
- Fausser, F., Schiml, S., & Puchta, H. (2014). Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 79(2), 348–359. <https://doi.org/10.1111/TPJ.12554>
- Feng, Z., Zhang, B., Ding, W., Liu, X., Yang, D. L., Wei, P., Cao, F., Zhu, S., Zhang, F., Mao, Y., & Zhu, J. K. (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Research*, 23(10), 1229–1232. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.114>
- Fineran, P. C., & Charpentier, E. (2012). Memory of viral infections by CRISPR-Cas adaptive immune systems: Acquisition of new information. *Virology*, 434(2), 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.10.003>
- Frangoul, H., Altshuler, D., Cappellini, M. D., Chen, Y.-S., Domm, J., Eustace, B. K., Foell, J., de la Fuente, J., Grupp, S., Handgretinger, R., et al. (2021). CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and β -Thalassemia. *New England Journal of Medicine*, 384(3), 252–260. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2031054>
- Gaj, M. D. (2004). Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth*

- Regulation*, 43(1), 27–47. <https://doi.org/10.1023/B:GROW.0000038275.29262.fb>
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1), 151–158. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(68\)90403-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(68)90403-5)
- Gao, J., Wang, G., Ma, S., Xie, X., Wu, X., Zhang, X., Wu, Y., Zhao, P., & Xia, Q. (2015). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. *Plant molecular biology*, 87(1–2), 99–110. <https://doi.org/10.1007/S11103-014-0263-0>
- Gao, R., Feyissa, B. A., Croft, M., & Hannoufa, A. (2018). Gene editing by CRISPR/Cas9 in the obligatory outcrossing *Medicago sativa*. *Planta*, 247(4), 1043–1050. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2866-1>
- Garcês, H. M. P., Champagne, C. E. M., Townsley, B. T., Park, S., Malhó, R., Pedroso, M. C., Harada, J. J., & Sinha, N. R. (2007). Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalanchoë*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(39), 15578–15583. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704105104>
- Garneau, J. E., Dupuis, M. È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadán, A. H., & Moineau, S. (2010). The CRISPR/cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468(7320), 67–71. <https://doi.org/10.1038/nature09523>
- Gasparis, S., Kala, M., Przyborowski, M., Łyznik, L. A., Orczyk, W., & Nadolska-Orczyk, A. (2018). A simple and efficient CRISPR/Cas9 platform for induction of single and multiple, heritable mutations in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Methods*, 14(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0382-8>
- Gerashchenkov, G. A., Rozhnova, N. A., Kuluev, B. R., Kiryanova, O. Y., Gumerova, G. R., Knyazev, A. V., Vershinina, Z. R., Mikhailova, E. V., Chemeris, D. A., Matniyazov, R. T., et al. V. (2020). Design of Guide RNA for CRISPR/Cas Plant Genome Editing. *Molecular Biology*, 54(1), 24–42. <https://doi.org/10.1134/s0026893320010069>
- Guan, Y., Li, S. G., Fan, X. F., & Su, Z. H. (2016). Application of somatic embryogenesis in woody plants. *Frontiers in Plant Science*, 7(June), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00938>
- Gupta, R., Huang, Y., Kieber, J., & Luan, S. (1998). Identification of a dual-specificity protein phosphatase that inactivates a MAP kinase from *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 16(5), 581–589. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00327.x>
- Györgyey, J., Gartner, A., Németh, K., Magyar, Z., Hirt, H., Heberle-Bors, E., & Dudits, D. (1991). Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Molecular Biology*, 16(6), 999–1007. <https://doi.org/10.1007/BF00016072>
- Hale, C. R., Zhao, P., Olson, S., Duff, M. O., Graveley, B. R., Wells, L., Terns, R. M., & Terns, M. P. (2009). RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex. *Cell*, 139(5), 945–956. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.040>
- Halperin, W. (1966). Alternative Morphogenetic Events in Cell Suspensions. *American Journal of Botany*, 53(5), 443–453. <https://doi.org/10.2307/2440343>
- Hrbáčková, M., Dvořák, P., Takáč, T., Tichá, M., Luptovčíak, I., Šamajová, O., Ovečka, M., & Šamaj, J. (2020). Biotechnological Perspectives of Omics and Genetic Engineering Methods in Alfalfa. *Frontiers in Plant Science*, 11, 592–614. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00592>
- Hrbáčková, M., Luptovčíak, I., Hlaváčková, K., Dvořák, P., Tichá, M., Šamajová, O., Novák, D., Bednarz, H., Niehaus, K., Ovečka, M., & Šamaj, J. (2021). Overexpression of alfalfa SIMK promotes root hair growth, nodule clustering and shoot biomass production. *Plant Biotechnology Journal*, 19(4), 767–784. <https://doi.org/10.1111/PBI.13503>
- Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., Champion, A., Kreis, M., Zhang, S., Hirt, H., Wilson, et al. (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science*, 7(7), 301–308. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02302-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02302-6)
- Ishihama, N., Yamada, R., Yoshioka, M., Katou, S., & Yoshioka, H. (2011). Phosphorylation of the *Nicotiana benthamiana* WRKY8 transcription factor by MAPK functions in the

- defense response. *Plant Cell*, 23(3), 1153–1170. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.081794>
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakamura, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5429–5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
- Jacobs, T. B., LaFayette, P. R., Schmitz, R. J., & Parrott, W. A. (2015). Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnology*, 15(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0131-2>
- Jansen, R., Van Embden, J. D. A., Gaastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1565–1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
- Jansing, J., Sack, M., Augustine, S. M., Fischer, R., & Bortesi, L. (2019). CRISPR/Cas9-mediated knockout of six glycosyltransferase genes in *Nicotiana benthamiana* for the production of recombinant proteins lacking β -1,2-xylose and core α -1,3-fucose. *Plant Biotechnology Journal*, 17(2), 350–361. <https://doi.org/10.1111/pbi.12981>
- Jiang, F., & Doudna, J. A. (2017). CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, 46, 505–529. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>
- Jiang, W. Z., Yang, B., & Weeks, D. P. (2014). Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Gene Editing in *Arabidopsis thaliana* and Inheritance of Modified Genes in the T2 and T3 Generations. *PLOS ONE*, 9(6), e99225. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0099225>
- Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B., & Weeks, D. P. (2013). Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Research*, 41(20), e188–e188. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT780>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D. W., Sternberg, S. H., Kaya, E., Ma, E., Anders, C., Hauer, M., Zhou, K., Lin, S., et al. (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 343(6176), 1247997. <https://doi.org/10.1126/science.1247997>
- Johansen, I. E., Liu, Y., Jørgensen, B., Bennett, E. P., Andreasson, E., Nielsen, K. L., Blennow, A., & Petersen, B. L. (2019). High efficacy full allelic CRISPR/Cas9 gene editing in tetraploid potato. *Scientific Reports*, 9(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54126-w>
- Jonak, C., Kiegerl, S., Hirt, H., Lloyd, C., & Chan, J. (1995). MMK2, a novel alfalfa MAP kinase, specifically complements the yeast MPK1 function. *Molecular & General Genetics*, 248(6), 686–694. <https://doi.org/10.1007/BF02191708>
- Jonak, C., Kiegerl, S., Ligterink, W., Barker, P. J., Huskisson, N. S., & Hirt, H. (1996). Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(20), 11274–11279. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.11274>
- Jonak, C., Nakagami, H., & Hirt, H. (2004). Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant physiology*, 136(2), 3276–3283. <https://doi.org/10.1104/pp.104.045724>
- Jun, R., Xixun, H., Kejian, W., & Chun, W. (2019). Development and Application of CRISPR/Cas System in Rice. *Rice Science*, 26(2), 69–76. <https://doi.org/10.1016/J.RSCI.2019.01.001>
- Junttila, M. R., Li, S., & Westermarck, J. (2008). Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *The FASEB Journal*, 22(4), 954–965. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7859rev>
- Kao, K. N., & Michayluk, M. R. (1980). Plant Regeneration from Mesophyll Protoplasts of Alfalfa. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 96(2), 135–141. [https://doi.org/10.1016/s0044-328x\(80\)80051-1](https://doi.org/10.1016/s0044-328x(80)80051-1)

- Kiegerl, S., Cardinale, F., Siligan, C., Gross, A., Baudouin, E., Liwosz, A., Eklöf, S., Till, S., Bögre, L., Hirt, H., & Meskiene, I. (2000). SIMKK, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase, is a specific activator of the salt stress-induced MAPK, SIMK. *Plant Cell*, *12*(11), 2247–2258. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.11.2247>
- Kim, C. Y., & Zhang, S. (2004). Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco. *Plant Journal*, *38*(1), 142–151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02033.x>
- Kim, D., Alptekin, B., & Budak, H. (2018). CRISPR/Cas9 genome editing in wheat. *Functional and Integrative Genomics*, *18*(1), 31–41. <https://doi.org/10.1007/s10142-017-0572-x>
- Kineman, B. D., Brummer, E. C., Paiva, N. L., & Birt, D. F. (2010). Resveratrol from transgenic alfalfa for prevention of aberrant crypt foci in mice. *Nutrition and Cancer*, *62*(3), 351–361. <https://doi.org/10.1080/01635580903407213>
- 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. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040314>
- Kong, X., Pan, J., Zhang, D., Jiang, S., Cai, G., Wang, L., & Li, D. (2013). Identification of mitogen-activated protein kinase kinase gene family and MKK-MAPK interaction network in maize. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *441*(4), 964–969. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.008>
- Kuddus, M. (2018). *Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications and Future Prospects*- 1st edition. Academic Press, 909 strán.
- Kumar, T., Bao, A. K., Bao, Z., Wang, F., Gao, L., & Wang, S. M. (2018). The progress of genetic improvement in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, *54*(2), 41–51. <https://doi.org/10.17221/46/2017-CJGPB>
- Kundu, N., Dozier, U., Deslandes, L., Somssich, I. E., & Ullah, H. (2013). *Arabidopsis* scaffold protein RACK1A interacts with diverse environmental stress and photosynthesis related proteins. *Plant Signaling and Behavior*, *8*(5), e24012. <https://doi.org/10.4161/psb.24012>
- Lakshmanan, P., & Taji, A. (2000). Somatic embryogenesis in leguminous plants. *Plant Biology*, *2*(2), 136–148. <https://doi.org/10.1055/s-2000-9159>
- Lewis, T. S., Shapiro, P. S., & Ahn, N. G. (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades. *Advances in Cancer Research*, *74*, 137–139. [https://doi.org/10.1016/s0065-230x\(08\)60765-4](https://doi.org/10.1016/s0065-230x(08)60765-4)
- Li, C., Zong, Y., Wang, Y., Jin, S., Zhang, D., Song, Q., Zhang, R., & Gao, C. (2018). Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. *Genome Biology*, *19*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1443-z>
- Li, W., Xu, H., Liu, Y., Song, L., Guo, C., & Shu, Y. (2016). Bioinformatics Analysis of MAPKKK Family Genes in *Medicago truncatula*. *Genes*, *7*(4), 13. <https://doi.org/10.3390/genes7040013>
- Liang, Z., Zhang, K., Chen, K., & Gao, C. (2014). Targeted Mutagenesis in *Zea mays* Using TALENs and the CRISPR/Cas System. *Journal of Genetics and Genomics*, *41*(2), 63–68. <https://doi.org/10.1016/J.JGG.2013.12.001>
- Liao, C., & Beisel, C. L. (2021). The tracrRNA in CRISPR Biology and Technologies. *Annual Review of Genetics*, *55*(1), 161–181. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-071719-022559>
- Lin, H., Wang, M., Chen, Y., Nomura, K., Hui, S., Gui, J., Zhang, X., Wu, Y., Liu, J., Li, Q., et al. (2022). An MKP-MAPK protein phosphorylation cascade controls vascular immunity in plants. *Science Advances*, *8*(10), 8723. <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABG8723>
- Lowder, L. G., Zhang, D., Baltus, N. J., Paul, J. W., Tang, X., Zheng, X., Voytas, D. F., Hsieh, T. F., Zhang, Y., & Qi, Y. (2015). A CRISPR/Cas9 toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation. *Plant Physiology*, *169*(2), 971–985. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00636>
- Lu, D. Y., Davey, M. R., & Cocking, E. C. (1983). A comparison of the cultural behaviour of

- protoplasts from leaves, cotyledons and roots of *Medicago sativa*. *Plant Science Letters*, 31(1), 87–99. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(83\)90132-3](https://doi.org/10.1016/0304-4211(83)90132-3)
- Ma, X., Zhang, Q., Zhu, Q., Liu, W., Chen, Y., Qiu, R., Wang, B., Yang, Z., Li, H., Lin, Y., et al. (2015). A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants. *Molecular Plant*, 8(8), 1274–1284. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.04.007>
- Madhani, H. D., & Fink, G. R. (1998). The riddle of MAP kinase signaling specificity. *Trends in Genetics*, 14(4), 151–155. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(98\)01425-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(98)01425-5)
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Haft, D. H., et al. V. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, 13(11), 722–736. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., & Church, G. M. (2013). RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science*, 339(6121), 823. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1232033>
- Mao, G., Meng, X., Liu, Y., Zheng, Z., Chen, Z., & Zhang, S. (2011). Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23(4), 1639–1653. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.084996>
- Mao, Y., Zhang, H., Xu, N., Zhang, B., Gou, F., & Zhu, J. K. (2013). Application of the CRISPR–Cas System for Efficient Genome Engineering in Plants. *Molecular Plant*, 6(6), 2008–2011. <https://doi.org/10.1093/MP/SST121>
- Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. (2008). CRISPR interference limits horizontal gene transfer in *staphylococci* by targeting DNA. *Science*, 322(5909), 1843–1845. <https://doi.org/10.1126/science.1165771>
- Matsuoka, D., Nanmori, T., Sato, K. I., Fukami, Y., Kikkawa, U., & Yasuda, T. (2002). Activation of AtMEK1, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase, in vitro and in vivo: Analysis of active mutants expressed in *E. coli* and generation of the active form in stress response in seedlings. *Plant Journal*, 29(5), 637–647. <https://doi.org/10.1046/j.0960-7412.2001.01246.x>
- Menéndez-Yuffá, A., & García de García, E. (1997). Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee “Catimor”. *Protoplasma* 1997 199:3, 199(3), 208–214. <https://doi.org/10.1007/BF01294507>
- Meng, X., Shan, L., & He, P. (2015). Stack Heterotrimeric G Proteins and MAPK Cascades on a RACK. *Molecular Plant*, 8(12), 1691–1693. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.11.005>
- Meng, Y., Hou, Y., Wang, H., Ji, R., Liu, B., Wen, J., Niu, L., & Lin, H. (2017). Targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 system in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Cell Reports*, 36(2), 371–374. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2069-9>
- Meskiene, I., Baudouin, E., Schweighofer, A., Liwosz, A., Jonak, C., Rodriguez, P. L., Jelinek, H., & Hirt, H. (2003). Stress-induced protein phosphatase 2C is a negative regulator of a mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(21), 18945–18952. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300878200>
- Meskiene, I., Bögre, L., Glaser, W., Balog, J., Brandstötter, M., Zwerger, K., Ammerer, G., & Hirt, H. (1998). MP2C, a plant protein phosphatase 2C, functions as a negative regulator of mitogen-activated protein kinase pathways in yeast and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(4), 1938–1943. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1938>
- Minkenberg, B., Xie, K., & Yang, Y. (2017). Discovery of rice essential genes by characterizing a CRISPR-edited mutation of closely related rice MAP kinase genes. *Plant Journal*, 89(3), 636–648. <https://doi.org/10.1111/TPJ.13399>
- Mishra, S., Fujita, T., Lama, V. M., Nam, D., Liao, H., Okada, M., Minamoto, K., Yoshikawa, Y., Harada, H., & Pinsky, D. J. (2006). Carbon monoxide rescues ischemic lungs by interrupting MAPK-driven expression of early growth response 1 gene and its downstream target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America*, 103(13), 5191–5196. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600241103>
- Mitten, D. H., Sato, S. J., & Skokut, T. A. (1984). In Vitro Regenerative Potential of Alfalfa Germplasm Sources 1. *Crop Science*, 24(5), 943–945. <https://doi.org/10.2135/cropsci1984.0011183x002400050028x>
- Mochly-Rosen, D., Khaner, H., & Lopez, J. (1991). Identification of intracellular receptor proteins for activated protein kinase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(9), 3997–4000. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.9.3997>
- Mohammadi-Nasab, A., Motallebi-Azar, A., Movafeghi, A., & Dadpour, M. (2011). Callus induction and embryogenesis of alfalfa (*Medicago sativa* L.) using hypocotyl thin cell layer culture. *Russian Agricultural Sciences*, 37(4), 303–306. <https://doi.org/10.3103/s1068367411040148>
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., Soria, E., & Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*, 36(1), 244–246. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>
- Mojica, F. J., Juez, G., & Rodríguez-Valera, F. (1993). Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular microbiology*, 9(3), 613–621. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.1993.TB01721.X>
- Mojica, Francisco, Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), 174–182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- Morrison, D. K. (2012). MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011254>
- Munnik, T., Ligterink, W., Meskiene, I., Calderini, O., Beyerly, J., Musgrave, A., & Hirt, H. (1999). Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress. *Plant Journal*, 20(4), 381–388. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00610.x>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nakagami, H., Kiegerl, S., & Hirt, H. (2004). OMTK1, a novel MAPKKK, channels oxidative stress signaling through direct MAPK interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 26959–26966. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312662200>
- Nakagami, H., Soukupová, H., Schikora, A., Žárský, V., & Hirt, H. (2006). A mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(50), 38697–38704. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605293200>
- Neupane, A., Nepal, M. P., Benson, B. V., MacArthur, K. J., & Piya, S. (2013). Evolutionary history of mitogen-activated protein kinase (MAPK) genes in *Lotus*, *Medicago*, and *Phaseolus*. *Plant Signaling and Behavior*, 8(11), e27189. <https://doi.org/10.4161/psb.27189>
- Niize, M., & Saito, K. (1989). Callus formation from protoplast fusion between leguminous species of *Medicago sativa* and *Lotus corniculatus*. *Japanese Journal of Breeding*, 39(3), 373–377. <https://doi.org/10.1270/jsbbs1951.39.373>
- Ötvös, K., Pasternak, T. P., Miskolczi, P., Domoki, M., Dorjgotov, D., Szucs, A., Bottka, S., Dudits, D., & Fehér, A. (2005). Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *Plant Journal*, 43(6), 849–860. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02494.x>
- Ovečka, M., Takáč, T., Komis, G., Vadovič, P., Bekešová, S., Doskočilová, A., Smékalová, V., Luptovčiak, I., Šamajová, O., Schweighofer, A., et al. (2014). Salt-induced subcellular kinase relocation and seedling susceptibility caused by overexpression of *Medicago* SIMKK in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 65(9), 2335–2350.

- <https://doi.org/10.1093/jxb/eru115>
- Peng, A., Chen, S., Lei, T., Xu, L., He, Y., Wu, L., Yao, L., & Zou, X. (2017). Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene CsLOB1 promoter in citrus. *Plant Biotechnology Journal*, *15*(12), 1509–1519. <https://doi.org/10.1111/pbi.12733>
- Pourcel, C., Salvignol, G., & Vergnaud, G. (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*, *151*(3), 653–663. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27437-0>
- Pul, Ü., Wurm, R., Arslan, Z., Geißen, R., Hofmann, N., & Wagner, R. (2010). Identification and characterization of *E. coli* CRISPR-cas promoters and their silencing by H-NS. *Molecular Microbiology*, *75*(6), 1495–1512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07073.x>
- Purayannur, S., Kumar, K., Kaladhar, V. C., & Verma, P. K. (2017). Phylogenomic analysis of MKKs and MAPKs from 16 legumes and detection of interacting pairs in chickpea divulge MAPK signalling modules. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04913-0>
- Qiu, J. L., Zhou, L., Yun, B. W., Nielsen, H. B., Fiil, B. K., Petersen, K., MacKinlay, J., Loake, G. J., Mundy, J., & Morris, P. C. (2008). *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. *Plant Physiology*, *148*(1), 212–222. <https://doi.org/10.1104/pp.108.120006>
- Quiroz-Figueroa, F. R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R. M., & Loyola-Vargas, V. M. (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *86*(3), 285–301. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9139-6>
- Radović, J., Sokolovic, D., & Markovic, J. (2009). Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnology in Animal Husbandry/Biotehnologija u stocarstvu*, *25*(5-6-1), 465–475. <https://doi.org/10.2298/bah0906465r>
- Rai, M. K., Asthana, P., Jaiswal, V. S., & Jaiswal, U. (2010). Biotechnological advances in guava (*Psidium guajava* L.): Recent developments and prospects for further research. *V Trees - Structure and Function* *24*, (1), 1–12. Springer. <https://doi.org/10.1007/s00468-009-0384-2>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.02.010>
- Rashmi, R., Sarkar, M., & Vikramaditya. (1997). Cultivation of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Ancient science of life*, *17*(2), 117–119.
- Reinert, J. (1958). Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Carotten. *Die Naturwissenschaften*, *45*(14), 344–345. <https://doi.org/10.1007/BF00640240>
- Ron, M., Kajala, K., Pauluzzi, G., Wang, D., Reynoso, M. A., Zumstein, K., Garcha, J., Winte, S., Masson, H., Inagaki, S., et al. (2014). Hairy Root Transformation Using *Agrobacterium rhizogenes* as a Tool for Exploring Cell Type-Specific Gene Expression and Function Using Tomato as a Model. *Plant Physiology*, *166*(2), 455–469. <https://doi.org/10.1104/PP.114.239392>
- Ruduś, I., Kępczyńska, E., & Kępczyński, J. (2002). Regulation of *Medicago sativa* L. somatic embryogenesis by gibberellins. *Plant Growth Regulation*, *36*(1), 91–95. <https://doi.org/10.1023/A:1014751125297>
- 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*(1), 17–23. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.2211>
- Samac, D. A., & Austin-Phillips, S. (2006). Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Methods in molecular biology*, *343*, 301–311. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:301>
- Šamaj, J., Ovečka, M., Hlavačka, A., Lecourieux, F., Meskiene, I., Lichtscheidl, I., Lenart, P., Salaj, J., Volkmann, D., Bögre, L., et al. (2002). Involvement of the mitogen-activated

- protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *EMBO Journal*, 21(13), 3296–3306. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf349>
- Šamajová, O., Komis, G., & Šamaj, J. (2013). Emerging topics in the cell biology of mitogen-activated protein kinases. *Trends in Plant Science*, 18(3), 140–148. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.11.004>
- Šamajová, O., Plihal, 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(1), 118–128. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.12.002>
- Sánchez-León, S., Gil-Humanes, J., Ozuna, C. V., Giménez, M. J., Sousa, C., Voytas, D. F., & Barro, F. (2018). Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnology Journal*, 16(4), 902–910. <https://doi.org/10.1111/PBI.12837>
- 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(8), 278. <https://doi.org/10.3390/plants8080278>
- Sangwan, V., Örvár, B. L., Beyerly, J., Hirt, H., & Dhindsa Rajinder, S. (2002). Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *Plant Journal*, 31(5), 629–638. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01384.x>
- Sapranaukas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*, 39(21), 9275–9282. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr606>
- Saunders, J. W., & Bingham, E. T. (1972). Production of Alfalfa Plants from Callus Tissue. *Crop Science*, 12(6), 804–808. <https://doi.org/10.2135/CROPSCI1972.0011183X001200060026X>
- Schaeffer, H. J., & Weber, M. J. (1999). Mitogen-Activated Protein Kinases: Specific Messages from Ubiquitous Messengers. *Molecular and Cellular Biology*, 19(4), 2435–2444. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.4.2435>
- Schenk, R. U., & Hildebrandt, A. C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, 50(1), 199–204. <https://doi.org/10.1139/b72-026>
- Shetty, K., & McKersie, B. D. (1993). Proline, thioproline and potassium mediated stimulation of somatic embryogenesis in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Science*, 88(2), 185–193. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(93\)90090-M](https://doi.org/10.1016/0168-9452(93)90090-M)
- Shin, J. W., Kim, K.-H., Chao, M. J., Atwal, R. S., Gillis, T., MacDonald, M. E., Gusella, J. F., & Lee, J.-M. (2016). Permanent inactivation of Huntington’s disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9. *Human Molecular Genetics*, 25(20), 4566–4576. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDW286>
- Singer, S. D., Burton Hughes, K., Dhariwal, G. K., Subedi, U., Kader, K., Hannoufa, A., & Acharya, S. (2020). Mutation of MsSPL8 Alleles via CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing Leads to Superior Abiotic Stress Resiliency and Distinct Morphological Alterations in Alfalfa. *Biology and Life Sciences Forum*, 4(1), 67. <https://doi.org/10.3390/iecps2020-08887>
- Singh, R., Lee, M. O., Lee, J. E., Choi, J., Park, J. H., Kim, E. H., Yoo, R. H., Cho, J. Il, Jeon, J. S., Rakwal, et al. (2012). Rice mitogen-activated protein kinase interactome analysis using the yeast two-hybrid system. *Plant Physiology*, 160(1), 477–487. <https://doi.org/10.1104/pp.112.200071>
- Smékalová, V., Doskočilová, A., Komis, G., & Šamaj, J. (2014). Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances*, 32(1), 2–11. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.07.009>
- Steward, F. C., Mapes, M. O., & Mears, K. (1958). Growth and Organized Development of Cultured Cells. II. Organization in Cultures Grown from Freely Suspended Cells. *American Journal of Botany*, 45(10), 705–708. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1958.tb10599.x>

- Stratmann, J. W., & Ryan, C. A. (1997). Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20), 11085–11089. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.20.11085>
- Stuart, D. A., & Strickland, S. G. (1984). Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L.I. the role of amino acid additions to the regeneration medium. *Plant Science Letters*, 34(1–2), 165–174. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(84\)90139-1](https://doi.org/10.1016/0304-4211(84)90139-1)
- Su, J., Xu, J., & Zhang, S. (2015). RACK1, scaffolding a heterotrimeric G protein and a MAPK cascade. *Trends in Plant Science*, 20(7), 405–407. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.05.002>
- Taj, G., Agarwal, P., Grant, M., & Kumar, A. (2010). MAPK machinery in plants: Recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways. *Plant Signaling and Behavior*, 5(11), 1370–1378. <https://doi.org/10.4161/psb.5.11.13020>
- Teige, M., Scheickl, E., Eulgem, T., Dóczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J. L., & Hirt, H. (2004). The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*, 15(1), 141–152. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.06.023>
- Tian, L., Wang, H., Wu, K., Latoszek-Green, M., Hu, M., Miki, B., & Brown, D. (2002). Efficient recovery of transgenic plants through organogenesis and embryogenesis using a cryptic promoter to drive marker gene expression. *Plant Cell Reports*, 20(12), 1181–1187. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0459-7>
- Tran, M. T., Doan, D. T. H., Kim, J., Song, Y. J., Sung, Y. W., Das, S., Kim, E. J., Son, G. H., Kim, S. H., Van Vu, T., & Kim, J. Y. (2021). CRISPR/Cas9-based precise excision of SlHyPRP1 domain(s) to obtain salt stress-tolerant tomato. *Plant Cell Reports*, 40(6), 999–1011. <https://doi.org/10.1007/S00299-020-02622-Z>
- Upadhyay, S. K., Kumar, J., Alok, A., & Tuli, R. (2013). RNA-Guided genome editing for target gene mutations in wheat. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 3(12), 2233–2238. <https://doi.org/10.1534/G3.113.008847>
- Uzelac, B., Ninković, S., Smigocki, A., & Budimir, S. (2007). Origin and development of secondary somatic embryos in transformed embryogenic cultures of *Medicago sativa*. *Biologia Plantarum*, 51(1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/s10535-007-0001-4>
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 233–249. <https://doi.org/10.1023/A:1015673200621>
- Walker, K. A., Wendeln, M. L., & Jaworski, E. G. (1979). Organogenesis in callus tissue of *Medicago sativa*. The temporal separation of induction processes from differentiation processes. *Plant Science Letters*, 16, 23–30. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(79\)90004-X](https://doi.org/10.1016/0304-4211(79)90004-X)
- Wang, C., Shen, L., Fu, Y., Yan, C., & Wang, K. (2015). A Simple CRISPR/Cas9 System for Multiplex Genome Editing in Rice. *Journal of Genetics and Genomics*, 42(12), 703–706. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2015.09.011>
- Wankhede, D. P., Misra, M., Singh, P., & Sinha, A. K. (2013). Rice Mitogen Activated Protein Kinase Kinase and Mitogen Activated Protein Kinase Interaction Network Revealed by *In-Silico* Docking and Yeast Two-Hybrid Approaches. *PLoS ONE*, 8(5), e65011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065011>
- Williams, E. G., & Maheswaran, G. (1986). Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany*, 57(4), 443–462. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087127>
- Wolabu, T. W., Cong, L., Park, J. J., Bao, Q., Chen, M., Sun, J., Xu, B., Ge, Y., Chai, M., Liu, Z., & Wang, Z. Y. (2020). Development of a Highly Efficient Multiplex Genome Editing System in Outcrossing Tetraploid Alfalfa (*Medicago sativa*). *Frontiers in Plant Science*, 11(July), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01063>
- Xie, K., Minkenberg, B., & Yang, Y. (2015). Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(11), 3570–3575.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.1420294112>
- Xing, H. L., Dong, L., Wang, Z. P., Zhang, H. Y., Han, C. Y., Liu, B., Wang, X. C., & Chen, Q. J. (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology*, *14*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0327-y>
- Xiong, L., Lee, M. W., Qi, M., & Yang, Y. (2001). Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *14*(5), 685–692. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.5.685>
- Yin, J., Guan, X., Zhang, H., Wang, L., Li, H., Zhang, Q., Chen, T., Xu, Z., Hong, Z., Cao, Y., & Zhang, Z. (2019). An MAP kinase interacts with LHK1 and regulates nodule organogenesis in *Lotus japonicus*. *Science China Life Sciences* 2019 62:9, *62*(9), 1203–1217. <https://doi.org/10.1007/S11427-018-9444-9>
- Yu, W., Wang, L., Zhao, R., Sheng, J., Zhang, S., Li, R., & Shen, L. (2019). Knockout of SIMAPK3 enhances tolerance to heat stress involving ROS homeostasis in tomato plants. *BMC Plant Biology*, *19*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12870-019-1939-Z>
- Zagorska, N., Dimitrov, B., Gadeva, P., & Robeva, P. (1997). Regeneration and characterization of plants obtained from anther cultures in *Medicago sativa* L. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, *33*(2), 107–110. <https://doi.org/10.1007/s11627-997-0005-y>
- Zhang, F., Wen, Y., & Guo, X. (2014). CRISPR/Cas9 for genome editing: Progress, implications and challenges. *Human Molecular Genetics*, *23*(R1), 40–46. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu125>
- Zhang, S., & Klessig, D. F. (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science*, *6*(11), 520–527. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02103-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02103-3)
- Zhang, Z., Hua, L., Gupta, A., Tricoli, D., Edwards, K. J., Yang, B., & Li, W. (2019). Development of an Agrobacterium-delivered CRISPR/Cas9 system for wheat genome editing. *Plant Biotechnology Journal*, *17*(8), 1623–1635. <https://doi.org/10.1111/pbi.13088>
- Zimmerman, J. L. (1993). Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell*, *5*(10), 1411–1423. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.10.1411>

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

2,4-D	kyselina 2,4-dichlórfenoxyoctová
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABA	kyselina abscisová
ACC	<i>acetyl-coenzymeA carboxylase</i>
Amp ^R	Ampicilín
ApE	A plasmid Editor
AtDsPTP	<i>Arabidopsis thaliana</i> dvojito-špecifická proteín tyrozín fosfatáza (<i>Arabidopsis thaliana</i> dual-specificity protein tyrosine phosphatase)
<i>AtU6</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> ubiquitín 6 promótor
<i>AtUBQ10</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> ubiquitín 10 promótor
BA	6-Benzylaminopurín
BAK1	BRI1-asociovaná receptorová kináza (BRI1-associated receptor kinase 1)
Cas gény	CRISPR asociované gény (CRISPR-associated genes)
Cas9	CRISPR asociovaný proteín 9 (CRISPR associated Protein 9)
CDPK	Ca ²⁺ -závislá proteínkináza (Ca ²⁺ -dependent protein kinase)
CPK	Kalmodulinu podobná doménová proteínkináza (Calmodulin like domain protein kinase)
CRISPR	Zoskupené pravidelne rozmiestnené krátke palindromické opakovania (<u>C</u> lustered <u>R</u> egularly <u>I</u> nterspaced <u>S</u> hort <u>P</u> alindromic <u>R</u> epeats)
crRNA	crisprRNA
<i>CsLOB1</i>	<i>Citrus sinensis lateral organ boundaries 1</i>
CTD	C-terminálna doména (C-terminal domain)
DSP	Dvojito-špecifické fosfatázy (Dual-specificity phosphatase)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiaminotetraoctová kyselina
ERK	Extracelulárne-signalom-regulované kinázy (Extracellular-signal-regulated kinases)
FLS2	Flagelín senzitivny receptor 2 (Flagellin sensitive 2)
<i>G. max</i>	<i>Glycine max</i>
GFP	zelený fluorescenčný proteín
gRNA	navádzacia RNA (guide RNA)
HAMK	Tepelným šokom mitogénom-aktivovaná proteínkináza (Heat shock mitogen-activated protein kinase)
HDR	Homológne riadená oprava (homology-directed repair)
<i>IAP</i>	<i>Alkaline phosphatase</i>
JNK	c-Jun N-terminálne kináza (c-Jun N-terminal kinase)
<i>M. sativa</i>	<i>Medicago sativa</i>
<i>M. truncatula</i>	<i>Medicago truncatula</i>
MAPK, MPK	Mitogénom-aktivovaná proteínkináza (Mitogen-activated protein kinase)

MAPKK, MAP2K	Mitogénom-aktivovaná proteínkináza kináza (Mitogen-activated protein kinase kinase)
MAPKKK, MAP3K	Mitogénom-aktivovaná proteínkináza kináza kináza (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase)
MAPKKK1, MEKK1	MAPKK kináza 1 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1)
MAPKKK4	MAPKK kináza 4 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4)
MAPKKK6	MAPKK kináza 6 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6)
MAPKKK18	MAPKK kináza 18 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 18)
MAPKKK32	MAPKK kináza 32 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 32)
MAPKKK36	MAPKK kináza kináza 36 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 36)
MAPKKK41	MAPKK kináza 41 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 41)
MAPKKK49	MAPKK kináza 49 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 49)
MAPKKK52	MAPKK kináza 52 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 52)
MAPKKK57	MAPKK kináza 57 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 57)
MAPKKK59	MAPKK kináza 59 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 59)
MES	2(N-morfolino)etánsulfónová kyselina
MKK2	MAPK kináza 2 (Mitogen-activated protein kinase kinase 2)
MKK4	MAPK kináza 4 (Mitogen-activated protein kinase kinase 4)
MKK5	MAPK kináza 5 (Mitogen-activated protein kinase kinase 5)
MKP1	MAPK fosfatáza 1 (MAPK phosphatase 1)
MMK	<i>Medicago</i> mitogénom-aktivované proteínkináza (<i>Medicago</i> mitogen-activated protein kinase)
MP2C	<i>Medicago</i> fosfatase 2C
MPK4	MAP kináza 4 (Mitogen-activated protein kinase 4)
MPK6	MAP kináza 4 (Mitogen-activated protein kinase 6)
mRNA	mediátorová RNA
<i>MsPALM1</i>	<i>Medicago sativa palmate-like pentafoliata1</i>
<i>MsSGR</i>	<i>Medicago sativa stay green</i>
<i>MsSPL8</i>	<i>Medicago sativa Squamosa promoter binding protein like 8</i>
NAA	kyselina 1-naftyloctová
NHEJ	Oprava nehomológnym koncovým spájaním (nonhomologous end-joining)
NPE	nepriama somatická embryogenéza
NUC	nukleázový lalok (nuclease lobe)
<i>O. sativa</i>	<i>Oryza sativa</i>

OMTK1	Oxidatívnym stresom aktivovaná MAPKKK1 (Oxidative stress-activated MAPKKK 1)
p38/SAPK	p38/stresom-aktivované proteínkináza (p38/stress-activated protein kinase)
PAM	protospaceru príľahlý motív (protospacer adjacent motif)
Pcas	Promótor <i>cas</i>
PcUbi(P)	ubiquitínový promotor z petržľenu (<i>Petroselinum crispum</i> ubiquitin promotor)
pDNA	plazmidová DNA
PDS	<i>Phytoene desaturase</i>
PP2C	proteínová fosfatáza typu 2C (Protein phosphatase of type 2C)
Ppt ^R	Fosfinotricín
PRKK	Patogén reagujúca MAPKK (Pathogen-Responsive Mitogen activated protein kinase kinase)
PSE	priama somatická embryogenéza
PSTP	serín/treonínové fosfatázy (Protein serine/threonine phosphatase)
PTG	polycistronická tRNA-gRNA (polycistronic tRNA-gRNA)
PTP	proteín tyrozín fosfatáza (Protein tyrosine phosphatase)
RACK1	Receptor pre aktivovanú C kinázu (Receptor for activated C kinase 1)
REC	alfa-helikálny rozpoznávajúci lalok (alpha-helical recognition lobe)
Rif ^R	Rifampicín
RSY	Regen SY kultivar
SAMK	Stresom aktivovaná MAPK (Stress-activated MAPK)
SE	Somatická embryogenéza
sgRNA	Jednovláknová navádzacia RNA (single guide RNA)
SIMK	Stresom indukovaná MAPK (Stress induced MAPK)
SIMKK	Stres indukovaná MAPKK (Stress-induced MAPKK; SIMKK)
<i>S. (Ensifer) meliloti</i>	<i>Sinorhizobium (Ensifer) meliloti</i>
SIHyPRP1	<i>Solanum lycopersicum</i> hybrid proline-rich protein 1
SpCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9
Spe ^R	Spektinomycín
SPL9	Squamosa promoter binding protein like 9
SRSRs	Krátke pravidelne oddelené opakovania (Short Regularly Spaced Repeats)
<i>TaCKX2</i>	<i>Triticum aestivum</i> cytokinin oxidase/dehydrogenase
TDY motív	treonín-asparagin-tyrozín motív
TEY motív	treonín-kyselina glutámová-tyrozín motív
Tic ^R	Tikarcilín
tracrRNA	trans-aktivujúca RNA
WRKY	WRKY transkripčný faktor (WRKY transcription factor)