

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



Funkcia alternatívneho zostrihu génu *MPK13* počas kvitnutia v *Arabidopsis thaliana*

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor: Bc. Janka Lokajová

Študijný program: N0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství

Študijný obor: Biotechnologie a genové inženýrství

Forma štúdia: Prezenčná

Vedúci práce: Mgr. Ivan Luptovčíak , Ph.D.

Rok: 2026

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstiev. Súhlasím so zverejnením diplomovej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som oboznámená 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

.....
Bc. Janka Lokajová

Podakovanie:

„V prvom rade by som rada poďakovala vedúcemu diplomovej práce Mgr. Ivanovi Luptovčiakovi, Ph.D. za všetky cenné rady, pripomienky, vynaložený čas a vedenie počas spracovania tejto práce. Zároveň patrí veľká vďaka aj celému kolektívu katedry biotechnológií za ich ochotu vždy pomôcť a poradiť. Taktiež ďakujem pánovi prof. RNDr. Jozefovi Šamajovi, DrSc., za možnosť pracovať v laboratóriu. Táto práca bola podporená študentským projektom IGA_PrF_2025_020.“

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora Bc. Janka Lokajová

Názov práce Funkcia alternatívneho zostrihu génu *MPK13* počas kvitnutia v *Arabidopsis thaliana*

Typ práce diplomová

Pracovisko Katedra biotechnológií

Vedúci práce Mgr. Ivan Luptovčíak, Ph.D.

Rok obhajoby práce 2026

Abstrakt

Práca sa venuje štúdiu mitogen-aktivovaných proteín kináz (MAPKs). Dôležitým komponentom rastlinnej signalizácie zodpovedných za prenos signálu a tvorbu odpovedi na podmienky okolia. Konkrétne sa práca zameriava na dve ortológne kinázy prvého rádu *AtMPK13* a *MsMMK3*. V práci boli pripravené vstupné komponenty pre molekulárne klonovanie trojkomponentovou reakciou systému „Multisite Gateway“. Jednokomponentovou reakciou bol pripravený jeden fluorescenčne značený konštrukt génu *MPK13*. Prebehla úspešná validácia daného konštruktú v bode tranzientnej transformácie listov *N. benthamiana*. Taktiež boli vykonané analýzy prítomnosti a následne aj hladín jednotlivých *MPK13* transkriptov, za účelom overenia dostupných T-DNA inzerčných línii na pracovisku a s cieľom vysvetliť pozorované rozdiely v predchádzajúcej bakalárskej práci. Transkripty boli detegované vo všetkých troch mutantných líniiach a dané fenotypové analýzy boli následne rozpracované aj v diplomovej práci, pričom poukázali na veľmi mierne fenotypové rozdiely medzi jednotlivými líniami. Okrem práce zameranej na gén *MPK13* bola počas diplomovej práce vykonaná validácia potenciálnej CRISPR KO mutantnej línie v ortológnom géne *MMK3* Lucerny siatej. V tomto prípade bola identifikovaná jedna mutantná rastlina s prítomnou editáciou v oboch alelách kódujúcich daný gén. Tento rastlinný materiál bol následne zmnožený dvomi rôznymi metódami a uchovaný pre ďalšie potenciálne experimenty.

Kľúčové slová arabkovka Thalova, *MPK13*, kvitnutie, *MMK3*, Lucerna siata

Počet strán 111

Počet príloh 2

Jazyk slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Janka Lokajová
Title	Function of alternative splicing of the <i>MPK13</i> gene during flowering in <i>Arabidopsis thaliana</i>
Type of thesis	Master
Department	Department of biotechnology
Supervisor	Mgr. Ivan Luptovčiak, Ph.D.
The year of presentation	2026

Abstract

The thesis is focused on the study of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), an important component of plant signaling responsible for signal transduction and the generation of responses to environmental conditions. Specifically, the work focuses on two orthologous first-order kinases, AtMPK13 and MsMMK3. In this work, entry components for molecular cloning were prepared using a three-component reaction of the Multisite Gateway system. A single fluorescently labeled construct of the *MPK13* gene was prepared using a one-component reaction. Successful validation of this construct was carried out at the level of transient transformation of *N. benthamiana* leaves. Analyses of the presence and subsequently also the levels of individual *MPK13* transcripts were performed in order to verify the available T-DNA insertion lines at the workplace and to explain the observed differences reported in the previous bachelor's thesis. Transcripts were detected in each of the three mutant lines and phenotypic analyses were further elaborated in the diploma thesis. These analyses revealed only very subtle phenotypic differences among the individual lines. In addition to the work focused on the *MPK13* gene, validation of a potential CRISPR knock-out mutant line in the orthologous *MMK3* gene of alfalfa was performed during the thesis. In this case, one mutant plant was identified carrying an edit in both alleles encoding the given gene. This plant material was subsequently propagated using two different methods and preserved for further potential experiments.

Keywords	Mouse-ear thale-cress, MPK13, flowering, alfalfa, <i>MMK3</i>
Number of pages	111
Number of appendices	2
Language	Slovak

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Súčasný stav riešenej problematiky	2
2.1	Kvitnutie	2
2.2	MsMMK3 a AtMPK13	3
2.3	Genetické modulátory kvitnutia	4
2.3.1	FLC	4
2.3.2	ABI5.....	6
2.3.3	FT.....	8
2.3.4	SOC1.....	10
2.3.5	CO	10
2.3.6	LFY	12
2.4	Endogénne faktory	13
2.4.1	Hormóny regulujúce kvitnutie	13
2.4.1.1	Giberelíny	13
2.4.1.2	Kyselina abscisová	16
2.4.2	ROS.....	17
2.4.3	Vek.....	18
2.4.4	Cirkadiánnny rytmus.....	19
2.4.5	Autonómna dráha.....	20
2.5	Exogénne faktory	21
2.5.1	Teplota	21
2.5.2	Vernalizácia	23
2.5.3	Fotoperiódá	24
2.6	Zostrih pre-mRNA	24
2.7	Alternatívny zostrih a jeho vzťah k regulácii kvitnutia.....	26
3	Experimentálna časť	29
3.1	Materiál	29
3.1.1	Chemikálie	29
3.1.2	Prístroje a zariadenia.....	30
3.1.3	Roztoky a média	31
3.1.4	Servery a databázy	33
3.1.5	Software	34

3.1.6 Biologický materiál.....	34
3.2 Metódy.....	36
3.2.1 <i>In silico</i> analýzy	36
3.2.1.1 Porovnanie nukleotidových a aminokyselinových sekvencií.....	36
3.2.2 Sekvenovanie rastlín <i>Medicago sativa</i>	36
3.2.2.1 Izolácia genomickej DNA	37
3.2.2.1 Stratégia sekvencovania	37
3.2.2.2 Amplifikácia úsekov záujmu pomocou PCR	39
3.2.2.3 Sekvenovanie PCR produktov.....	41
3.2.2.4 Klonovanie PCR produktov a sekvenovanie plazmidov	41
3.2.3 Rozmnoženie rastlinného materiálu.....	43
3.2.4 Analýza hladín transkriptov v mutantných líniiach <i>mpk13</i>	44
3.2.4.1 Izolácia mRNA	44
3.2.4.2 Prepis mRNA do cDNA	46
3.2.4.3 Semi qPCR	47
3.2.4.4 RT-qPCR	48
3.2.5 Molekulárne klonovanie metódou Multisite Gateway.....	50
3.2.5.1 Agarózová gélová elektroforéza.....	50
3.2.5.2 Príprava PCR produktu pre BP reakciu.....	50
3.2.5.3 Rekombinačné reakcie (BP a LR reakcia).....	52
3.2.6 Príprava elektrokompetentných buniek	52
3.2.7 Transformácia kompetentných buniek <i>E. coli</i>	53
3.2.8 PCR kolónií.....	54
3.2.9 Izolácia plazmidovej DNA	56
3.2.9.1 Izolácia pDNA.....	56
3.2.10 Restrikčné štiepenie plazmidov	56
3.2.11 Transformácia chemokompetentných buniek <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ..	56
3.2.12 Tranzientná transformácia listov <i>N. benthamiana</i>	57
3.2.13 Analýza fúzných proteínov	57
3.2.13.1 Extrakcia proteínov	58
3.2.13.2 Stanovenie koncentrácie proteínov	58
3.2.13.3 SDS-PAGE	59
3.2.13.4 Natívna elektroforéza.....	59
3.2.13.5 Western-blot.....	59
3.2.14 Mikroskopická analýza	60

3.2.15	Povrchová sterilizácia semien <i>A. thaliana</i>	60
3.2.15.1	Kultivácia <i>A. thaliana</i> v <i>in vitro</i> podmienkach.....	61
3.2.16	Fenotypová analýza rastlín <i>A. thaliana</i>	61
3.2.16.1	Fenotypová analýza trichómov	61
3.2.16.2	Fenotypová analýza doby kvitnutia	62
3.2.16.3	Fenotypová analýza dĺžky hypokotylu	63
4	Výsledky	64
4.1	Sekvencovanie rastlín <i>M. sativa</i>	64
4.1.1	PCR amplifikácia želaných úsekov záujmu génu <i>MMK3</i>	64
4.1.2	Sekvenovanie PCR produktov, klonovanie a <i>in silico</i> analýza	65
4.1.3	Sekvenovanie PCR produktov	67
4.1.4	Klonovanie PCR produktov a validácia CRISPR-KO línie.....	68
4.2	<i>In silico</i> analýza dostupných sekvencií <i>MMK3</i>	70
4.3	Klonovanie proteínu MPK13 vo fúzii s fluorescenčným proteínom.....	72
4.3.1	Klonovanie konštruktov pre trojkomponentnú reakciu	72
4.3.2	Klonovanie konštruktu pre 1 komponentnú reakciu.....	74
4.3.3	Overenie expresie konštruktu v listoch <i>N. benthamiana</i>	76
4.3.4	Detekcia fúzneho proteínu YFP-MPK13.....	77
4.4	Transkripčná analýza mutantných línií <i>mpk13</i>	79
4.4.1	Izolácia mRNA	79
4.4.2	Semi qPCR.....	80
4.4.3	RT-qPCR	81
4.5	Fenotypová analýza mutantných línií <i>mpk13 A. thaliana</i>	83
4.5.1	Fenotypová analýza kvitnutia	83
4.5.2	Fenotypová analýza hypokotyllov	85
4.5.3	Fenotypová analýza trichómov	86
5	Diskusia	87
5.1	Screening a validácia CRISPR KO mutantných línií <i>Medicago sativa</i>	87
5.2	Klonovanie konštruktu fluorescenčne značeného génu <i>MPK13</i>	89
5.3	Transkripty generované alternatívnym zostrihom génu	91
5.4	Fenotypové analýzy	92
5.4.1	Analýza doby kvitnutia.....	93
5.4.2	Analýza dĺžky hypokotyllov	94
5.4.3	Analýza trichómov	94

6	Záver.....	96
7	Literatúra.....	97
7.1	Odborná literatúra.....	97
7.2	Hypertextové odkazy.....	106
8	Zoznam skratiek.....	107
9	Zoznam príloh.....	111

Ciele práce

Teoretická časť:

V rámci teoretickej časti bude vypracovaná rešerš zameraná na problematiku:

1. Proces kvitnutia v *Arabidopsis thaliana* a jeho regulácie skrz MAPK, ROS, hormóny.
2. Alternatívneho zostrihu a jeho funkciu vo vývoji/v kvitnutí rastlín *Arabidopsis thaliana*

Praktická časť:

Praktická časť diplomovej práce bude zameraná na:

1. Príprava a molekulárne klonovanie konštruktu génu *MPK13* pod kontrolou rôznych typov promótorov (natívny a konštitutívny promótor pre ubiquitín z *A. thaliana*)
2. RT-PCR analýzy *mpk13* línií zamerané na detekciu zostrihových variant.
3. Fenotypové analýzy *Arabidopsis thaliana* zamerané na znaky odzrkadľujúce predbežné výsledky *in silico* analýz (trichómov, dĺžky hypokotylu, dĺžky kvitnutia).
4. Screening a sekvenácia pripravených CRISPR KO mutantných línií pre gén *MMK3* v diplomovej práci Zelinková, 2024. Následné vyhodnotenie sekvenácií a rozšírenie vypracovaných *in silico* analýz v bakalárskej práci so zameraním na 4 rôzne sekvencie génu *MMK3* dostupné v databáze AlfalfaToolBox, prípadné rozšírenie 3D proteínových modelov. Zmnoženie identifikovaných mutantných rastlín

1 Úvod

Práca sa venuje štúdiu mitogen aktivovaných proteín kináz (MAPKs), konkrétne kináze prvého rádu v *Arabidopsis thaliana* označovanej ako AtMPK13 a jej ortológnej kináze v Lucerne siatej MsMMK3.

MAPK predstavujú veľmi početnú skupinu proteínov, ktoré sú zodpovedné za prenos signálu a tvorbu odpovedi v reakcii na stres a okolité podmienky. Nakoľko sa rastliny zaraďujú medzi sesilné organizmy, tento spôsob prenosu signalizácie je v ich prípade veľmi sofistikovaný a komplexný. MAP kinázová kaskáda je zodpovedná za prenos signálu a následne MAPK prvého rádu signál posúva ďalej na efektorové proteíny, ktoré sú samotnými vykonávateľmi odpovede. Takto sú rastliny schopné efektívne reagovať na širokú škálu podnetov od abiotického stresu ako je napríklad stres zo sucha, chladu, tepla až po biotický spôsobený inými organizmami (Rodriguez *et al.*, 2010).

Študovaná kináza prvého rádu MPK13 je na základe súčasnej literatúry zapojená do tvorby bočných koreňov (Zeng *et al.*, 2011b), expresia génu nastáva aj v počas mitózy (Menges *et al.*, 2008) a nadexpresia génu bola taktiež detegovaná v trojitých mutantných líniiach pre katalázu *cat1/2/3* (Su *et al.*, 2018). Jej úloha v kvitnutí v *A. thaliana* nebola doposiaľ popísaná. Súčasná literatúra uvádza spojenie tohto génu s procesom kvitnutia iba v prípade rastliny z druhu chryzantém *Chrysanthemum morifolium* Ramat (Liu *et al.*, 2023).

Na druhej strane gén *MMK3* predstavuje kinázu zapojenú do reakcie na oxidatívny stres, k jej aktivácii dochádza aj vplyvom etylénu a v prítomnosti patogénu (Cardinale *et al.*, 2000; Nakagami *et al.*, 2004). Jej aktivita bola taktiež zaznamenaná v bunkovom cykle, konkrétne po tvorbe fragmoplastu (Bögre *et al.*, 1999).

Práca sa taktiež zoberala validáciou potenciálnej CRISPR KO mutantnej línie tohto génu v Lucerne siatej za účelom prípravy materiálu pre možné fenotypové analýzy využívajúce divoký typ RSY, nadexpresnú líniu pripravenú a validovanú počas bakalárskej práce (*AtUBQ10::YFP:gMMK3*) a práve potenciálnu KO líniu. Prípadné fenotypové analýzy by v tomto prípade mohli poukázať na rolu génu v Lucerne siatej, vo významnej krmovine bohatej na biomasu obsahujúcu proteíny, čo prispieva k jej ekonomickému potenciálu.

2 Súčasný stav riešenej problematiky

2.1 Kvitnutie

Prechod ku kvitnutiu je proces, počas ktorého rastlina prechádza z vegetatívnej fázy do generatívnej. Vegetatívna fáza začína klíčením semena a pokračuje tvorbou vegetatívnych orgánov ako sú koreň, stonka a listy. V tejto fáze dochádza k tvorbe primordii zo stonkového apikálneho meristému (SAM, z angl. „shoot apical meristem“). Prechod ku kvitnutiu sa vyznačuje zmenou SAM na „inflorescence meristem“/kvetenstvomý meristem (IM). Tento meristem je však iba medzistupňom na ceste vedúcej k tvorbe kvetných meristémov (FM). IM sa vyvinie v FM a tie následne dávajú základ kvetným orgánom. Nesleduje tak generatívna fáza zabezpečujúca produkciu pohlavných buniek a ďalšej generácie. Počas prechodu stonkový meristem mení identitu a stáva sa z neho meristem reprodukčný tvoriaci kvetné primordiá. Prechod ku kvitnutiu je tak vývojová hranica medzi vegetatívnou a generatívnou fázou rastliny, čiže moment, keď sa SAM reprogramuje na kvetný meristem. Jedná sa o ireverzibilnú zmenu, ktorá podlieha prísnej regulácii z dôvodu zabezpečenia nasledujúcej generácie (Quiroz *et al.*, 2021).

Regulácia tohto procesu spočíva v zložitej sieti rôznych regulátorov a podnetov, ktoré sú medzi sebou poprepájané a vytvárajú tak komplexnú sieť. Dôležité sú nielen genetické, ale aj epigenetické a environmentálne faktory. Komplexná sieť pozostáva z rôznych dráh reagujúcich na endogénne a environmentálne podnety, ktoré však ústia k najhlavnejším komponentom a integrátorom regulujúcich/podnecujúcich prechod ku kvitnutiu ako sú SOC1, FT a AGL24. Tie majú následne za úlohu reguláciu ďalších génov ako AP1, LFY (2.3.6), SEP3 a „FRUITFUL“ (FUL), ktoré ireverzibilne podporujú prechod ku tvorbe kvetného meristému. Medzi dôležité exogénne faktory patrí fotoperiódou, vernalizácia, teplota ale aj kvalita a intenzita osvetlenia. Na druhej strane medzi faktory endogénne sa zaraďujú hladiny hormónov a dostupných cukrov či vek alebo cirkadiánnny rytmus. Medzi hlavné dráhy, ktoré regulujú kvitnutie radíme dráhy riadené fotoperiódou, vernalizáciou, teplotou okolia, gibberelovou kyselinou, autonómne dráhy a dráhy závislé od veku rastliny (Blümel *et al.*, 2015; Fornara *et al.*, 2010).

2.2 MsMMK3 a AtMPK13

Proteín MMK3 radíme do kategórie mitogen-aktivovaných proteín kináz prvého rádu o veľkosti 44 kDa. Zvýšená expresia tohto génu bola detegovaná po vystavení rastlín elicitoru pochádzajúceho z bunkových stien kvasiniek (Cardinale *et al.*, 2000) a najvyššia abundancia bola zaznamenaná v aktívnych meristémoch Lucerny siatej (Bögre *et al.*, 1999). MMK3 sa podieľa na odpovedi rastliny na prítomnosť patogénu, no zároveň je zapojená aj do tvorby odpovedí na oxidatívny stres (Nakagami *et al.*, 2004) a stres z ťažkých kovov (Jonak *et al.*, 2004).

MMK3 bola lokalizovaná v deliacich sa bunkách koreňovej špičky, pričom prítomnosť proteínu bola detegovaná počas všetkých fáz mitózy. Kinázová aktivita bola však zaznamenaná až po metafáze počas tvorby fragmoplastu. Inhibícia depolymerizovanými mikrotubulmi počas anafázy a telofázy naznačuje potrebu intaktných mikrotubulov pre správnu aktiváciu. MMK3 sa podieľa na regulácii rastlinnej mitotickej cytokinézy (Bögre *et al.*, 1999) no súčasne je MMK3 aktivovaná aj v odpovedi na patogénny elicitor, čo môže naznačovať prepojenie medzi stavbou a fortifikáciou bunkových stien ako odpoveď na prítomnosť patogénu (Cardinale *et al.*, 2000).

MAPK označovaná ako MPK13 je kináza obsahujúca fosforylačný TEY motív, patriaca do skupiny B, ktorá zahŕňa kinázy zapojené do reakcií na okolité podmienky, ale aj do bunkového delenia. (Ichimura, 2002) K jej aktivácii dochádza prostredníctvom nadradenej MAPKK MKK6 (Melikant *et al.*, 2004). MPK13 predstavuje proteín o veľkosti 42 kDa. Gén kódujúci tento proteín obsahuje alternatívny zostrih, ktorý vedie k tvorbe troch foriem proteínu. Okrem plnej dĺžky vznikajú dve skrátené formy ponechaním štvrtého alebo piateho intrónu, čo vedie k predčasnej tvorbe STOP kodónu a narušeniu C-konca proteínu. Tieto formy majú porušené CD domény potrebné pre interakcie s MAPKK, fosfatázami a substrátmi, pričom ponechanie štvrtého intrónu narúša aj kinázovú doménu (Lin *et al.*, 2010). Krátky variant vykazoval nižšiu mieru interakcie s MKK6 a absentovala jeho fosforylácia aj autofosforylácia, avšak jeho prítomnosť zároveň viedla k zvýšenej aktivácii dlhej formy skrz MKK6 (Lin *et al.*, 2010; Zeng, 2010).

Expresia *MPK13* bola detegovaná v koreňoch, kvetoch a pupeňoch, pričom aktivita promotora bola pozorovaná najmä v koreňovej špičke a v miestach emergencie bočných koreňov (Zeng, *et al.*, 2011b). MPK13 môže byť zapojená aj do modulácie

mikrotubulárneho cytoskeletu, pričom ortológy MPK13 v rastlinných druhoch sú spájané s cytokínézou, tvorbou fragmoplastu či gamét. (Bögre *et al.*, 1999; Calderini *et al.*, 1998). Ortológ *ScMPK13* je súčasťou kaskády zapojenej do vývoja samčieho a samičieho gametofytu a je koexprimovaný s nadradenými kinázami v pupeňoch a reprodukčných pletivách (Daigle *et al.*, 2019).

Okrem vývojových procesov sa MPK13 podieľa aj na odpovediach na okolité podmienky. Fosforylácia MPK13 bola zaznamenaná po ošetroaní flg22 spolu s MPK11 a MPK4 (Bethke *et al.*, 2012; Nitta *et al.*, 2014). Nad-regulácia MPK13 bola zaznamenaná aj pri kultivácii semenáčikov pri 28 °C spolu s MPK4 a MPK7 (Verma *et al.*, 2023) a podľa doposiaľ nepublikovaných výsledkov dochádza k aktivácii MPK13 aj skrz etylén (Ouaked *et al.*, 2003). Gén *MPK13* spolu s *MPK11* boli nad-regulované aj v trojitom katalázovom mutantovi *cat1/2/3* so zvýšenou expresiou *OXI1* (z angl. „oxidative-signal inducible 1“) (Su *et al.*, 2018). V podmienkach rôzneho obsahu fosforu mutantné línie *mpk13* vykazovali v zvýšenej koncentrácii fosforu znížený rast primárneho koreňa a zároveň oneskorené kvitnutie v podmienkach zvýšenej aj zníženej koncentrácie fosforu (Liu *et al.*, 2023). MPK13 spolu s MPK11 zároveň vykazovali silnú mieru interakcie s MYB75 v kvasinkovom dvojhybridnom systéme (Kreynes *et al.*, 2020).

2.3 Genetické modulátory kvitnutia

2.3.1 FLC

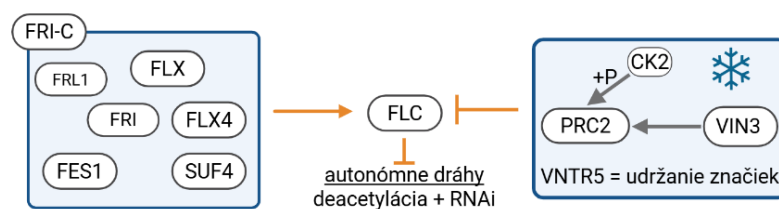
Za hlavný represor kvitnutia je možné označiť FLOWERING LOCUS C (FLC). Tento gén kóduje MADS-box transkripčný faktor a priamo v SAM inhibuje FLOWERING LOCUS T (FT) a SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1), čím je zaistená prevencia predčasného kvitnutia. Inhibícia je zaistená skrz interakciu FLC ako transkripčného faktoru s oblasťou v promótoře génu SOC1 a s oblasťou prvého intrónu génu FT, ktoré boli potvrdené metódou imunoprecipitácie chromatinu. (Helliwell *et al.*, 2006).

Jeho aktivita je regulovaná prevažne pomocou troch systémov. Medzi jeho hlavné regulátory patrí komplex založený na proteíne FRIGIDA (FRI). Tento komplex je tvorený proteínom FRI, ktorý funguje ako kostrový proteín a spolu s FLC-špecifickými regulátormi FRL1 (FRIGIDA-LIKE 1), FES1 (FRI ESSENTIAL 1), SUF4 (SUPPRESSOR OF FRIGIDA 4), FLX (FLC EXPRESSOR) a FLX4 (FLC

EXPRESSOR 4) vytvárajú komplex zvaný FRI-C. Jedná sa o komplex aktivujúci transkripciu, ktorý spolupracuje s modifikátormi histónov, čím udržiava chromatin v oblasti génu *FLC* v aktívnom stave a zabezpečuje tak jeho transkripciu. Vázobná aktivita komplexu FRI-C je modulovaná skrz defosforyláciu FLX4 fosfatázou CPL3 (CTD PHOSPHATASE-LIKE 3). Defosforylácia FLX4 umožňuje väzbu komplexu FRI-C čím sa zvýši miera transkripcie *FLC* a oddiali sa tak prechod ku kvitnutiu (Shen *et al.*, 2022).

Zvýšenú expresiu génu *FLC* vplyvom komplexu FRI-C je možné potlačiť obdobím vernalizácie. Proces expozície chladu spúšťa expresiu génu VERNALIZATION INSENSITIVE 3 (VIN3), ktorý rekrutuje POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX (PRC2) k *FLC* génu. PRC2 komplex svojou metyltransferázovou aktivitou obohacuje oblasť *FLC* génu o represívne chromatinové značky (H3K27me3) a tak suprimuje jeho expresiu (obr. 1). V prípade predĺženého obdobia chladu dochádza k fosforylácii podjednotky s metyltransferázovou aktivitou skrz kazein kinázu CK2, čo prináša stabilizáciu a ďalšie šírenie trimethylácii v oblasti *FLC* génu. Pre udržiavanie epigenetických značiek a zníženej expresie *FLC* je potrebný VNTR5 (Variable Number of Tandem Repeats 5), ktorý stabilizuje represívny stav, vzniká epigenetická pamäť a rastlina môže začať proces prechodu ku kvitnutiu (Zeng *et al.*, 2025; Zografos a Sung, 2012).

Okrem génu *FRI* a vernalizácie môže byť gén *FLC* regulovaný aj skrz autonómne dráhy, ktoré potláčajú jeho expresiu. Fungujú antagonisticky k FRI-C komplexu a paralelne s vernalizáciou. Nereagujú na žiadny konkrétny podnet. Jedná sa skôr o typ dráhy, ktorý koreluje s vekom rastliny. Sú potrebné na zabezpečenie prechodu ku kvitnutiu aj v prípade, že nenastanú optimálne podmienky. Dráhy vnímajú vek rastliny, postupne narastá miera umlčania *FLC* a v určitom bode sú schopné spustiť prechod ku kvitnutiu aj bez výraznejších stimulov. Umlčanie *FLC* je možné hlavne pomocou dvoch mechanizmov. Deje sa tak skrz epigenetické modifikácie ako sú deacetylácie pre vybudovanie neaktívneho chromatinu v oblasti génu *FLC* a procesovanie RNA založené hlavne na interferencii RNA s lokusom *FLC* (Kyung *et al.*, 2022).



Obr. 1: Detailný popis regulácie génu *FLC*. Oranžová farba značí epigenetickú reguláciu. Upravené podľa (Shen *et al.*, 2022; Zeng *et al.*, 2025). Vytvorené v biorender.com

Oddialenie prechodu ku kvitnutiu skrz *FLC* je spôsobené aj kyselinou abscisovou, na ktorú reaguje ABI5 (ABA-Insensitive 5), ktorý následne aktivuje *FLC*, čo vyústi do oddialenia procesu (Wang *et al.*, 2013). ABI5 zároveň interaguje s FCS-LIKE ZINC FINGER PROTEIN 13 (FLZ13) za účelom zvýšenia expresie *FLC*. Okrem interakcie FLZ13 s ABI5 taktiež nastáva interakcia s *FLC*, ktorá vyústi do vyššej miery inhibície *FT* a *SOC1* (Li *et al.*, 2024).

Okrem ABI5 je regulátorom kvitnutia skrz *FLC* aj ABI4 a ABI2. V prípade ABI4 sa taktiež jedná o negatívnu reguláciu. Patrí do skupiny transkripčných faktorov s AP2/ERF doménou a zvyšuje tak expresiu *FLC* (Shu *et al.*, 2016). Na druhej strane ABI2 prechod ku kvitnutiu podporuje a to skrz inhibíciu expresie *FLC* zapríčinenú skrz ABI5 (Ali *et al.*, 2024).

2.3.2 ABI5

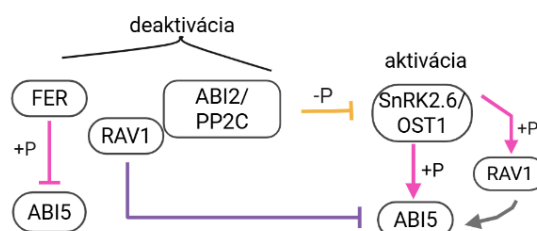
Už spomínaný ABI5 je proteín zaradovaný medzi BASIC LEUCINE ZIPPER (bZip) transkripčné faktory. K jeho expresii dochádza vplyvom kyseliny abscisovej a na transkripčnej úrovni zvyšuje mieru expresie *FLC*, čím sa podieľa na oddialení procesu kvitnutia. Okrem toho je taktiež aktívny v semenách kde reguluje ich dormanciu a inhibuje klíčenie v nepriaznivých podmienkach (Collin *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2013).

Pri regulácii ABI5 zohráva dôležitú úlohu fosforylácia prinášajúca ďalší rozmer regulácie. Prináša hlavne zvýšenú transkripčnú aktivitu a stabilitu proteínu ABI5. V proteínovej štruktúre bolo identifikovaných 16 rôznych konzervovaných miest vhodných pre fosforyláciu a to na mieste serínu a treonínu (Du *et al.*, 2025). Pričom dáta ukazujú, že nemožnosť fosforylácie 3 aminokyselinových zbytkov spôsobenej náhradou za alanín (S42A, S145A, T201A) vyústila do dysfunkcie signalizácie skrz kyselinu abscisovú a zmenu doby kvitnutia, čo naznačuje potrebu fosforylácie ABI5 pre zvýšenie expresie *FLC* (Wang *et al.*, 2013).

Medzi kinázy fosforylujúce ABI5 patria napríklad kinázy z rodiny SnRK2, potvrdzujú to aj experimenty využívajúce trojité mutantné línie *snrk2.2/2.3/2.6*, kedy tieto línie vykazovali zníženú mieru fosforylácie ABI5 (Nakashima *et al.*, 2009). Práve kináza SnRK2.6 je zodpovedná za fosforyláciu ABI5 v kontexte kvitnutia a vyúsťuje do zvýšenej expresie *FLC* a oddialenia kvitnutia. Môže byť označovaná aj ako OPEN STOMATA (OST1), nakoľko ABA zohráva úlohu aj v procese pohybu prieduchov. Práve v bode fosforylácie ABI5 skrz kinázu OST1 účinkuje aj ABI2. Ako fosfatáza typu PP2C funguje ako antagonista a skrz defosforyláciu OST1 kinázy je zodpovedná za pozitívnu reguláciu prechodu ku kvitnutiu (Ali *et al.*, 2024).

Fosforylácia ABI5 prebieha aj skrz iné kinázy ako napríklad vápnik závislá proteín kináza 6 (CDPK6), Raf-like kináza 10 (RAK10) či mitogen aktivovaná proteín kináza 1 pochádzajúca z *Malus domestica* (MdMAPK1). Fosforylácia však môže v prípade ABI5 znamenať aj stratu stability proteínu a jeho transkripčnej aktivity. Receptorová kináza FERONIA (FER) fosforyluje ABI5 v konzervovanom mieste S145 a aj keď toto miesto zdieľa napríklad s kinázami SnRKs tak jej účinok je presne opačný. Táto dualita opäť vedie k zvyšovaniu komplexity regulácie ABA signalizácie (Du *et al.*, 2025; Wang *et al.*, 2022).

Ďalšiu úroveň regulácie skrz fosforyláciu prináša transkripčný faktor Related to ABI3/VP1 (RAV1). Tento transkripčný faktor reguluje expresiu *ABI3/4/5*. RAV1 obvyčajne reprimuje *ABI5*, no po fosforylácii kinázou SnRK2.6 alebo inak nazývanou aj OST1 je jeho aktivita inhibovaná (Obr. 2). S týmto faktom koreluje aj výsledok nadexpresie *RAV1* génu v *A. thaliana*., ktorá spôsobila skoršie kvitnutie (Feng *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2004).



Obr. 2: detailná schéma regulácie ABI5 skrz jeho fosforyláciu. Ružová – fosforylácia, žltá – defosforylácia, fialová – inhibícia na transkripčnej úrovni. Upravené podľa (Feng *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2013). Vytvorené v biorender.com

2.3.3 FT

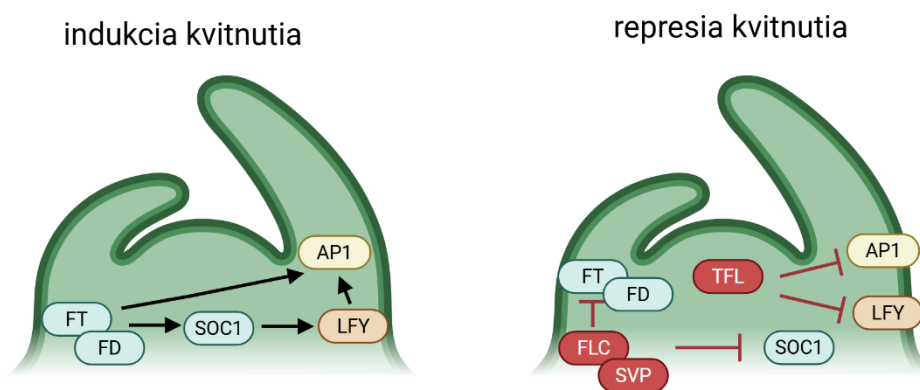
FLOWERING LOCUS T (FT) kóduje mobilný proteín, ktorý je označovaný za hlavný komponent v procese prechodu ku kvitnutiu. Jeho nadexpresia vyústi v skoré kvitnutie a mutantné línie postrádajúce tento gén vykazujú fenotyp oneskoreného kvitnutia nezávisle na dĺžke dňa. Tento proteín je produkovaný v sprievodných bunkách floému listov a skrz floém je transportovaný do SAM, kde podnecuje prechod ku kvitnutiu. V SAM interaguje s bZIP transkripčným faktorom zvaným FD a s kostrovým proteínom označovaným 14-3-3. Spolu vytvárajú florigen aktivujúci komplex (FAC) a aktivujú transkripčné faktory APETALA 1 a SPL v kvetnom meristéme (FM), ktoré sa ďalej podieľajú na procese kvitnutia (obr. 3). FT spolu s GIGANTEA (GI) a CONSTANS (CO) patrí medzi regulátory reagujúce na fotoperiódou, pričom k expresii *FT* vplyvom tejto kaskády dochádza v podmienkach dlhého dňa. Aktivácia *FT* ako odpoveď na dlhú fotoperiódou prebieha pomocou CONSTANS na transkripčnej úrovni (Freytes *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2021).

Zároveň je potreba aj negatívna regulácia *FT*. Tá nastáva hlavne pri nižších teplotách. Jedným z mnohých negatívnych regulátorov je MADS-box transkripčný faktor SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP). Ten sa pri nižších teplotách viaže na cis-elementy *FT* a znižuje jeho expresiu. SVP zároveň podnecuje expresiu MYB transkripčného faktora EARLY FLOWERING MYB PROTEIN (EFM), ktorý spolu s SVP účinkujú ako represori *FT*. Okrem toho SVP spolupracuje aj s najvýznamnejším centrálnym represorom kvitnutia a to s FLC. Ten spolu s SVP vytvára heterodimérny komplex a viažu sa na promótorovú sekvenciu *FT*. Rovnako ako *FLC* je aj *FT* umlčovaný epigenetickými modifikáciami. Konkrétne sa jedná o metyláciu spôsobenú PRC2 komplexom počas vegetatívneho obdobia (Liu *et al.*, 2021).

Do rovnakej rodiny (PEPB- phosphatidylethanolamine-binding protein) ako FT patrí aj TFL1. Tieto dva proteíny vykazujú vysokú podobnosť čo sa sekvencie týka no zároveň v regulácii kvitnutia zohrávajú opačné role. Jedná sa o antagonistu, ktorý sa taktiež vyskytuje v SAM. Pri interakcii TFL1 s FD však nastáva potlačenie génov zapojených v kvitnutí a udržanie stavu SAM (Zhu *et al.*, 2020).

Fosforylácia prináša ďalšiu možnosť regulácie aj v tomto prípade. Cieľom tejto post-translačnej modifikácie je EFM s dvomi fosforylačnými miestami (S147, S148). Zvýšenie schopnosti EFM viazať sa na oblasť chromatinu odpovedajúcej génu *FT* je

zabezpečené defosforyláciou skrz rastlinnú CTD fosfatázu C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE 2 (CPL2). Experimenty ukazujú, že fosforylácia reziduí S147, S148 znamenala stratu schopnosti asociovať s *FT* promótorom, čo viedlo k neschopnosti supresie a zvýšenej expresii *FT*. Výsledky poukazujú že defosforylácia je kritická pre správne načasovanie prechodu ku kvitnutiu (Zhang *et al.*, 2024).



Obr. 3: Schematické zobrazenie SAM a jeho prechodu na FM vplyvom aktivátorov. červená – represor, zelená – integrátor kvitnutia, žltá – gén zaistujúci identitu meristému. Upravené podľa (Adrian *et al.*, 2009). Vytvorené v biorender.com

2.3.4 SOC1

Gén *SOC1* kóduje MADS-box transkripčný faktor integrujúci viaceré signály zodpovedné za reguláciu kvitnutia. Za jeho pozitívnu reguláciu je nepriamo zodpovedný CO. Na druhej strane ako negatívny regulátor funguje FLC. Ako negatívny regulátor vystupuje aj SVP pričom sa priamo viaže na promótor *SOC1*. Aktivácia skrz CO je nepriama a vyžaduje FT avšak represor FLC sa viaže priamo na promótor *SOC1*. K aktivácii *SOC1* dochádza aj skrz SPL9 a *miRNA* 156 v dráhe závislej na starnutí rastliny. Akonáhle je *SOC1* indukovaný tak spolu s AGL24 priamo aktivujú *LFY* (Lee a Lee, 2010; Li *et al.*, 2008).

SOC1 je ďalej regulovaný aj skrz proteín patriaci do rodiny transkripčných faktorov Teosinte Branched 1/Cycloidea/Proliferating Cell Factor (TCP). Konkrétne sa jedná o TCP7, ktorý nielenže reguluje expresiu viacerých génov zapojených v kvitnutí ako napríklad *FT*, *FLC*, *CO* a *SVP* ale pracuje aj v synergii spolu s CO a NF-Y a spolu aktivujú *SOC1* v odpovedi na fotoperiódou. Transkripčný faktor NF-Y (Nuclear Factor Y) zohráva rolu priekopníka v narušení okolia neaktívneho chromatinu a je možné, že spolu s TCP7 a CO menia štruktúru chromatinu a tak podnecujú transkripciu *SOC1*. (Li *et al.*, 2021; Tao *et al.*, 2017).

2.3.5 CO

CONSTANS (CO) je dôležitým regulátorom kvitnutia v kontexte fotoperiódou, cirkadiálneho rytmu a svetelných signálov. Vplyvom svetla dochádza k jeho stabilizácii a funguje ako transkripčný faktor. Konkrétne patrí do rodiny transkripčných faktorov zvaných B-Box Zinc Finger (BBX). Viaže sa priamo na promótorové sekvencie génu *FT* a nepriamo podnecuje aj expresiu *SOC1*. Spolu v komplexe s NF aktivujú expresiu *FT* skrz väzbu na jadrové promótorové sekvencie a distálny enhancer. Táto väzba je umožnená skrz tvorbu chromatinových smyčiek, ktoré antagonizujú účinok komplexov PRC2 a dochádza tak k transkripcii *FT* (Cheng a Wang, 2005; Jing *et al.*, 2019).

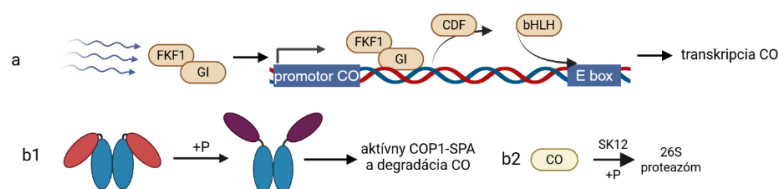
Vzhľadom na to, že kvitnutie reguluje v kontexte cirkadiálneho rytmu tak jeho miera expresie vykazuje oscilácie. Na transkripčnej úrovni je riadená proteínom FKF1, ktorý patrí medzi F-box proteíny. Obsahuje LOV doménu citlivú na modré svetlo. Po absorbovaní vlnových dĺžok zodpovedajúcim modrému svetlu sa stáva aktívnym a vytvára komplex s GIGANTEA (GI). Komplex sa viaže na promótor, odstraňuje

represory CYCLING DOF FACTORS (CDF) a aktivuje transkripciu. Po disociácii CDF represorov taktiež nastupujú transkripčné faktory bHLH viažuce sa na E-box cis elementy promótoru CO (obr. 4a). K jeho silnej expresii dochádza v popoludňajších hodinách, no zároveň k jeho stabilizácii je nevyhnutné modré svetlo. A preto k jeho zvýšenej aktivite odchádza počas dlhých dní, kedy je prítomnosť mRNA doplnená o potrebné svetlo (Ito *et al.*, 2012b; Sawa *et al.*, 2007).

Potrebné modré svetlo je zachytávané skrz kryptochróm 2 (cry2), fytochróm A (phyA) a FKF1. Tie následne stabilizujú CO proteín a chránia ho pred degradáciou v 26S proteazóme. Na druhej strane, receptor červeného svetla fytochróm B (phyB) je zodpovedný za degradáciu v ranných hodinách. (Hajdu *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2012).

V prípade fytochrómu B je prítomná regulácia fosforyláciou. Proteín po fosforylácii rezidua S86 zrýchľuje proces reverzie, pri ktorej dochádza ku konverzii časti proteínu zodpovednej za absorpciu z aktívnej (Pfr) do neaktívnej konformácie (Pr). Práve Pfr forma je zodpovedná za stabilizáciu CO proteínu v nočných hodinách, kedy Pfr inhibuje COP1-SPA (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 -SUPPRESSOR OF PHYA-105) ubiquitínový ligázový komplex. Teda po prechode do inaktívnej formy Pr nie je COP1-SPA komplex inhibovaný a dochádza tak k degradácii CO (obr. 4b1) (Hajdu *et al.*, 2015).

K priamej regulácii skrz fosforyláciu dochádza skrz kinázu SK12 (SHAGGY-like kinase 12), ktorá priamo fosforyluje CO čím prispieva k jeho degradácii. Interakcia sa odohráva priamo v jadre buniek. Ako primárne miesto fosforylácie bolo identifikované reziduuum T119, ktoré sa nachádza v konsenzuálnom motíve rozoznávanom GSK3 kinázami. Fosforylovaná forma je následne degradovaná v 26S proteazóme (obr. 4b2) (Chen *et al.*, 2020).



Obr. 4: Schéma regulácie transkripcie CO génu (a) a samotného CO proteínu (b). Gén je pozitívne regulovaný na transkripčnej úrovni skrz modré svetlo a FKF1 (a). Pomocou fosforylácie PhyB dochádza k prechodu z aktívnej do neaktívnej formy a je tak umožnená degradácia CO (b1). Priama fosforylácia CO proteínu zabezpečujúce jeho degradáciu skrz 26S proteazóm (b2). Upravené podľa (Ito, *et al.*, 2012a). Vytvorené v biorender.com.

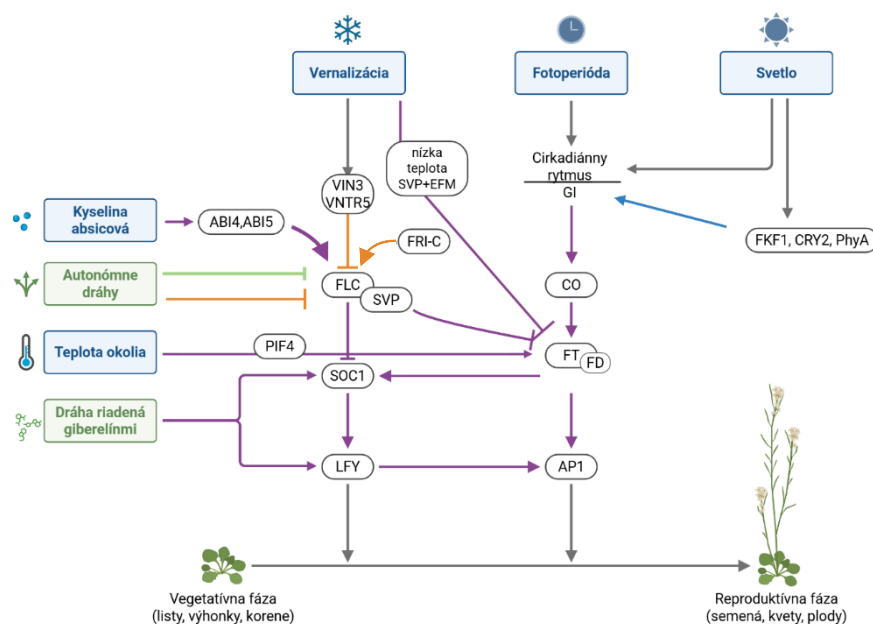
2.3.6 LFY

LEAFY je centrálnym integrátorom rôznych podnetov regulujúcich kvitnutie od fotoperiód cez vek až po hormóny. Reaguje na rôzne stimuly, vzájomne ich prepája a určuje identitu meristému pri premene zo SAM na FM. V SAM dochádza k jeho aktivácii nepriamo skrz FT-FD komplex aktivujúci SOC1, ktorý následne aktivuje *LFY* (Park *et al.*, 2023).

LFY je nadregulovaný skrz giberelíny, ktoré sú hlavným komponentom hormonálnej regulácie kvitnutia. Regulácia sa odohráva na transkripčnej úrovni, keďže v promótorovej oblasti génu *LFY* sa vyskytujú väzobné miesta zodpovedné za odpoveď na tento hormón. Za aktívnu a najsilnejšiu formu čo sa aktivácie týka je považovaná GA4 forma. Táto forma je zároveň najviac zastúpená v SAM pri procese prechodu ku kvitnutiu. Nakoľko je *LFY* regulovaný aj SPL transkripčnými faktormi tak v regulácii jeho exprese hrajú úlohu aj *miRNA*. Jeho expresiu reguluje aj SVP a AGL24 (Eriksson *et al.*, 2006; Freytes *et al.*, 2021; Siriwardana a Lamb, 2012).

LFY po prechode SAM na FM ďalej aktivuje na transkripčnej úrovni *AP1*, čo môže viesť k stabilizácii samotného *LFY* v mieste kvetného meristému a vzájomnej aktivácii. Je považovaný za pioniersky TF, pre jeho väzbu nie je potreba vopred rozvolnený chromatín a viaže sa priamo do nukleozómov. Po väzbe na DNA rekrutuje chromatín remodelujúce komplexy. *AP1* je MADS-box transkripčný faktor, pomáha udržať identitu FM a jeho hlavnou úlohou je vývoj kvetu a diferenciácia kvetných orgánov (Jin *et al.*, 2021; Winter *et al.*, 2015).

Na obrázku 5 je *LFY* zobrazený ako jeden z kľúčových komponentov regulácie spolu s ostatnými regulátormi procesu prechodu ku kvitnutiu, tvoriac tak zložitú regulačnú sieť závislú nielen od endogénnych faktorov, ale aj od podmienok okolia, ktoré sú ďalej zhrnuté v nasledujúcich kapitolách (obr. 5).



Obr. 5: Schéma zobrazujúca hlavné regulátory kvitnutia a interakcie medzi nimi a ich podnety. Upravené podľa (Blümel *et al.*, 2015). Farby reprezentujú rôzne úrovne regulácie (fialová – transkripčná, oranžová – epigenetická, modrá – post-translačná, zelená – post-transkripčná). Vytvorené v biorender.com

2.4 Endogénne faktory

Endogénne faktory predstavujú signály vychádzajúce priamo z fyziologického a vývojového stavu rastliny. Medzi kľúčové patria hladiny rastlinných hormónov, ako sú giberelíny a kyselina abscisová (ABA), ktoré prostredníctvom interakcie s transkripčnými faktormi a represormi koordinujú začiatok kvitnutia. Svoju nezastupiteľnú úlohu zohrávajú aj reaktívne formy kyslíka (ROS), ktoré môžu fungovať ako sekundárni poslovia a modulátori hormonálnej aj genetickej regulácie. Ďalším zásadným parametrom je vek rastliny, ktorý prostredníctvom regulácie *miRNA* a génov rodiny *SPL* zabezpečuje, že kvitnutie nastáva až po dosiahnutí vývojovej zrelosti. Významnú časť tvorí aj cirkadiánnny rytmus, ktorý zosúladzuje expresiu génov s denným cyklom. Nakoniec, tzv. autonómna dráha pôsobí nezávisle od environmentálnych stimulov a zabezpečuje prechod rastliny do reprodukčnej fázy aj v prípade nepriaznivých vonkajších podmienok.

2.4.1 Hormóny regulujúce kvitnutie

2.4.1.1 Giberelíny

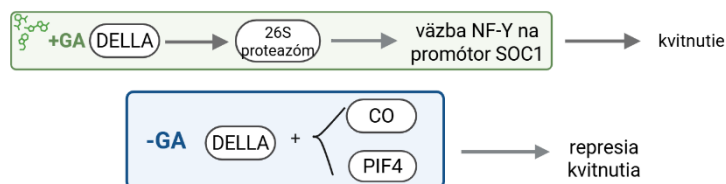
Giberelíny boli z pomedzi fytohormónov identifikované ako hlavné pozitívne regulátory kvitnutia. Medzi najviac biologicky aktívne radíme GA_1 , GA_3 , GA_4 a GA_7 , ktoré sú

odvodené od základného diterpenoidného karboxylového skeletu a obsahujú C3-hydroxylovú skupinu a C6-karboxylovú skupinu. Prísna regulácia giberelínov je zabezpečená cez kontrolu biosyntetických a degradačných enzýmov z triedy oxidáz. Najdôležitejšie komponenty v tejto signalizačnej dráhe sú receptory giberelínov (GID1), represory rastu tzv. DELLA proteíny a F-box proteíny SLEEPY1 (SLY1). Okrem hlavných komponentov GA signalizácie, za ktoré sú považované DELLA proteíny je dôležitá taktiež homeostáza, časovo-priestorová regulácia a transport (Achard *et al.*, 2009; MacMillan, 2001; Mitchum *et al.*, 2006; Yamaguchi, 2008).

Hlavným komponentom regulácie kvitnutia skrz giberelíny sú DELLA proteíny z rodiny GRAS [REPRESSOR OF *ga1-3* (RGA), GA-INSENSITIVE (GAI), RGA-LIKE 1 (RGL1), RGL2, and RGL3]. Tieto proteíny sú v prítomnosti GA degradované skrz 26S proteazóm a je umožnené kvitnutie. Naopak v podmienkach nízkej hladiny GA sú tieto proteíny zodpovedné za represiu signalizačnej dráhy. Sú schopné interakcie a regulácie veľkého množstva transkripčných faktorov v listoch a SAM za účelom represie kvitnutia. Giberelíny v listoch pôsobia počas dlhých dní ako transkripčný aktivátor génu *FT*. Na druhú stranu DELLA proteíny negatívne ovplyvňujú viaceré aktivátory *FT* ako napríklad priamou väzbou CO, čo má za následok sekvestráciu CO z promótorovej oblasti *FT* za podmienok dlhého dňa. Taktiež môže dochádzať k narušeniu väzby medzi CO a B podjednotkou „nuclear factor Y“ (NFY) čím je potlačené kvitnutie skrz SOC1. Medzi ďalšie TF ktoré by inak podnecovali expresiu *FT* ale sú vychytávané DELLA proteínmi patrí napríklad aj PIF4 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4, podkapitola 2.5.1), ktorý by inak spolu s CO v podmienkach vyšších teplôt spolupracoval na aktivácii *FT* (Obr. 6). Okrem sekvestrácie aktivátorov *FT* proteínu môžu DELLA proteíny taktiež interagovať so supresormi ako je napríklad MYC3 (Fernández *et al.*, 2016; Galvão *et al.*, 2012; Porri *et al.*, 2012; Sun a Gubler, 2004; Xu *et al.*, 2016).

Viacere štúdie naznačujú, že GA v podmienkach krátkeho dňa podnecujú kvitnutie skrz indukciu *SOC1* a *LFY*, pričom *SOC1* bol navrhnutý ako hlavný gén odpovedajúci na GA. Konkrétne sa jednalo o GA₃ v podmienkach krátkeho dňa. Avšak na druhej strane k nadregulácii vplyvom GA dochádza aj v prípade *FT*. Pričom vyššie levely *SOC1* sú pravdepodobne spôsobené zvýšenou expresiou *FT* nakoľko je tento gén jeho aktivátorom (Bao *et al.*, 2019; Moon *et al.*, 2003).

GA signalizácia moduluje expresiu SOC1 aj na epigenetickej úrovni skrz NF-Y komplex. Akonáhle dôjde k degradácii DELLA proteínov vplyvom prítomnosti GA tak faktor NF-Y je uvoľnený a viaže sa na SOC1 promótor, reguluje metyláciu DNA cez rekrutovanie demethylázy *RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6* (REF6) čím podnecuje expresiu (Obr. 6) (Hou *et al.*, 2014).



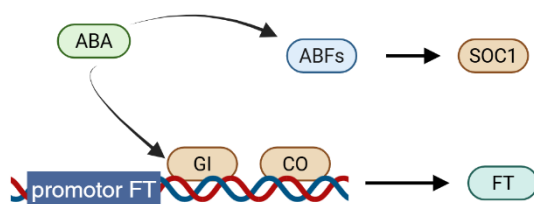
Obr. 6: Schéma regulácie kvitnutia skrz giberelíny a ich prítomnosť/neprítomnosť pomocou proteínu DELLA ako hlavného regulátora v tejto dráhe skrz vychytávanie dôležitých komponentov signalizácie. Upravené podľa (Gao *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2014). Vytvorené v biorender.com

2.4.1.2 Kyselina abscisová

Kyselina abscisová (ABA) je považovaná za hlavný fytohormón zodpovedný za reakciu na abiotický stres. ABA však zohráva rolu aj v prípade regulácie kvitnutia. Jej účinky závisia od okolností a tak môže kvitnutie podporovať, no zároveň je schopná ho aj oddialiť. V prípade reprodukčnej fázy rastliny je ABA zodpovedná za prechod ku kvitnutiu, vývoj kvetu a taktiež za vývoj semena (Collin a Daszkowska-Golec, 2025).

Mechanizmus signalizácie spočíva v percepcii kyseliny abscisovej receptormi z rodiny PYRABACTIN RESISTANCE PROTEINS/PYR-LIKE PROTEINS/REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTOR (PYR/PYL/RCAR). Po väzbe kyseliny s receptorom nasleduje konformačná zmena receptora, ktorá zabezpečí väzbu s proteín fosfatázou PP2C označovanej aj ako ABI2. Tá funguje ako hlavný represor ABA signalizácie. Deaktivácia fosfatázy zabezpečí možnú fosforyláciu transkripčných faktorov z rodiny bZIP. Fosforylácia prebieha pomocou kináz z rodiny SnRK2. Tieto kinázy následne fosforylujú transkripčné faktory ako ABRE BINDING FACTORS/ABRE-BINDING PROTEINS (ABFs/AREBs), ABF1, ABF2/AREB1, ABF4/AREB2, ABF3, a ABA INSENSITIVE5 (ABI5) (Sun *et al.*, 2020). V prípade kvitnutia je najdôležitejšia kináza SnRK2.6 inak nazývaná aj OST1, ktorej cieľom je práve TF ABI5. Ten po fosforylácii zohráva centrálnu rolu v prípade oddiaľovania kvitnutia skrz aktiváciu *FLC* génu a následnú inhibíciu *FT* a *SOC1*. ABI2 je naopak zodpovedná za defosforyláciu ABI5 a tak ju môžeme označovať za pozitívny regulátor kvitnutia (Collin *et al.*, 2021).

Okrem ABI2 bola aj ABA aktivovaná mitogen aktivovaná proteín kináza 3 (MPK3) zaznamenaná ako negatívny regulátor ABI5. Fosforylácia ABI5 touto kinázou blokovala schopnosť ABI5 tvoriť homodiméry a indukovať expresiu *FLC*. Fosforylácia priniesla ďalšiu vrstvu regulácie v prípade dlhotrvajúceho stresu (Bhagat *et al.*, 2025). Okrem negatívnej regulácie kvitnutia je kyselina abscisová spojená aj s jeho pozitívnou reguláciou a to konkrétne v prípade obdobia sucha. V podmienkach dlhého dňa ABA podnecuje expresiu *FT* a *SOC1* čím urýchľuje kvitnutie. V tomto prípade je v ABA-závislej indukcii týchto génov zapojená GI a deje sa tak pomocou CO. Proces je taktiež regulovaný skrz ďalšie dva ABA závislé TF a to konkrétne ABF3 a ABF4, ktorých väzobné miesta boli identifikované v promótoroch *SOC1*. Zároveň ďalší TF AREB3 interaguje s *FT* a *FD* za účelom indukcie kvitnutia počas dlhých dní (Obr. 7) (Hwang *et al.*, 2019; Martignago *et al.*, 2023; Riboni *et al.*, 2016; Shavrukov *et al.*, 2017).



Obr. 7: Schéma podnecovania kvitnutia skrz ABA počas dlhých dní pomocou nepriameho zvyšovania expresie génov FT a SOC1. Upravené podľa (Martignago *et al.*, 2020). Vytvorené v biorender.com

2.4.2 ROS

Reaktívne formy kyslíka (ROS, z angl. „reactive oxygen species“) medzi ktoré zaraďujeme molekuly ako superoxid (O_2^-), peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxylové radikály ($\cdot OH$) patria medzi produkty metabolizmu a plnia úlohu sekundárnych poslov v rastlinnej signalizácii. Okrem ich signalizačnej role však môže dochádzať k oxidatívne mu poškodeniu molekúl ako sú proteíny, lipidy a DNA. Následne aj rastlinných pletív a preto je dôležitá ich regulácia a homeostáza. Regulácia je zabezpečená buď enzymaticky alebo neenzymaticky. Medzi enzymatické mechanizmy radíme enzýmy ako superoxid dismutázy, katalázy a peroxidázy. Na druhej strane k neenzymatickému systému zaraďujeme askorbát a glutatión (Wang *et al.*, 2024).

ROS signalizácia je tesne prepojená s hormonálnou signalizáciou a je zodpovedná za vývoj, rast a odpoveď na biotický a abiotický stres. V rámci vývoja je ROS signalizácia spojená a s procesmi prechodu ku kvitnutiu či už skrz hormonálne alebo genetické dráhy. V SAM dochádza pri procesoch vývoja kvetu k akumulácii ROS a pribúdajú dôkazy, ktoré naznačujú úlohu ROS ako integrátorov hormonálnych signálov a transkripcie génov potrebných pre reguláciu rastu, polarity a vývoja kvetu (Schippers *et al.*, 2016).

Histologické štúdie potvrdzujú akumuláciu ROS v rastlinných meristémoch. Za využitia fluorescenčných farbív bola potvrdená lokalizácia superoxidu v centrálnej zóne (CZ) meristému za účelom udržania proliferácie skrz aktiváciu WUSCHEL a CLAVATA3 a výskyt peroxidu vodíka bol zaznamenaný v periférnej zóne (PZ) pre podnietenie diferenciácie. V oblasti SAM je peroxid vodíku veľmi reaktívny a tak je potrebná jeho precízna kontrola. Signalizácia skrz ROS v tejto oblasti využíva redoxom regulovanú fázovú separáciu proteínov. V tomto prípade sa jedná o kontrolu prechodu kvitnutia skrz transkripčný faktor „TERMINATING FLOWER“ (TMF). Mechanizmus fázovej separácie zabezpečený cez intra- a inter-molekulárne disulfidické väzby na

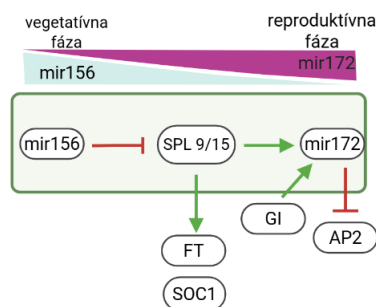
cysteínových zbytkoch TMF proteínu. spôsobenými skrz aktivitu peroxidu vodíka. Výsledné kondenzáty sa viažu k promótoru génu *ANATHA*, čím reprimujú jeho expresiu a prechod ku kvitnutiu (Huang *et al.*, 2021; Zeng *et al.*, 2017).

2.4.3 Vek

Signálna dráha založená na veku rastliny je založená na module pozostávajúceho z microRNA (*miRNA*). *miRNA* predstavujú malé nekódujúce RNA zložené z 20-24 nukleotidov, ktoré sú zodpovedné za kontrolu expresie na post-transkripčnej úrovni skrz väzbu na špecifické gény. Výsledkom môže byť degradácia transkriptu prípadne znížená miera translácie (Carrington a Ambros, 2003).

Hlavnú rolu v tomto prípade hrajú *mir156* a *mir172*. Úloha *mir156* spočíva v regulácii génov z rodiny „Squamosa Promoter Binding Protein-Like“ (*SPL*). Počas ranných vývojových štádií je *mir156* abundančná a dochádza k represii *SPL* génov (*SPL3*, *SPL9* a *SPL15*), čo má za následok znemožnenie kvitnutia. S pribúdajúcim vekom rastliny však abundancia *mir156* klesá a *SPL* gény sú postupne čoraz aktívnejšie. Dochádza tak k stimulu transkripcie génov asociovaných s kvitnutím ako *FT* a *SOC1* čo prispieva k prechodu ku kvitnutiu (Wang, 2014).

Na regulácii procesov kvitnutia sa taktiež podieľa aj *mir172* avšak jej účinok je presne opačný. Zatiaľ čo *mir156* umlčuje gény *SPL* v ranných štádiách, tak expresia *mir172* je práve *SPL* génmi aktivovaná postupne smerom k neskorším štádiám, kedy znížená hladina *mir156* zabezpečí vyššiu mieru expresie *mir172* skrz gény *SPL*. Následne skrz *mir172* dochádza k represii génov, ktoré fungujú ako supresori kvitnutia, ako je napríklad *APETALA-2* (*AP2*). Spolu tak vytvárajú model *miR156-SPL-mir172*, kedy s rastúcim vekom stúpa expresia génov *SPL* podnecujúcich kvitnutie a klesá expresia represorov kvitnutia (Obr. 8) (Spanudakis a Jackson, 2014).



Obr. 8: Schéma postupnej zmeny expsie dvoch hlavných microRNA vplyvom veku rastliny a ich dopad na aktiváciu konkrétnych génov zapojených v kvitnutí. Upravené podľa (Spanudakis a Jackson, 2014) . Vytvorené v biorender.com

2.4.4 Cirkadiánnny rytmus

Rastlinné cirkadiánne hodiny môžu byť označené za endogénny molekulárny oscilátor, ktorý kontroluje cirkadiánnny rytmus v opakujúcich sa intervaloch trvajúcich približne 24 hodín. Tieto hodiny regulujú viaceré fyziologické procesy ako je fotosyntéza, rast, odpovede na stresové podmienky ale aj procesy kvitnutia za účelom efektívneho využívania zdrojov (Sanchez a Kay, 2016).

Cirkadiánnny rytmus je úzko prepojený s okolitými faktormi ako sú teplo a svetlo a je potrebná synchronizácia fyziologických procesov a vnútorných molekulárnych hodín s okolím. Tá sa deje pomocou fotoreceptorov, ktoré sú schopné regulovať cirkadiánne hodiny na základe priamej interakcie s jednotlivými komponentami tohto molekulárneho mechanizmu. Medzi tieto fotoreceptory radíme receptory červeného svetla PHY a receptory modrého svetla CRYPTOCHROMES (CRY), ZETLUPE (ZTL), FLOWERING KELCH FACTOR 1 (FKF1) a LOV KELCH PROTEIN2 (LKP2) (Creux a Harmer, 2019).

Ďalej tento molekulárny mechanizmus obsahuje transkripčné aktívatory a represory, ktoré spolu vytvárajú komplexnú regulačnú sieť zloženú z regulačných smyčiek. Medzi tie, ku ktorých expresii dochádza v ranných hodinách zaradujeme *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1* (CCA1) a *LATE ELONGATED HYPOCOTYL* (LHY). Tie sú zodpovedné za represiu génov z rodiny *PSEUDORESPONSE REGULATOR* (PRR). Naopak gény *PRR1*, *PRR5*, *PRR7* a *PRR9* sú exprimované v neskorších hodinách a spätne inhibujú CCA1 a LHY čím sa uzatvára smyčka (Huang *et al.*, 2012; Nakamichi *et al.*, 2010).

Hlavným regulátorom kvitnutia v závislosti od cirkadiálneho rytmu je gén *CO*, ktorého úloha, mechanizmus a prepojenie s génmi ako *GI*, *SOC1* a *FT* už boli popísané vyššie. Tieto gény sú však ovplyvňované aj inými komponentami cirkadiálneho rytmu. *CCA1* priamo reprimuje expresiu *GI*, *SOC1* a *FT* skrz väzbu na promótorovú oblasť. Podobne aj *LHY* kóduje represor kvitnutia príbuzný s *CCA1* (Lu *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2016).

Naopak spomínané *PRR* gény priamo interagujú s *CO*, čím zvyšujú jeho stabilitu počas dňa a tak nie je možná jeho degradácia skrz E3 ligázu CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) tak ako sa tomu deje v tme. Navyše aktivita COP1 je na svetle suprimovaná skrz *PHYA*, *CRY1*, and *CRY2* (Hayama *et al.*, 2017; Sarid-Krebs *et al.*, 2015).

2.4.5 Autonómna dráha

Tak ako hovorí jej pomenovanie je to dráha, ktorá kvitnutie reguluje nezávisle na okolí. Táto dráha zabezpečuje aby kvitnutie nastalo aj bez špecifického externého či interného podnetu. Jej hlavnou úlohou je skrz autonómne gény ako sú *FLOWERING LOCUS CA (FCA)*, *FLOWERING LOCUS D (FLD)*, *FLOWERING LOCUS KH DOMAIN (FLK)*, *FLOWERING LOCUS PA (FPA)*, *FLOWERING LOCUS VE (FVE)*, *FLOWERING LOCUS Y (FY)* a *LUMINIDEPENDENS (LD)* potláčať expresiu *FLC*. Ten funguje ako negatívny regulátor a jeho represiou je umožnený prechod ku kvitnutiu (Cheng *et al.*, 2017).

Spomínané autonómne gény regulujú levely *FLC* génu hlavne skrz post-transkripčnú reguláciu RNA a epigenetické modifikácie chromatinu. V prípade regulácie transkriptu RNA sa jedná hlavne o gény *FCA* a *FPA*. Tieto dva proteíny obsahujú RNA-špecifický rozpoznávací motív, ktorým sa vedia na RNA naviazať a následne regulujú alternatívnu polyadenyláciu antisense RNA génu *FLC*. S génom *FPA* je spájaný aj gén *FVE* a na druhej strane je s génom *FCA* spájaný gén *PCFS4 (Protein for Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor 4)*, ktorý bol identifikovaný ako nový komponent regulujúci polyadenyláciu. Pravdepodobne interaguje s *FCA* a môže sa tak tvoriť komplex *FCA*, *FPA* a *FY* spolu s *PCF4* za účelom regulácie *FLC* expresie (Liu a Mara, 2010; Marquardt *et al.*, 2006; Xing *et al.*, 2008).

Gény *FCA* a *FPA* na genetickej úrovni interagujú aj s génom *FLD*, ktorý kóduje histón demethylázu, čím prepájajú reguláciu RNA a chromatínu. Aktívna expresia génu *FLC* je výsledkom vysokej miery methylácie typu H3K4 okolo miesta iniciácie transkripcie. Gény ako *FLD*, *FVE* či *LD* znižujú expresiu *FLC* skrz modifikáciu histónov prítomných v oblasti tohto génu spočívajúcu v H3K4 demethylácii alebo H3 či H4 deacetylácii (Domagalska *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007).

Zároveň je súčasťou autonómnej dráhy aj post-translačná modifikácia FLC skrz kazeín kinázu CK2 a proteín fosfatázu PP2A-B'γ. Kazeín kináza je vysoko konzervovaná Ser/Thr kináza prítomná vo všetkých eukaryotách. Predikčné algoritmy naznačujú, že práve proteín FLC má niekoľko fosforylačných miest vhodných pre túto kinázu a preto prichádza do úvahy možnosť regulácie aj skrz CK2. Na druhej strane PP2A je fosfatáza skladajúca z troch podjednotiek (scaffold – A, regulačnej – B a katalytickej – C). Vzhľadom na knockdown línie *PP2A-b'γ*, ktoré vykazovali neskorý fenotyp kvitnutia sa predpokladá, že táto fosfatáza reprimuje hlavný inhibítor kvitnutia FLC. Avšak knockout línie v *PP2A-b55a* a *PP2Ab55b* podjednotkách vykazovali opačný fenotyp skorého kvitnutia, čo naznačuje zapojenie fosfatázy na oboch frontoch v závislosti od typu zapojenej podjednotky B (Heidari *et al.*, 2013; Mulekar *et al.*, 2012).

2.5 Exogénne faktory

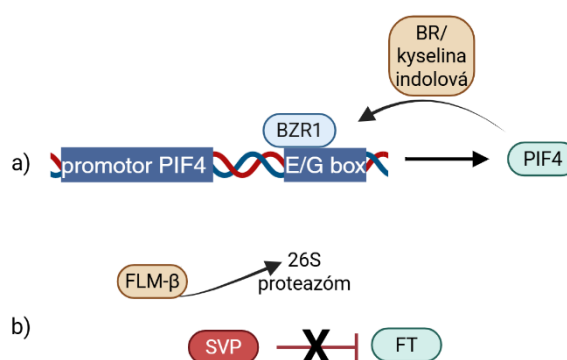
2.5.1 Teplota

Jedným z kľúčových komponentov vysokou teplotou indukovaného kvitnutia je transkripčný faktor PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4 (PIF4). Tento TF obsahuje vo svojej štruktúre tzv. „basic helix-loop-helix“ DNA väzobnú doménu a vďaka nej sa viaže do promótorovej oblasti génu *FT*, čím zvyšuje jeho mieru expresie a podnecuje prechod ku kvitnutiu. Podnecovanie prechodu ku kvitnutiu v závislosti od teploty využíva hlavne dva princípy. Prvým je aktivácia aktivátorov ako je napríklad PIF4 a druhý spôsob predstavuje represia represorov ako je *FLM* a *SVP*, ktoré strácajú schopnosť väzby a represie pri vyšších teplotách (Jin a Ahn, 2021; Kumar *et al.*, 2012).

Expresia génu *PIF4* závislá od vyšších teplôt je riadená na transkripčnej úrovni skrz braziosteroidy. Tie pomáhajú zvyšovať expresiu *PIF4* skrz *BRASSINAZOLE RESISTANT 1* (*BZR1*) transkripčný faktor, ktorý rozpoznáva E a G-box elementy prítomné v promótore génu *PIF4* a viaže sa na ne priamo. Zároveň je však *PIF4* schopný

aktivácie BZR1 skrz kyselinu indolovú a brazinosteroidy, čím sa vytvára modul spätoväzobnej smyčky, ktorá je schopná amplifikácie signálu zvýšenej teploty (Obr. 9). Ďalšie štúdie potvrdzujú, že expresia *PIF4* spôsobená vyššími teplotami je závislá aj od TF TEOSINTE BRANCHED 1/ CYCLOIDEA/PCF 5 (TCP5) (Han *et al.*, 2019; Ibañez *et al.*, 2018).

Na druhej strane model SVP-FLM prináša represiu kvitnutia pri nižších teplotách. SVP obecné funguje ako represor kvitnutia. Pri vyšších teplotách však pravdepodobne skrz proteazóm dochádza k jeho degradácii. SVP zároveň spolupracuje s FLM, ktorého post-transkripčná regulácia závisí od teploty. Jeho transkript podlieha alternatívnemu zostrihu pričom sa generujú dve hlavné formy. FLM- β a FLM- δ . Pri vyšších teplotách je inak funkčný transkript FLM- β degradovaný, nie je umožnená jeho väzba so SVP a nemôžu sa tak podieľať na represii génov podnecujúcich kvitnutie. Vyššie teploty majú za následok degradáciu represorov a tak indukujú kvitnutie (Jin *et al.*, 2022).



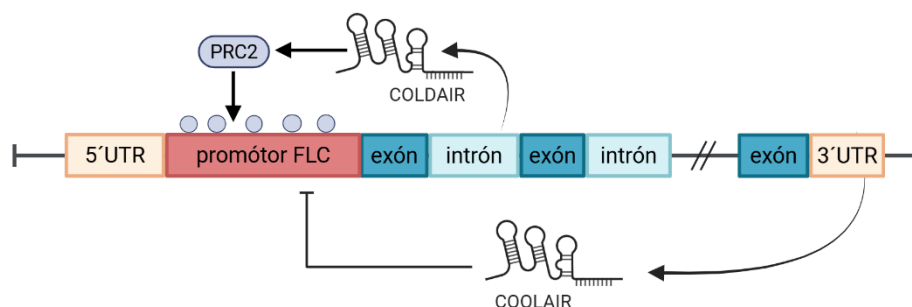
Obr. 9: Schéma regulácie a podpory kvitnutia v prípade vyšších teplôt skrz brazinostreoidy a tvorba spätoväzobnej smyčky (a) a skrz inhibíciu represorov zabezpečenú pomocou 26S proteazómu (b). Upravené podľa (Lee *et al.*, 2023). Vytvorené v biorender.com

2.5.2 Vernalizácia

Prechod ku kvitnutiu je možné zabezpečiť aj pomocou nižších teplôt. Proces sa nazýva vernalizácia a označujeme tak obdobie kedy je rastlina exponovaná dlhšiemu obdobiu chladu. Toto obdobie funguje ako signál pre zahájenie kvitnutia na nadchádzajúcu jar.

Okrem klasického modelu FLC-VIN3-PRC2 popísané vyššie v podkapitole 2.3.1 má proces vernalizácie aj iné aspekty. V procese vernalizácie zohrávajú úlohu aj dve dlhé nekódujúce RNA (*lncRNA*) *COLD INDUCED LONG ANTISENSE INTRAGENIC RNA* (*COOLAIR*) a *COLD ASSISTED INTRONIC NONCODING RNA* (*COLDAIR*). Tie pochádzajú z 3'konca RNA transkriptu a prvého intrónu *FLC* v danom poradí. *COOLAIR* a *COLDAIR* reprimujú *FLC* transkripciu aj na úrovni epigenetickej a to skrz zvyšovanie H3K17me3 hladiny interakciou s PRC2 komplexom. Navyše sú takisto zodpovedné za skladanie DNA a tvorbu smyčkovitej štruktúry za účelom represie *FLC* (obr. 10)(Heo a Sung, 2011; Kim *et al.*, 2017).

Na transkripčnej úrovni sú regulované skrz TF WRKY63. Tento typ transkripčného faktoru sa viaže na DNA pomocou motívov podobným zinkovým prstom a skrz WRKY domény. Okrem toho, že funguje ako transkripčný aktivátor *FLC* génu tak svoju rolu zohráva aj v procese kvitnutia indukovaného vernalizáciou. Jeho schopnosť väzby na promótorové sekvencie *COOLAIR* a *COLDAIR* sa zvýšila po období vernalizácie (Hung *et al.*, 2022).



Obr. 10: schéma génu *FLC* a tvorba *lncRNA*, ktoré v procese vernalizácie znižujú expresiu samotného *FLC* génu skrz epigenetickú modifikáciu (*COLDAIR*) a antisense väzbu (*COOLAIR*). Upravené podľa (Datta a Paul, 2019). Vytvorené v biorender.com

2.5.3 Fotoperiódá

Fotoperiódá označuje dĺžku svetelnej a tmavej fázy počas 24-hodinového cyklu. Hlavným regulátorom kvitnutia, ktorý odpovedá na tento podnet okolia je gén *CO* popísaný vyššie v podkapitole 2.3.5. Okrem toho je fotoperiódá úzko prepojená s cirkadiánnym rytmom. Avšak ďalší rozmer kontroly skrz tento podnet prináša kvalita osvetlenia v podobe modrého a červeného svetla.

Receptory červeného svetla označujeme ako fytochrómy (PhyB, PhyA), kdežto receptory pre modré svetlo sú označované ako kryptochrómy (Cry1, Cry2). Sú špecificky aktivované v závislosti od vlnovej dĺžky svetla, ktorú zachytávajú.

PhyB zachytávajú hlavne červené svetlo a sú aktívne počas svetelnej časti dňa. Sú zodpovedné za degradáciu *CO* skrz ubikvitínový proteazómový systém počas ranných hodín a tým predchádzajú predčasnej aktivácii *FT*. PhyA sú naopak fytochrómy zachytávajúce vzdialené červené svetlo a sú aktívne aj pri podmienkach nízkeho osvetlenia. Stabilizujú *CO* a podnecujú tak expresiu *FT* počas dlhých dní vo večerných hodinách.

Na druhej strane kryptochrómy pohlcujú svetlo modré a blízke UV-A. Cry2 stabilizuje *CO* v poobedných hodinách dlhých dní čím podporujú aktivitu *CO*, ktorého mRNA levely stúpajú práve v tomto úseku dňa. Následne Cry2 interaguje s FKF1 a GI vytvárajúc tak komplex odstraňujúci CDF represory z *CO* promótora. Cry1 hrá menej významnú rolu v tomto procese ale taktiež je zapojený do regulácie skrz modré svetlo (Luo *et al.*, 2022).

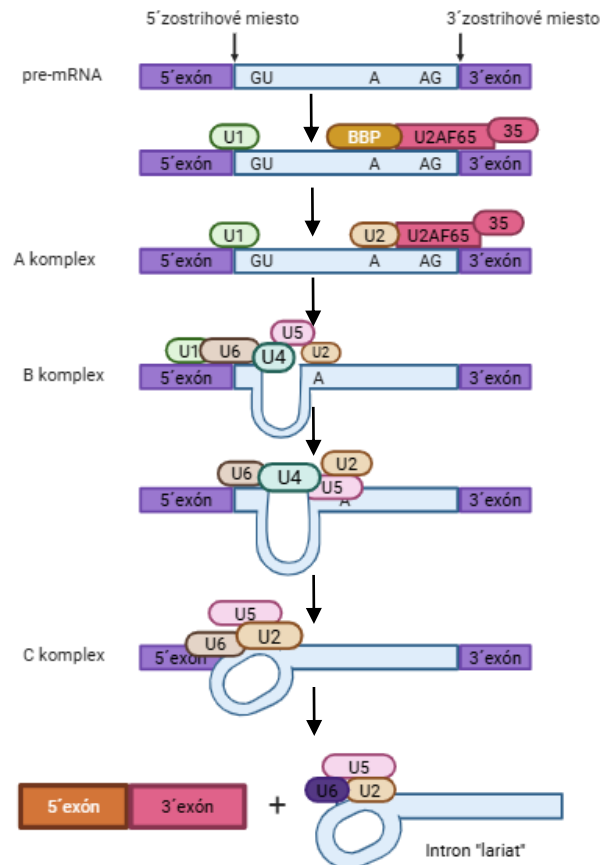
2.6 Zostrih pre-mRNA

Zostrih pre-mRNA je esenciálny proces post-transkripčnej regulácie eukaryot. Eukaryotické gény pozostávajú z kódujúcej sekvencie (exóny) a sekvencie nekódujúcej (intróny). Pojem zostrih označuje proces odstránenia intrónov z molekuly pre-mRNA. Tento proces môžeme kategorizovať na dva špecifické typy – cis-zostrih a trans-zostrih. V prípade cis-zostrihu sa jedná o spájanie exónov pochádzajúcich z toho istého transkriptu pre-mRNA. Na druhej strane trans-zostrih spočíva v spájaní exónov pôvodom z rôznych transkriptov. Taktiež existujú intróny schopné samo-zostrihu ktoré nepotrebujú intervenciu zostrihového aparátu (Eul a Patzel, 2013; Fica *et al.*, 2013).

V prípade eukaryot sa však väčšinou jedná o zostrih závislý na zostrihovom aparáte, takzvanom spliceozóme. Jedná sa o metaloenzým katalyzujúci zostrih jadernej pre-mRNA. Doteraz boli objavené dva typy spliceozómu. Prvý a zároveň častejšie sa vyskytujúci spliceozóm založený na malej jadernej RNA U2 a druhý menej častý U12-závislý spliceozóm. U2 spliceozóm je zložený z malých jaderných RNA (snRNA) označovaných ako U1, U2, U5, U4/U6 a proteínov tvoriacich tak spolu malé jaderné ribonukleoproteíny (snRNP). Spliceozóm U12 sa na druhej strane skladá z U11, U12, U5, U4atac/U6atac snRNA (Patel a Steitz, 2003; Will a Lührmann, 2011).

Úlohou každej snRNP je rozonanie pre-mRNA molekuly a jej zostrihových miest ako je napríklad 5'koniec, 3'koniec a sekvenciu označovanú ako „branch point“ (BPS) či polypyrimidínový trakt (PPT). Mechanizmus zostrihu je možné rozdeliť na dve časti. V tej prvej dochádza k nukleofilnému ataku 2'OH skupiny konzervovaného adenínu v BPS na fosfor guanínu lokalizovaného na 5'konci intrónu. Výsledkom je uvoľnenie 5' exónu a tvorba štruktúry v angličtine označovanej ako „lariat“ podobajúcej sa lasu. Následne 3'OH skupina na konci uvoľneného 5' exónu zaháji ďalší nukleofilný atak na fosfor guanínu nachádzajúci sa 5'konci 3' exónu. Tento krok má za následok spojenie dvoch exónov a uvoľnenie lasovitej štruktúry (Hang *et al.*, 2015).

Samotnému zostrihu však predchádza zostavenie spliceozómu (obr. 11). Najprv dochádza k väzbe U1 na 5'koniec, zostrihový faktor 1 (SF1) sa viaže na BPS a U2 pomocný faktor (U2AF) sa viaže na PPT. Následne sa U2 viaže na BPS a tento komplex je tak označovaný ako „A“. Pre vytvorenie komplexu „B“ je potrebná väzba U4/U6 a U5 pričom následná destabilizácia U1 a U4 zapríčiní ich odpojenie a tvorbu finálneho spliceozómu. Ten je katalyticky aktivovaný helikázou a môže vykonávať svoju funkciu. V tomto bode hovoríme o komplexe „C“. V procese konštitutívneho zostrihu je dôležité správne rozoznanie jednotlivých miest. Ak k nemu nedôjde môžu nastávať rôzne aberácie. Rozoznanie iných zostrihových miest môže viesť aj k alternatívnemu zostrihu (Will a Lührmann, 2011).



Obr. 11: Schematické znázornenie U2 spliceozómu a jednotlivých krokov konštitutívneho zostrihu. Upravené podľa (Lai *et al.*, 2021). Vytvorené v biorender.com

2.7 Alternatívny zostrih a jeho vzťah k regulácii kvitnutia

Tento typ zostrihu nastáva ak spliceozóm rozpozná iné zostrihové miesta, vplyvom čoho môžu vznikať rôzne formy transkriptu jedného génu. Literatúra uvádza, že 40-70% rastlinných génov podlieha alternatívnemu zostrihu. Touto formou sa zvyšuje plasticita a komplexita transkriptómu prípadne proteómu. Navyše alternatívny zostrih môže produkovať skrátené zostrihové varianty, ktoré môžu vykazovať inú funkciu alebo subcelulárnu lokalizáciu. Proces alternatívneho zostrihu je zapojený v odpovedi na kyselinu abscisovú, teplotu ale aj biotický a abiotický stres, ktoré sú zároveň významnými faktormi pri regulácii kvitnutia (Chamala *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2020).

Medzi hlavné typy, ktoré v prípade alternatívneho zostrihu môžu nastať radíme rozpoznanie alternatívneho 5' miesta, alternatívneho 3' miesta, retencia intrónu, takzvaný kazetový exón, u ktorého môže ale nemusí dochádzať k jeho preskočeniu a „mutually exclusive exons“, kedy dochádza k ponechaniu jedného alebo druhého exónu z dvojice. V prípade rastlín je najčastejšou formou alternatívneho zostrihu ponechanie intrónu, čo

sa deje ak 5' a 3' miesto nie sú správne rozoznané (obr. 12) (Liu *et al.*, 2024b; Marasco a Kornblihtt, 2023).

Rôzne transkripty môžu mať odlišné vlastnosti a úlohy a tak prispievajú k rozmanitosti génových produktov a ich rolí. Rôzne hladiny jednotlivých transkriptov majú vplyv na dobu kvitnutia a jeho reguláciu. K najdôležitejším regulátorom kvitnutia, ktorých primárne transkripty podstupujú alternatívny zostrih patria gény *FLM*, *FCA*, *CO* (Park *et al.*, 2019).

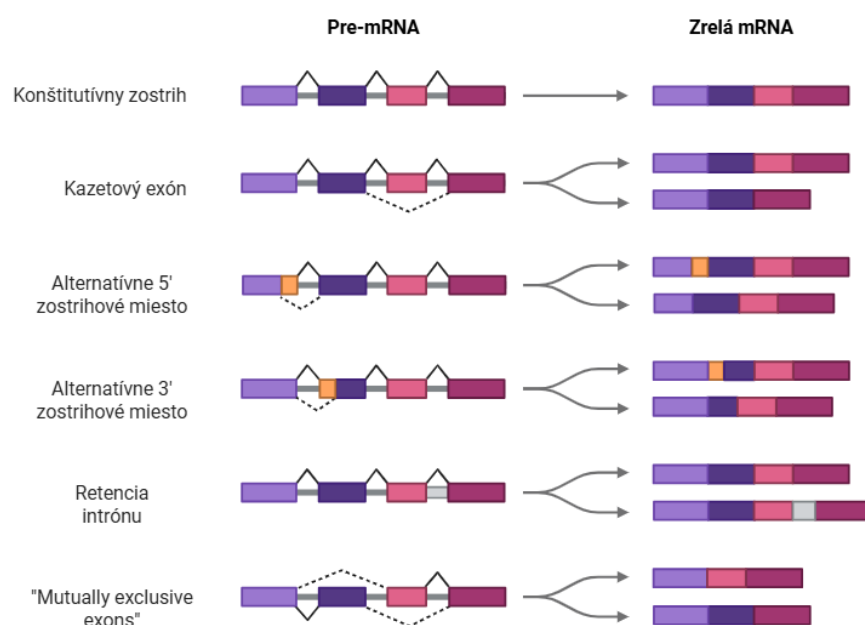
Jedným z príkladov je už spomínaný *CONSTANS* (*CO*). Vplyvom alternatívneho zostrihu tohto aktivátora kvitnutia dochádza k tvorbe dvoch izoforiem. Konštitutívnym zostrihom sa tvorí fyziologicky aktívna izoforma $CO\alpha$ a alternatívnym zostrihom vzniká kratšia izoforma $CO\beta$. Táto izoforma je skrátaná na C-konci a v jej proteínovej štruktúre chýba CCT doména (*CONSTANS*, *CONSTANS-LIKE*, *TOC1 domain*). Z $CO\beta$ sa stáva kompetitívny inhibítor $CO\alpha$ a spolu vytvárajú nefunkčné heterodiméry so zníženou schopnosťou DNA väzby. Navyše $CO\beta$ zvyšuje interakciu $CO\alpha$ s E3 ubiquitín ligázou, čo vedie k následnej destabilizácii. $CO\beta$ taktiež prispieva k destabilizácii skrz inhibíciu interakcie FKF1 s $CO\alpha$, ktorá by inak danú izoformu stabilizovala (Gil *et al.*, 2017).

Ďalším príkladom je gén *FLOWERING LOCUS M* (*FLM*), ktorého alternatívny zostrih závisí od teploty. Tento represor kvitnutia podlieha alternatívnemu zostrihu, avšak jeho alternatívne zostrihnuté transkripty *FLM β* sú v podmienkach vyšších teplôt degradované skrz proces „nonsense-mediated mRNA decay“. Pri nižších teplotách však zostávajú prítomné a zohrávajú tak úlohu v regulácii kvitnutia v závislosti od okolitej teploty. Alternatívny zostrih produkuje dve izoformy. Funkčnú označovanú ako *FLM β* a alternatívne zostrihnutú *FLM δ* s redukovanou schopnosťou väzby na DNA. Forma *FLM δ* je podľa niektorých štúdií indukovaná pri vyšších teplotách. Opäť sa naskytá príležitosť kompetitívnej inhibície izoforiem nakoľko po interakcii *FLM δ* so SVP nedochádza k úspešnej väzbe na promótorové sekvencie a nie je tak možná inhibícia génov zapojených v kvitnutí ako *SOC1* a *FT*. Regulácia kvitnutia v tomto prípade tak závisí aj na pomere foriem *FLM β* a *FLM δ* (Jin *et al.*, 2022; Posé *et al.*, 2013; Sureshkumar *et al.*, 2016).

Ďalším génom, ktorý podlieha alternatívnemu zostrihu a zároveň sa nachádza v centre regulácie kvitnutia je *FLC*. Zostrih tohto génu je regulovaný niekoľkými zostrihovými faktormi. Nedávne štúdie však naznačujú, že zrovna pomocný faktor U2AF, respektíve

jeho podjednotka o veľkosti 65 kDa je zodpovedná za zostrih *FLC* v odpovedi na kyselinu abscisovú. Zmeny v zastúpení zostrihových variantov génu *FLC* vplyvom zmeny aktivity U2AF65 mali za následok zmenu v dobe kvitnutia (Xiong *et al.*, 2019).

Gén *FCA*, taktiež zapojený v kvitnutí, rovnako podlieha alternatívnemu zostrihu. V tomto prípade je hlavným mediátorom pomocný faktor U2AF35. druhá podjednotka U2AF pomocného faktoru o veľkosti 35 kDa. Gén *FCA* tvorí 4 rôzne transkripty (α , β , γ , δ). Len jeden z nich, a to konkrétne γ , je funkčný kódujúci proteín v plnej dĺžke. Ostatné tri plnia funkciu negatívnych regulátorov *FCA* (Quesada *et al.*, 2003; Wang a Brendel, 2006).



Obr. 12: Porovnanie rôznych mechanizmov zostrihu pre-mRNA a ich výsledok. Vytvorené v biorender.com

3 Experimentálna časť

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Bioline

2x ImmoMix

Bio-Rad (USA)

4x Laemmli Sample Buffer, akrylamid/bis-akrylamid, Clarity™ Western ECL Substrate, iProof™ HF Buffer, iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase, Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards, Protein Assay Dye Reagent Concentrate

Duchefa Biochemie (Holandsko)

gentamycin, kanamycin, Murashige Skoog's salt mixture, 2-[4-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-yl]etansulfonová kyselina (HEPES), rifampicin, spektinomycin

GE Healthcare (Nemecko)

Amersham™ Hybond™ P 0.45 PVDF BlottigMembrane

Invitrogen by ThermoFisher Scientific (Lotyšsko, USA)

antiMouse protilátka (A24512), 10 mmol·l⁻¹ dNTPs, 10x Fast Digest Green Buffer, 6x DNA Loading Dye, DNáza I, 10x pufo pre DNázu I s MgCl₂, DreamTaq DNA polymerase, DreamTaq 10x buffer, Fast Digest Restriction Enzyme PstI, Fast Digest Restriction Enzyme PvuII, EDTA (50mM), Gateway® BP Clonase® II, GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, LR Clonase™ II Plus enzyme, Phire Plant Direct PCR Kit, Proteinase K, Restriction Enzyme NheI, Restriction Enzyme SmaI, CellROX Deep Red Reagent, SYBR Green I

Nippon Genetics

Midori Green

Promega

M-MLV reverzná transkriptáza, 5x tlmivý roztok pre reverznú transkriptázu, RNazine

Roche (USA)

Complete™ EDTA free (USA)

Sigma (USA)

Acetosyringón, agaróza, antiGFP protilátka, dithiotreitol (DTT), 1-Bromo-3-chloropropán (BCP), bromfenolová modrá (BFB), dodecylsírán sodný (SDS), dimetylsulfoxid (DMSO), etyléniamíntetraoctová kyselina (EDTA,) etanol 96%, etanol 70%, fenol/chloroform/isoamylalkohol (25:24:1), gellan gum, GenElute™ Plasmid Miniprep Kit, glycerol, hydroxid draselný (KOH), chlorid horečnatý (MgCl₂), chlorid sodný (NaCl), Lauria Bertani Broth, Lauria Bertani Broth with agar, 2-(N-morpholino)etansulfónová kyselina (MES), metanol, N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin (TEMED), N-laurylsarkosin, toluidínová modrá, Tris, TRI-reagent, Tween 20, 2-merkaptóetanol (C₂H₆SO), persírán amonný (APS), sacharóza (C₁₂H₂₂O₁₁), kyselina octová (CH₃COOH), Tris-base

Ostatné

NucleoSpin Gel and PCR Clean up kit (Machery-Nagel), miniprep P1P2P3 kit (Qiagen),

3.1.2 Prístroje a zariadenia

Analytické váhy (XA 110/2X, Radwag, Poľsko)

Aparatúra pre elektroforézu Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA)

Aparatúra pre elektroforézu nukleových kyselín Sub-Cell® GT Cell (Bio-Rad, USA)

Aparatúra pre transfer proteínov Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad, USA)

Automatické pipety (Eppendorf, Nemecko)

Dokumentačné zariadenie ChemiDoc™ EZ Imager (Bio-Rad, USA)

Dokumentačné zariadenie ChemiDoc™ MP Imaging system (Bio-Rad, USA)

Centrifúga Allegra® 64R High-Speed Centrifuge (Beckman Coulter®, USA)

Centrifúga ScanSpeed 1730R Refrigerated microcentrifuge (Beckman Coulter®, USA)

Centrifúga Spectrafuge 24D Digital Lab Microcentrifuge (Labnet, USA)

Čítacie zariadenie Tecan Infinite F200 Fluorescence Microplate Reader (Tecan, USA)

Inkubátor ES-20 (Biosan, Lotyšsko)

Epifluorescenčný mikroskop Axio Imager.M2 (Zeiss, Nemecko)

Kultivačná miestnosť (fytotron) (Weiss Gallenkamp, Veľká Británia)

Kývačka Mr-12 Rocker-Shaker (Biosan, Lotyšsko) 25

Laboratórny digestor M 1200 (Merci, Česká republika)

Laminárny box (flowbox) (Merci, Brno)

Magnetické miešadlo MSH-420 (Boeco, Nemecko)

pH metr PC 2700 (Eutech Instruments, USA)

Predvážky S1502 (BEL Engineering, Taliansko)

Spektrofotometer SmartSpec 3000 UV/VIS (Bio-Rad, USA)

Teplotný sterilizátor (Schuett-biotec.de solaris, Nemecko)

Termoblok ThermoCell Cooling & Heating Block (Bioer, Čína)

Termocycler T100TM Thermal cycler (Bio-Rad, USA)

Trepačka (Labnet, USA)

Vortex-Genie 1 (Scientific Industries, USA)

Zdroj napätia PowerPacTM HC High-Current Power Supply (Bio-Rad, USA)

Zdroj napätia PowerPacTM Basic (Bio-Rad, USA)

3.1.3 Roztoky a média

- 1% agarózový gél (100 ml): 100 ml 1xTAE; 1 g agarózy; 1 µl MIDORI Green.
- 50x TAE tlmivý roztok (500 ml): 121 g Tris; 28,55 ml kyseliny octovej; 50 ml EDTA (0,5 mol/l); pH=8,0; objem doplniť do 500 ml dH₂O
- 1x TAE tlmivý roztok (1000 ml): 980 ml dH₂O; 20 ml 50xTAE

- Tekuté LB médium (1000 ml): 25 g LB Broth; objem doplniť do 1000 ml MiliQ vodou; pH=7,2 (1 mol/l KOH); sterilizácia pomocou autoklávu
- Tuhé LB médium (1000ml): 40 g LB Broth with agar; objem doplniť do 1000 ml MiliQ vodou; sterilizácia autoklávom
- Inokulačné médium (50 ml): 0,5 ml MES-KOH (1 mol/l); 5 ml MgCl₂ (100 mmol/l); 50 µl acetosyringónu (150 mmol/l); objem doplniť do 50 ml dH₂O
- Extrakčný tlmivý roztok pre izoláciu gDNA (100 ml): 1 g N-lurylsarkosin; 10 ml 1M Tris-HCl pH=8; 2 ml 0,5M EDTA pH=8; 0,584 g NaCl
- acetát sodný (5 ml): 1,25 g; pH=5,2
- Extrakčný tlmivý roztok E (100 ml): 1,19 g HEPES (pH 7,5); 0,038 g EGTA; 0,43 g NaCl; 0,004 g NaF; 100 µl MgCl₂ (1 mol/l); 10 ml glycerol (100%). Objem doplniť do 100 ml dH₂O
- Fosfátový tlmivý roztok (200 ml): 1,1998 g NaH₂PO₄; 35,2 mg vitamín C; 20 ml glycerol (100%). Úprava pH=7,8 pomocou NaOH a doplniť do objemu 200 ml MiliQ vodou.
- 10x Elektroforetický tlmivý roztok (zásobný roztok) (1000 ml): 14,4 g glycín; 3 g Tris-base; 10 ml SDS (10%); pH=8,3. Objem doplniť do 1000 ml dH₂O
- 1x Elektroforetický tlmivý roztok (1000 ml): 900 ml dH₂O; 100 ml 10x koncentrovaného zásobného roztoku elektroforetického tlmivého roztoku
- 10x transferový tlmivý roztok (zásobný roztok) (1000 ml): 14,4 g glycín; 3 g Tris-base; 200 ml metanolu; pH=8,3. Objem doplniť do 1000 ml MiliQ vodou
- 1x transferový tlmivý roztok (1000 ml): 850 ml dH₂O; 100 ml 10x koncentrovaného zásobného roztoku transferového tlmivého roztoku; 50 ml metanolu (100%) (fin. konc.=5%)
- TBS (zásobný roztok) (1000 ml): 8,78 g NaCl; 2,42 g Tris-base; pH=7,4. Objem doplniť do 1000 ml MiliQ
- TBS-T (1000 ml): 100 ml zásobného roztoku TBS; 1 ml Tween-20. Objem doplniť do 1000 ml MiliQ vodou

- TE pufoer (100 ml): 1 ml 1M Tris-HCl; 0,2 ml 0,5M EDTA, 1 µl RNáza
- 10% polyakrylamidový zaostrovací gél (1,3 ml): 0,795 ml MiliQ vody; 0,315 ml 0,5 mol/l Tris pH=6,8; 0,125 ml akrylamidu (40%); 12,5 µl SDS (10%); 6,25 µl APS (10%); 1,25 µl TEMED; 10 µl brómfenolová modrá (BFB) (1%). Pri príprave gélu pre NATIVE PAGE vynechať BFB a objem SDS zameniť za MiliQ vodu.
- 10% polyakrylamidový rozdeľovací gél (5 ml): 2,425 ml MiliQ vody; 1,25 ml 1,5 mol/l Tris pH=8,8; 1,25 ml akrylamidu (40%); 50 µl SDS (10%); 25 µl APS (10%); 2,5 µl TEMED. Pri príprave gélu pre NATIVE PAGE objem SDS zameniť za MiliQ vodu.
- 1,5 M Tris pH=8,8 (100 ml): 18,16 g Tris-base. Objem doplniť do 100 ml MiliQ vodou. Úprava pH pomocou 1 mol/l HCl
- 0,5 M Tris pH=6,8 (100 ml): 6,05 g Tris-base. Objem doplniť do 100 ml MiliQ vodou. Úprava pH pomocou 1 mol/l HCl
- Médium ½ MS (1000 ml): 10 g sacharózy; 2,15 g MS Basal salt mixture; 1 g MES. Objem doplniť na 1000 ml MiliQ vodou a pridať 6 g Gellan Gum; pH=5,8 (1 mol/l KOH).

3.1.4 Servery a databázy

BioRender (URL1)

ClustalW (URL2)

eFP browser (URL3)

NCBI (The National Center for Biotechnology Information, URL4)

SWISS-MODEL (URL5)

TAIR (The *Arabidopsis* Information Resource URL6)

ThermoFisher Scientific Tm calculator (URL7)

Alfalfa toolbox (URL8)

3.1.5 Software

ApE (Davis & Jorgensen, 2022)

Biopython (Cock *et al.*, 2009)

ChimeraX (Pettersen *et al.*, 2004)

DA2 (ThermoFisher Scientific)

DataAssist (ThermoFisher Scientific)

IBS (W. Liu *et al.*, 2015)

ImageJ (Schneider *et al.*, 2012)

Image LabTM Software (Bio-Rad Laboratories Inc.)

MEGA (Tamura *et al.*, 2021)

Microsoft Office (Excel, Powerpoint, Word) (Microsoft)

RefFinder (Xie *et al.*, 2023)

ZEN 2011 (black edition) (Zeiss, Nemecko)

3.1.6 Biologický materiál

V rámci rastlinného materiálu boli využité rastliny *Arabidopsis thaliana* divokého typu Col-0, mutantné línie *mpk13* (SALK_130193, SALK_204107C, SALK_048680) a mutantné línie pre gény *U2AF65b* (SALK_104128, SALK_055049C) a *U2AF65a* (SALK_144790, SALK_075828). Taktiež boli využité potenciálne transgénne línie *Medicago sativa* pochádzajúce zo somatickej embryogenézy a transformované konštruktom destinačného vektora pGGH-UBQ10::*Cas9:mCherry:tG7-A-G* s obsahom 4 rôznych gRNA cieliacich na gén *MMK3* (Zelinková, 2024). Pre účely tranzientnej transformácie boli využité rastliny *Nicotiana benthamiana*.

V prípade bakteriálneho materiálu boli použité baktérie *Escherichia coli* a *Agrobacterium tumefaciens*. Za účelom prípravy konštruktov fluorescenčne značeného proteínu boli využité dva kmene *Escherichia coli* a to konkrétne DH5α s cieľom transformácie chemokompetentných buniek a kmeň TOP10 za účelom prípravy

a transformácie elektrokompetentných buniek. Za účelom tranzientnej transformácie bol využitý kmeň GV3101 *A. tumefaciens* nesúci požadovaný konštrukt.

V procese klonovania boli postupne využité nasledujúce donorové vektory: pDONR P4-P1R, pDONR 221, pDONR 207, pDONR P2R-P3. Zároveň boli využité dva vektory destinačné: pUBQ:YFP-GW a pB7m34GW,0. Spolu boli vytvorené 4 vstupné a 1 expresný vektor: pDONR P4-P1R + pMPK13, pDONR221+gMPK13, pDONR207+gMPK13, pDONR P2R-P3 + gMPK13 + STOP. V prípade expresného vektora sa jedná o *AtUBQ10::YFP:gMPK13* (vo vektore pUBQ:YFP-GW). Jednotlivé vytvorené prípadne použité vektory dostupné v laboratóriu a ich selekčné antibiotiká použité pri transformácii a selekcii sú zhrnuté v tabuľke č. 1.

Tab. 1: Vytvorené a použité vstupné a expresné klony v *E. coli* a ich jednotlivé selekcie. KAN-kanamycin, GENT-gentamycin, RIF-rifampicin. V prípade expresného vektora pUBQ:YFP-GW je v rastlinách prítomná rezistencia na PPT-fosfinotricin a koncentrácia pre selekciu je stanovená na 8 µg/ml.

Pripravené/použité plazmidy	ATB rezistencia (<i>E. coli</i> / <i>A. tumefaciens</i>)	Koncentrácia ATB (µg/ml)
pDONR P4-P1R + pMPK13	KAN/-	100
pDONR221 + gMPK13	KAN/-	100
pDONR207 + gMPK13	GENT/-	50
pDONR P2R-P3 + gMPK13 + STOP	KAN/-	100
pEN-L1-F-L2 + GFP	KAN/-	100
pEN-R2-F-L3+ GFP	KAN/-	100
<i>AtUBQ10::YFP::gMPK13</i> (vo vektore pUBQ:YFP-GW)	KAN/RIF	100/100

3.2 Metódy

3.2.1 *In silico* analýzy

3.2.1.1 Porovnanie nukleotidových a aminokyselinových sekvencií

Jednotlivé nukleotidové sekvencie boli medzi sebou porovnané formou výpočtu GC zastúpenia pomocou funkcie `gc_fraction` softwaru Biopython. Následne boli sekvencie kódujúcej DNA (CDS) preložené do aminokyselinovej sekvencie metódou `translate`. Aminokyselinové sekvencie boli zarovnané pomocou funkcie `alignment` dostupnej v softwari MEGA11 a po ich zarovnaní boli identifikované jednotlivé aminokyselinové substitúcie.

Sekvencie boli vložené do SwissModel (URL 5) dostupnom na bioinformatickom portáli Expasy a boli vytvorené 3D modely jednotlivých proteínov. Templát zvolený pre vizualizáciu pochádzal z organizmu *Gossypium hirsutum* konkrétne sa jednalo o gén *MPK12*. Jeho model je dostupný v databáze Alphaphold pod označením A0A0A7R545.1.A. Takto vytvorené proteínové modely boli následne procesované v softwari ChimeraX.

3.2.2 Sekvenovanie rastlín *Medicago sativa*

Rastliny *M. sativa* použité a sekvenované v tejto práci boli transformované a regenerované v diplomovej práci „Cielená mutagenéza génov *MMK2* a *MMK3* pomocou CRISPR/Cas9 a transformácia lucerny sietej (*Medicago sativa* L.)“. Jedná sa o rastliny, ktorých mutagenéza bola zameraná na gén *MMK3*. Mutagenéza bola založená na technológii multiplex CRISPR/Cas9, ktorá spočívala vo využití konštruktov obsahujúcich viacero navádzajúcich RNA zacielených súčasne na viacero oblastí v genóme. Táto technológia simultánnej expresie viacerých gRNA bola využitá za účelom zvýšiť pravdepodobnosť mutagenézy tetraploidnej Lucerny sietej (Zelinková, 2024).

Použité rastliny boli transformované konštruktom pod kontrolou promótoru génu *ubikvitín 10* z *A. thaliana*. Konštrukt niesol 4 rôzne gRNA a tak cieľil na 4 rôzne miesta v géne *MMK3*. Regenerované rastliny boli označené ako UB2, UB3, UB4, UB6, UB8, UB11, UB12, UB13, UB14 a UB15.

3.2.2.1 Izolácia genomickej DNA

Prvým krokom potrebným pre analýzu DNA sekvencie s cieľom vyhodnotiť úspešnosť mutagenézy je samotná izolácia genomickej DNA. DNA bola izolovaná z listov jednotlivých rastlín. Tie boli homogenizované v tekutom dusíku pomocou trecej misky a homogenizát bol uskladnený v eppendorf skúmavkách na -80°C.

Po vybratí vzoriek na ľad bolo k vzorkám pridaných 800 µl extrakčného pufru a obsah bol zvortexovaný. V prostredí digestoru bolo následne k vzorkám pridaných 800 µl zmesi fenolu, chloroformu a isoamylalkoholu (25:24:1) a obsah bol opäť zvortexovaný. Následne prebehla centrifugácia počas 3 minút pri 4 °C a 5000 g. Supernatant bol automatickou pipetou odobratý a prenesený do novej eppendorf skúmavky. Následne bolo k objemu supernatantu pridaných 80 µl 3M acetátu sodného (pridaný objem odpovedá 1/10 použitého extrakčného pufru). A vzorky boli jemným kývaním premiešané. K vzorkám bol v ďalšom kroku pridaný vychladený 100% etanol v objeme 800 µl. nasledovala centrifugácia pri 13 000 g, 4 °C a počas 10 minút. Supernatant bol odstránený a k peletu bolo pridaných 800 µl 70% etanolu. Vzorky boli opäť centrifugované počas 5 minút pri 4 °C a 13 000 g. Supernatant bol opäť odstránený, zvyškový etanol bol odpipetovaný a otvorené eppendorf skúmavky boli 30 minút ponechané v digestore za účelom vysušenia peletu a odparenia prebytočného etanolu. Následne bol pelet rozpustený v 100 µl TE pufru s obsahom RNAsy (1 µl /1 ml). vzorky boli hodinu inkubované pri 37 °C. Takto izolované vzorky boli následne skladované pre ďalšie analýzy pri -20 °C.

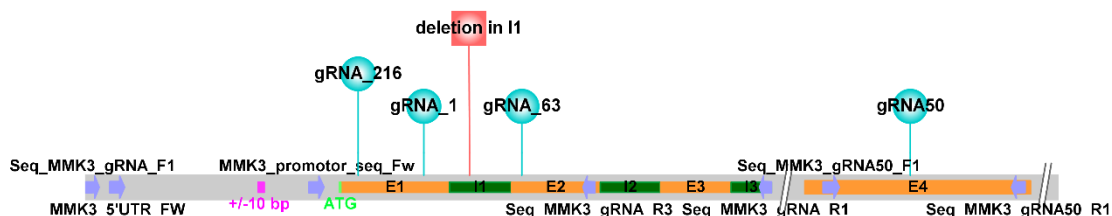
3.2.2.1 Stratégia sekvenovania

Vzhľadom na tetraploidiu Lucerny siatej nebolo možné sekvenovať genetickú informáciu rastlín konvenčným spôsobom. Z dôvodu prítomnosti dvoch sád genetického materiálu nebolo možné využiť zaužívané Sangerovo sekvenovanie PCR produktov oblasti záujmu. Výsledky vykazovali prítomnosť zmiešaného signálu vyplývajúceho z povahy odlišnosti jednotlivých alel, čo znemožňovalo určiť jednak či je rastlina mutantná prípadne v koľkých alelách a aká zmena presne nastala. Po identifikácii tohto problému bola následne zvolená stratégia sekvenovania spočívajúca v identifikácii zhodných oblastí alel pomocou *in silico* analýzy, sekvenovania všetkých alel pomocou Sangerovho sekvenovania a na základe týchto výsledkov boli vyselektované potenciálne mutantné rastliny, ktoré bolo následne treba dodatočne validovať. Validácia jednotlivých alel obnášala klonovanie PCR produktov danej oblasti záujmu, ktoré reprezentovali jednotlivé

alely do plazmidových vektorov a sekvenovanie jednotlivých vektorov, čím sa zabezpečilo prečítanie jednej alely počas jedného Sangerovho sekvenovania.

Na základe výsledkov získaných v bakalárskej práci „Úlohy vybraných MAPK proteínů u vojtěšky *Medicago sativa*“ (Pavlíková, 2022), ktoré naznačovali prítomnosť zmiešaných signálov v prípade klasického Sangerovho sekvenovania bol zvolený postup klonovania PCR produktov jednotlivých úsekov do plazmidových vektorov. V tomto bode bola identifikovaná oblasť zodpovedná za produkciu zmiešaného signálu, ktorá korešpondovala s výsledkami v spomínanej práci. Nasledovala *in silico* analýza dostupných sekvencií, ktorá umožnila amplifikáciu a sekvenovanie v zhodných oblastiach, ktoré viedli k užšiemu výberu rastlín pre ďalšiu analýzu. Vytipované PCR produkty boli následne klonované do plazmidových vektorov a ďalej sekvenované, pričom boli považované za reprezentantov jednotlivých alel.

Konstruktory využité na transformáciu niesli gRNA označené ako gRNA_216, gRNA_1, gRNA_63 a gRNA_50. Prvé dve spomínané gRNA cieľili na prvý exón génu, gRNA_63 cieľila na druhý exón a posledná bola zacielená na exón štvrtý. Vzhľadom na ich umiestnenie boli pre primárnu sekvenáciu PCR produktov v oblasti záujmu využité primery uvedené v tabuľke č. 2. Schematické znázornenie génu *MMK3*, oblasti gRNA a jednotlivých primerov je zobrazené na obrázku č. 13.



Obrázok č. 13: Schematické znázornenie *MMK3* génu a jeho elementov. Vytvorené v IBS 1.0.

Tab. 2: Zoznam primerov použitých pre amplifikáciu a sekvenovanie

Primer	Sekvencia	Oblasť génu
Seq_MMK3_gRNA_F1	AATGAGGAAGGAACTAAGTC	promótor
Seq_MMK3_gRNA_R1	TGAATGACCTAAAAGCACG	Intrón 3
MMK3_promotor_seq_Fw	CTTTACTCTTTGTATCCGAGAAA	Exón 1
Seq_MMK3_gRNA_R3	CATGATCCATGTGACAGAG	Exón 2
Seq_MMK3_gRNA50_F1	AGGATTGAAGTACATACACTCTGC	Exón 4
Seq_MMK3_gRNA50_R1	GAGCGCCAATTGCTGAACAT	Exón 4

3.2.2.2 Amplifikácia úsekov záujmu pomocou PCR

Ako prvá bola amplifikovaná oblasť od promótorovej oblasti po koniec exónu 2 za účelom sekvenovania prvej časti génu *MMK3* (Seq_MMK3_gRNA_F1+ Seq_MMK3_gRNA_R1). Po identifikácii oblasti, ktorá bola zodpovedná za zmiešané signály v chromatografach bolo prístupné k amplifikácii a následnému sekvenovaniu oblastí po častiach za použitia ďalších troch dvojíc primerov z tabuľky č. 2. Podmienky PCR reakcie sú uvedené v tabuľke č. 4 a zloženie v tabuľke 3. Vzhľadom na potrebu obdržania presnej sekvencie bola v PCR využitá „high fidelity“ polymeráza Phusion.

Tab. 3: Zloženie PCR reakčnej zmesi pre Phusion HF polymerázu (50μl/reakcia)

Zloženie PCR reakcie	Objem (μl)
PCR voda	14,5
2x pufor HF Phusion	25
Forward primer	2,5
Reverse primer	2,5
Polymeráza Phusion	0,5
Templát (25 ng/μl)	5

Tab. 4: Podmienky amplifikácie od promótorovej oblasti k začiatku tretieho intrónu.

Fáza	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet opakovaní
Iniciálna denaturácia	98	30	1x
Denaturácia	98	10	30x
Nasadanie primerov	58,3	10	
Polymerácia	72	35	
Finálna polymerácia	72	600	1x
Schladienie vzorky	4	∞	

Taktiež bolo potrebné amplifikovať úsek štvrtého exónu (Seq_MMK3_gRNA50_F1+Seq_MMK3_gRNA50_R1). Podmienky tejto PCR reakcie sú uvedené v tabuľke 6 a jej zloženie sa uvádza v tabuľke č. 5. Produkty PCR reakcii boli overené pomocou agarózovej gélovej elektroforézy a následne prečistené kitom NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (popis postupu v prílohách v metodической časti 9.1.1).

Tab. 5: Zloženie PCR reakčnej zmesi. Finálny objem reakcie bol 25 μ l.

Zloženie PCR reakcie	Objem (μl)
PCR voda	6,75
2x pufor HF Phusion	12,5
Forward primer	1,25
Reverse primer	1,25
Polymeráza Phusion	0,25
Templát (25 ng/μl)	3

Tab. 6: Program PCR reakcie za účelom amplifikácie oblasti exónu 4 génu *MMK3*

Fáza	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet opakovaní
Iniciálna denaturácia	98	30	1x
Denaturácia	98	10	30x
Nasadanie primerov	63,2	10	
Polymerácia	72	35	
Finálna polymerácia	72	600	1x
Schladienie vzorky	4	∞	

3.2.2.3 Sekvenovanie PCR produktov

PCR produkty boli sekvenované vždy Sangerovým sekvenovaním a to pomocou produktov „TubeSeq“ a „LightRun“ poskytované firmou Eurofins. V prípade sekvenovania produktom „TubeSeq“ bolo potrebné pripraviť vzorku na sekvenovanie tak aby obsahovala 15 µl PCR produktu o koncentrácii 10 ng/ µl (v prípade veľkosti PCR produktu 1000-3000 bp) a 2 µl primeru o koncentrácii 10 µM. Na druhej strane vzorka pre sekvenovanie formou „LightRun“ obsahovala 5 µl PCR produktu o koncentrácii 10 ng/µl (v prípade veľkosti PCR produktu 1000-3000 bp); 2,5 µl primeru o koncentrácii 10 µM a 2,5 µl PCR vody.

Príprava vzorky pre Sangerové sekvenovanie firmou SEQme obnášala zmiešanie objemu PCR produktu tak aby obsah zodpovedal 200 ng (v prípade ak sa jednalo o produkt dlhší ako 1000 bp) spolu s 2,5 µl primeru o koncentrácii 10 µM a objem reakcie bol doplnený PCR vodou na 10 µl. Všetky vopred pripravené reakcie boli zasielané poštou v 1,5 ml eppendorf skúmavkách.

Pre sekvenovanie oblasti exónu 1 bol použitý primer MMK3_promotor_seq_Fw, pre sekvenovanie exónu 2 bol z dôvodu polohy gRNA využitý reverse primer Seq_MMK3_gRNA_R3 a pre sekvenovanie produktov z oblasti exónu 4 bol použitý primer Seq_MMK3_gRNA50_F1.

3.2.2.4 Klonovanie PCR produktov a sekvenovanie plazmidov

Tie PCR produkty, ktoré vykazovali zmenu voči divokému typu v podobe zdvojeného signálu v chromatografe, čo značilo prítomnosť 2 rozdielnych sekvencií, boli ďalej klonované do plazmidových vektorov. Tieto vektory boli následne individuálne sekvenované a výsledky boli analyzované v softwari GeniousPrime.

Klonovanie prebiehalo klasickým spôsobom využívajúcim restriktčné endonukleázy a T4 DNA ligázu. Vzhľadom na potrebu klonovania PCR produktov vytvorených polymerázou Phusion bolo zvolené klonovanie pomocou tupých koncov a tým pádom bolo potrebné zvoliť restriktčnú endonukleázu tvoriacu tento typ koncov. Kvôli uľahčeniu selekcie pozitívnych kolónii bol využitý vektor obsahujúci *ccdB* gén. Použitá restriktčná endonukleáza štiepila vektor v mieste *ccdB* génu a inzert bol klonovaný do tohto miesta. V prípade uzavretia plazmidu bez vloženia inzertu by tento gén znemožnil prežitie prípadne transformovanej baktérie. Pre účely klonovania boli teda využité vektory

P4P1R, P221, P2RP3 a P207 bežne používané pre klonovanie MultiSiteGatewayCloning a restričná endonukleáza SmaI.

Ako prvé boli štiepené prázdne vektory endonukleázou SmaI. Štiepenie prebiehalo počas 2 hodín pri teplote 30 °C za účasti 10 U enzýmu. Celkovo bolo štiepených 20 µg vektoru a zloženie reakcie je uvedené v tabuľke č. 7. Následne prebehla inaktivácia enzýmu počas 20 minút pri teplote 65 °C. Linearizované vektory boli prečistené kitom NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (príloha kapitola 9.1.1) a následne boli použité pre ligačnú reakciu. Ligačná reakcia pozostávala z linearizovaného vektoru, PCR produktu, 10x pufru pre T4 DNA ligázu s obsahom horečnatých iónov, roztoku 50% PEG 4000 a vody, ktorá doplnila objem reakcie na 20 µl. Zloženie reakcie je uvedené v tabuľke č. 8. Pomer inzertu a vektoru bol v tomto prípade ligovania tupých koncov 3:1, pričom množstvo vektoru odpovedalo 50 ng. Zároveň bol použitý aj PEG, aby uľahčoval priblíženie vektoru, inzertu a ligázy. Reakcia prebiehala prvé 2 hodiny pri laboratórnej teplote. Následne bolo 10 µl odpipetovaných a uskladnených pri -20 °C. Zvyškových 10 µl bolo umiestnených do chladničky kde reakcia prebiehala počas noci pri 4 °C. Nasledujúce ráno bol celý zvyšný objem reakcie (10 µl) použitý pre transformáciu chemokompetentných baktérii *E. coli* kmeňa DH5α a následná selekcia prebiehala na tuhom LB médiu s obsahom príslušných antibiotík.

Kolónie, narastené na tuhom LB médiu boli sterilne odpichnuté do tekutého LB média s obsahom príslušných selekčných antibiotík. Následne bola izolovaná pDNA metódou P1P2P3, ktorá bola ďalej overovaná pomocou restričného štiepenia. Pozitívne klony boli prečistené pomocou kitu Qiaprep (príloha kapitola 9.1.6) a následne pripravené na sekvenáciu. Vzorky boli sekvenované firmou SEQme a preto boli pripravené tak aby 1,5 ml eppendorf skúmavka obsahovala objem zodpovedajúci 500 ng plazmidu; 2,5 µl 10 µM primeru a zbytok bol doplnený MiliQ vodou do 10 µl. Primery použité pre sekvenovanie boli zhodné s primerami využitými pre sekvenovanie PCR produktov.

Tab. 7: Zloženie reakcie za účelom linearizácie vektoru (50 µl).

Zloženie reakcie	Objem (µl)
10x tango pufor	5
Vektor	10 (20 µg)
SmaI restričná endonukleáza	1 (10U)
Voda	34

Tab. 8: Zloženie ligačnej reakcie (20 µl).

Zloženie ligačnej reakcie	Objem (µl)
10x pufor pre T4 DNA ligázu	2
50% PEG 4000	2
Linearizovaný vektor	1 (50 ng)
PCR produkt	1 (31,5 ng)
T4 DNA ligáza	1 (5U)
Voda	13

3.2.3 Rozmnoženie rastlinného materiálu

Rastliny identifikované ako mutantné boli následne zmnožené pomocou metódy odrezkov za účelom fenotypových analýz. Spolu s CRISPR-KO rastlinami bol zmnožený aj genotyp RSY a línia vyprodukovaná v bakalárskej práci počas predchádzajúceho štúdia. Jednalo sa o nadexpresnú líniu exprimujúcu konštrukt *UBQ10:YFP:cMMK3*.

Z materských rastlín boli odobraté stonky tak aby obsahovali 3-4 nódy a zároveň obsahovali listy. Zo spodnej časti boli listy odstránené a stonka bola obalená v prášku na STIMULAX I, ktorý podporoval zakorenenie rastlín. Stonky boli následne umiestnené do perlitu v plastových kyblíkoch. V perlite bola najprv vytvorená jamka, do ktorej sa vložila stonka a následne bol perlit k stonke prihrnutý tak aby nedošlo k odstráneniu prášku z povrchu stonky. Do jedného kýbliku bolo takýmto spôsobom umiestnených 6 stoniek. Nasledovalo navlhčenie perlitu vodou, uzavretie kýbliku a kultivácia vo fytotrone. Po 14 dňoch bolo možné pozorovať vznikajúce adventívne korene a v tomto bode bolo potreba pre ďalší rast koreňov pridať tekuté Fahræus médium bez obsahu N₂. Rastliny boli pestované v kýbliku, kým ich koreňová sústava nebola dostatočne rozvinutá, aby boli schopné ďalej sa rozvíjať v pôde. Pred obdobím presadenia do pôdy a pestovania v kvetináčoch boli rastliny podrobené aklimatizácii v podobe otvárania kýblikov a predlžovania doby expozície okolitému vzduchu vo fytotrone. Po presadení boli kvetináče prvé dni obalené priesvitnou fóliou tak aby chránila rastliny pred zmenou vlhkosti vzduchu. Vo fólii boli postupne vytvárané otvory až bola odstránená úplne.

Takto zmnožené rastliny boli ďalej propagované pomocou mechanického samoopelenia, kedy bol pomocou pinzety vyvíjaný jemný tlak na kvet kým nedošlo

k uvoľneniu peľu. Struky boli následne zbierané po uschnutí a uskladnené v chladničke pri 4 °C.

3.2.4 Analýza hladín transkriptov v mutantných líniah *mpk13*

Pre túto analýzu boli využité 2 týždňové rastliny *A. thaliana* pestované v *in vitro* podmienkach na ½ MS médiu. Jednotlivé rastliny boli rozdelené na nadzemnú a podzemnú časť, ich časti boli homogenizované v trecej miske za použitia tekutého dusíku a homogenizáty boli uskladnené v eppendorf skúmavkách pri -80 °C. Pre analýzu boli použité rastliny divokého typu Col-0 a T-DNA inzerčné línie SALK_130193.54.05.x, SALK_204107, SALK_048680.1, ktorých homozygotnosť bola overená v predchádzajúcej bakalárskej práci (Lokajová, 2024).

3.2.4.1 Izolácia mRNA

Po vybratí vzoriek na ľad bolo k vzorkám v digestore pridaných 800 µl TRI reagentu. Obsah bol zvortexovaný a vzorky boli inkubované počas 5 minút pri laboratórnej teplote. Následne boli centrifugované za podmienok 12 000 g, 4 °C počas 10 minút. Supernatant bol odňatý a prenesený do čistých eppendorf skúmaviek. Následne bolo k nemu pridaných 80 µl BCP, vzorky boli energicky ručne premiešané a inkubované 10 minút pri laboratórnej teplote. Počas inkubácie bolo vhodné ich premiešať nakoľko dochádzalo k separácii fáz. Nasledovala centrifugácia pri 12 000 g, 4 °C počas 15 minút. Vodná fáza, ktorá sa nachádzala vo vrchnej časti skúmavky bola odobratá a následne bol k nej pridaný 100% izopropanol v takom objeme, ktorý odpovedal 70% objemu odobratej vodnej fázy. Vzorky boli premiešané pipetou a inkubované 5 minút pri laboratórnej teplote. Vzorky boli ďalej centrifugované pri 12 000 g, 4 °C počas 8 minút. Supernatant bol odstránený a k peletu bol pridaný 1 ml 75% etanolu. Vzorky boli jemne premiešané tak aby sa pelet odlepil od steny skúmavky a inkubované 1 hodinu pri laboratórnej teplote. Po ubehnutej inkubácii boli vzorky centrifugované za účelom usadenia peletu, v ktorom sa nachádzala RNA. Podmienky centrifugácie boli 7500 g pri 4 °C počas 5 minút. Etanol bol odstránený a otvorené eppendorf skúmavky boli ponechané v digestore za účelom vyparenia zvyškového etanolu. Pelet bol následne rozpustený v 30 µl MiliQ vody.

Koncentrácia vzoriek bola zmeraná pomocou nanodropu a časť vzoriek bola odobraná za účelom zbavenia vzoriek DNA. Do reakcie bol odobraný taký objem vzorky, ktorý obsahoval 2000 ng. Zloženie reakcie je uvedené v tabuľke č. 9. Reakcia prebiehala počas 40 minút pri 37 °C a ukončenie reakcie prebehlo pridaním 2 µl EDTA (50 mM) a

následnou inkubáciou 10 minút pri teplote 70 °C. Zbytok vzoriek bol uskladnený na -80 °C pre ďalšie experimenty.

Takto ošetrené vzorky boli následne podrobené agarózovej gélovej elektroforéze. 2 µl vzorky boli zmiešané s LD a vizualizované pomocou Midori Green. Elektroforéza slúžila pre kontrolu integrity RNA a potvrdenie odstránenia gDNA.

Tab. 9: Zloženie reakcie o objeme 20 µl za účelom prečistenia izolovanej RNA od DNA

Zloženie reakcie	Objem (µl)
10x pufor s MgCl₂ pre DNázu I	2
DNáza	2 (2U)
RNA	Objem obsahujúci 2000 ng
Voda	Doplniť do 20 µl

3.2.4.2 Prepis mRNA do cDNA

Nakoľko sa jedná o reakciu s lineárnym priebehom bolo potrebné v prvom kroku ošetriť RNA pomocou oligodT primeru tak, aby bola možná polymerácia v kroku druhom. Primer zložený z 18 tymínov nasadá na polyadenylový koniec mRNA a vytvára tak podmienky vhodné pre polymeráciu pomocou reverznej transkriptázy (RT) v podobe voľného 3'OH konca. Zloženie prvej reakcie sú uvedené v tabuľke č. 10.

V druhom kroku prebiehala samotná syntéza cDNA pomocou RT. Reakčná zmes obsahujúca potrebné komponenty bola v objeme 10 μ l pridaná k zmesi RNA z prvého kroku a následne prebiehal prepis počas 3 hodín pri teplote 42 °C. Zloženie reakčnej zmesi je uvedené v tabuľke č. 11. Následne boli vzorky podrobené inaktivácii RT a to 10 minút pri teplote 70 °C. K vzorkám v objeme 20 μ l bolo následne pridaných 60 μ l MiliQ vody. Takto 4x zriedené vzorky boli vhodné pre semi qPCR prípadne boli riedené ešte dodatočne 10x (10 μ l vzorky + 90 μ l MiliQ vody) za účelom prípravy pre RT-qPCR.

Tab. 10: Zloženie prvej reakcie s cieľom zaviesť oligodT na polyA koniec. Objem reakcie bol 10 μ l

Zloženie reakcie	Objem (μ l)
oligodT primer (100 μM)	0,5
RNA	8,5
MiliQ voda	1

Tab. 11: Zloženie druhej reakcie pre syntézu cDNA. Objem reakcie tvoril 10 μ l a bol spojený s reakciou prvou. Celkový objem tak tvoril 20 μ l

Zloženie reakcie	Objem (μ l)
5x pufor M-MLV	4
RNazine	0,4
M-MLV RT	0,4
10 mM dNTPs	1
MiliQ voda	4,2

3.2.4.3 Semi qPCR

Semi qPCR bola využitá pre potvrdenie prítomnosti transkriptov génu *MPK13* aj v T-DNA inzerčných mutantných líniiach a pre overenie prepisu do cDNA. Taktiež bola táto metóda využitá pre overenie funkčnosti primerov pre RT-qPCR analýzu. Zloženie PCR reakcie a nastavenie programu sú uvedené v tabuľkách č. 12 a 13. Primery využité pre túto reakciu sú uvedené v tabuľke č. 14.

Tab. 12: Zloženie PCR reakcie pre semiQ PCR

Zloženie PCR reakcie	Objem (μl)
PCR voda	5,75
10x dTaq pufor	1
10 mM dNTPs	0,2
Forward primer	0,5
Reverse primer	0,5
Polymeráza dTaq	0,05
Templát	2

Tab. 13: Program semi qPCR reakcie

Fáza	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet opakovaní
Iniciálna denaturácia	95	180	1x
Denaturácia	95	30	35x
Nasadanie primerov	53,9-59,2	30	
Polymerácia	72	75	
Finálna polymerácia	72	900	1x
Schladienie vzorky	12	∞	

Tab. 14: Zoznam použitých primerov a ich sekvencie pre semi qPCR

Názov primeru	Sekvencia	Teplota anelácie (°C)
MPK13_Fw	ATGGAGAAAAGGGAAGATGGAG	59,4
MPK13_Rev_short	TTAAGGTTTTAATTTGCTTACCTCAG	56,1
qPCR_MPK13_Rev3	GAAGGATCGAAAACCTAGCATC	56
qPCR_UBQ10_Fw	CGTTAAAACCCTAACGGGAA	55,6
qPCR_UBQ10_Rev	CAGCAAGAGTTCTGCCAT	53,9
qPCR_MPK13_Fw1	GAAGATGGAGGGATCTTGAC	55
qPCR_MPK13_Rev1	TTGATCTCTCGGAGAGTTCT	54,5
qPCR_MPK13_Fw2	TTTCCCACATGGATCATGAC	54,9
qPCR_MPK13_Rev2	CTGACAATGGTCATCAGTTAGAG	57,3
qPCR_MPK13_Fw3	GGTAAAGATTACGTTTCAGCAG	55,8
qPCR_MPK13_Rev3	GAAGGATCGAAAACCTAGCATC	56

3.2.4.4 RT-qPCR

Prvý krok v prípade RT-qPCR experimentu bola analýza eficientie primerov a výber vhodných referenčných génov. Následne bolo prístupné k samotnému experimentu.

V prípade analýzy primerov je používaný iba jedna templátová cDNA a to v rôznych koncentráciách. Po vyhodnotení hodnôt Ct je možné určiť s akou eficientiou je templát amplifikovaný a tak určiť vhodnosť primerov pre analýzu. Na druhej strane výber vhodných referenčných génov obnáša použitie všetkých skúmaných templátov cDNA a všetkých primerov pre potenciálne referenčné gény. Pomocou nástroja RefFinder je následne možné vyhodnotiť, ktoré referenčné gény vykazujú nemennú hladinu naprieč všetkými vzorkami.

Samotná reakčná zmes (ďalej označovaná ako primárna) bola vždy vopred pripravená na 3 opakovania experimentu. Medzi jednotlivými experimentami bola uskladnená v chladničke v eppendorf skúmavke obalenej hliníkovou fóliou. Jej zloženie je uvedené v tabuľke č. 15, pričom zloženie je upravené tak aby odpovedalo nastaveniu prístroja, ktorý pracuje v móde „low-ROX“. Pred každým experimentom bolo odobratých 150 µl primárnej zmesi a zmiešaných so sekundárnou zmesou primerov o objeme 50 µl (zloženie uvedené v tabuľke č. 15). Výsledná zmes objemu 200 µl bola následne rozpipetovaná na dno jednotlivých jamôk po 8 µl, čo zodpovedalo 24 jamkám podľa návrhu templátu experimentu. Takto boli pripravené 4 typy zmesí. Dve pre dvojicu

referenčných génov a dve pre dvojicu génov záujmu. Po rozpipetovaní všetkých reakčných zmesí bola na steny jamôk pipetovaná cDNA. Následne bola platnička zalepená optickou fóliou, stočená v centrifúge počas 10 sekúnd a umiestnená do prístroja s vopred nahratým programom pre experiment. Program reakcie a jeho fázy sú uvedené v tabuľke č. 16.

Vyhodnotenie experimentu prebiehalo pomocou softwarov DA2 a DataAssist.

Tab. 15: Zloženie primárnej a sekundárnej reakčnej zmesi

Primárna reakčná zmes	Objem (μl)
2x ImmoMix	1667
500x ROX	6,67
100x SYBR green	33,3
MiliQ voda	293,3
Sekundárna reakčná zmes primerov	
Forward primer	12,5
Reverse primer	12,5
MiliQ voda	25

Tab. 16: Program RT-qPCR analýzy. *po uplynutí doby v tomto kroku dochádzalo k zberu dát, k zberu dát dochádzalo takisto medzi krokom nasadenia primerov a disociáciou.

Fáza		Teplota (°C)	Čas (s)	Počet opakovaní
Začiatok experimentu	Iniciálna denaturácia	95	10	1x
	Denaturácia	95	15	
PCR	Nasadenie primerov a amplifikácia	60	60*	40x
	Denaturácia	95	15	
Meranie teplotnej krivky	Nasadenie primerov	60	60	1x
	Disociácia	95	1	

3.2.5 Molekulárne klonovanie metódou Multisite Gateway

Konstruktory boli pripravené s využitím trojkomponentového a jednokomponentového klonovacieho systému „Multisite Gateway® Three-Fragment Vector Construction Kit Using Gateway® Technology to simultaneously clone multiple DNA fragments“, verzia D. Tento typ klonovania bol využitý aj bakalárskej práci (Lokajová, 2024) a jeho bližší postup je uvedený v prílohách (9.1.2)

Pre tvorbu vstupných klonov boli použité donorové vektory: pDONR P4-P1R za účelom klonovania do A fragmentu (promótor) a pDONR207, pDONR221 pre klonovanie do B fragmentu a pDONR P2R-P3 pre klonovanie do C fragmentu. Pre klonovanie jednokomponentového systému bol využitý vektor pDONR207 kvôli potrebe odlišiť antibiotickú rezistenciu medzi vstupným a donorovým vektorom.

3.2.5.1 Agarózová gélová elektroforéza

Táto metóda sa využíva predovšetkým na vizualizáciu DNA fragmentov vzniknutých počas PCR amplifikácie, genotypizačných postupov alebo po restriktívnom štiepení. Bližší postup prípravy vzoriek je zhrnutý v prílohách (9.1.3)

Samotná separácia DNA fragmentov sa uskutočňovala v 1xTAE tlmivom roztoku v elektroforetickej súprave Sub-Cell® GT Cell napojenej na zdroj PowerPac™ Basic. Experiment prebiehal pri konštantnom napätí 90 V, čo zodpovedalo prúdu 400 mA. Dĺžka elektroforézy sa pohybovala v rozmedzí 30–45 minút v závislosti od požadovaného rozlíšenia fragmentov. Po ukončení behu bol gél premiestnený na fotodosku a analyzovaný pomocou zariadenia Gel Doc™ EZ Imager s využitím softvéru Image Lab™.

3.2.5.2 Príprava PCR produktu pre BP reakciu

Polymerázová reťazová reakcia (PCR) bola realizovaná s cieľom amplifikácie génu záujmu, pričom hlavným účelom bolo zavedenie rekombinačných sekvencií do požadovaných úsekov génu. Jej detailný popis je uvedený v prílohe v kapitole 9.1.4.

Primery použité pre PCR reakciu sú uvedené v tabuľke č. 17 a program samotnej PCR reakcie je uvedený v tabuľke č. 19, pričom jej zloženie je zhrnuté v tabuľke č. 18.

Tab. 17: Sekvencie použitých primerov pre PCR reakciu za účelom klonovania *MPK13* do vstupných klonov

Názov primeru	sekvencia	Teplota anelácie (°C)
MPK13_Afr_Fw_ longer	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTT GAAAGAGCTGACGATAATAACG	57,4
MPK13_Afr_Fw_ shorter	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTT GAATTCTCTGATCCTTAATATG	51,7
MPK13_Afr_Rev	GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTG ACTCTTCTTTGGAAGAAGAA	55,2
MPK13_Bfr_Fw	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCA GGCTATATGGAGAAAAGGGAAGATG	57,6
MPK13_Bfr_Rev	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCT GGGTACATATTCTTGAAGTGTAAGAC	55,8
MPK13_Cfr_Fw	GGGGACAGCTTCTTGTACAAAGTG GTTATGGAGAAAAGGGAAGATG	57,6
MPK13_Cfr_Rev	GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTT GTTTACATATTCTTGAAGTGTAAGAC	58,3
MPK13_Cfr_3UTR_ Rev	GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTT GTGAGATGTTTTACGTTTAAT	55

Tab. 18: Zloženie PCR reakcie za účelom amplifikácie génu *MPK13*

Zloženie PCR reakcie	Objem (μl)
PCR voda	31,5
5x pufor HF Phusion	10
10 mM dNTPs	1
Forward primer	2,5
Reverse primer	2,5
Polymeráza Phusion	0,5
Templát (25 ng/μl)	2

Tab. 19: Teplotný program zvolený pre PCR reakciu so zvoleným teplotným gradientom v prípade fázy nasadania za účelom amplifikácie génu *MPK13*

Fáza	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet opakovaní
Iniciálna denaturácia	98	30	1x
Denaturácia	98	10	35x
Nasadanie primerov	51-58	10	
Polymerácia	72	60	
Finálna polymerácia	72	600	1x
Schladienie vzorky	4	∞	

3.2.5.3 Rekombinačné reakcie (BP a LR reakcia)

Rekombinačné reakcie predstavujú základnú časť prípravy klonov, pričom sa využívajú dve odlišné metódy – BP a LR reakcia. Ich detailný priebeh je uvedený v prílohách (9.1.5). BP reakcia je používaná pre tvorbu vstupných klonov nesúcich jednotlivé časti finálneho konštruktu ako je napríklad promótor, gén záujmu alebo fluorescenčná značka, ktoré sa následne môžu kombinovať a zostavovať do jedného expresného klonu o troch komponentoch v LR reakcii.

Reakcie prebiehajú počas noci v cykléri pri 25°C. Finálny objem každej reakcie je 10 µl. Obsah BP reakcie spočíva v PCR produkte a prázdnom donorovom vektore, do ktorého je PCR produkt klonovaný pomocou BP klonázy. V prípade LR reakcie sú v zmesi prítomné želané vstupné klony a prázdny expresný vektor, do ktorého sú pomocou LR klonázy dané vstupné vektory inkorporované. Reakcie sú zastavené v oboch prípadoch rovnako a to pridaním 1 µl proteínázy K (súčasť kitu) a následnou 10-minútovou inkubáciou pri 37 °C. V oboch prípadoch sa využíva selekcia produktov skrz transformáciu kompetentných buniek *E. coli* a následnej kultivácii kolónii na tuhom LB médiu s príslušným selekčným antibiotikom.

Správnosť výsledného produktu sa následne potvrdzovala restriktčnou analýzou izolovanej plazmidovej DNA a sekvenovaním Sangerovou metódou.

3.2.6 Príprava elektrokompetentných buniek

Za účelom prípravy elektrokompetentných buniek *E. coli* kmeňa TOP10 bola najprv vytvorená štartovacia kultúra pomocou kryokonzervy uchovanej na -80°C Kryokonzerva obsahujúca 100 µl kultúry bola sterilne pomocou automatickej pipety prenesená do 2 plastových skúmaviek o objeme 50 ml s 10 ml tekutého LB média bez obsahu antibiotík

(50 μ l/10 ml média). Kultúry boli kultivované počas noci pri 37°C a 200 RPM v inkubátore ES-20.

Na druhý deň ráno bolo 5 ml kultúry prenesených v sterilnom prostredí flowboxu do sterilných Erlenmeyerových bánk o objeme 250 ml. Následne bol objem doplnený do 50 ml LB médiom bez prídavku antibiotík. Prebehla kultivácia pri 37°C a 150 rpm do bodu kým OD₆₀₀ nedosiahlo hodnotu 0,5-0,6. Kultúry boli preliate do 50 ml sterilných Falkonových skúmaviek a ponechané na ľade počas 15-tich minút a po uplynutí doby centrifugované 10 minút pri 3500 g vo vopred vychladenej centrifúge na 4°C.

Supernatant bol opatrne odliaty a k peletu bolo pridaných 50 ml sterilnej MiliQ vody (50 ml na 50 ml kultúry). Pomocou vortexu bol pelet rozsuspendovaný a kultúry boli opäť centrifugované za rovnakých podmienok. Supernatant bol opatrne a sterilne odstránený pipetou a predchádzajúci krok bol zopakovaný ešte raz za účelom premytia. Následne bol supernatant opäť odstránený a k peletu v jednej skúmavke bolo pridaných 4 ml 10% sterilného glycerolu. Objem sa po rozsuspendovaní presunul do skúmavky č. 2 a v tomto objeme bol následne rozsuspendovaný aj druhý pelet. Takto sa postupovalo aj s tretou a štvrtou skúmavkou.

Následne bola zmeraná hodnota OD₆₀₀ pomocou spektrofotometra. Ideálna koncentrácia takto pripravenej kultúry predstavovala 2×10^{11} buniek/ml. Kultúra bola doriedená na túto koncentráciu a po 100 μ l bola sterilne za stáleho chladenia rozpipetovaná do 1,5 ml vopred vychladených eppendorf skúmaviek na -20°C. Tie boli následne zmrazené v tekutom dusíku a uschované pri -80°C.

3.2.7 Transformácia kompetentných buniek *E. coli*

Na transformáciu sa použili chemokompetentné bunky *E. coli* kmeňov DH5 α a TOP10. Do 100 μ l vopred pripravených (počas bakalárskej práce) a čiastočne rozmrazených buniek bolo pridaných 2 μ l ukončenej BP reakcie. Eppendorf skúmavky sa následne ponechali na ľade po dobu 30 minút, pričom boli občas jemne premiešané. Po tejto inkubácii nasledoval teplotný šok. Skúmavky sa na 60 sekúnd vložili do termobloku vyhriateho na 42 °C a následne sa opäť ochladili na ľade po dobu 2 minút. Do každej skúmavky sa potom pridalo 150 μ l S.O.C. média.

Transformácia elektrokompetentných buniek prebiehala pomocou elektroporačných kyviet a elektroporátora. K nie úplne rozmrznutým bunkám bol pridaný 1 μ l produktu

rekombinačnej reakcie a obsah bol premiešaný pomocou malej Pasteurovej pipety, ktorá bola súčasťou balenia elektroporačných kyviet. Následne prebehla inkubácia buniek na ľade po dobu 1 minúty. Na ľade boli taktiež vychladené aj elektroporačné kyvety. Po inkubácii buniek bol pomocou pipety celý objem prenesený do elektroporačnej kyvety. Tá bola uzavretá, obsah bol sklepaný a kyveta bola osušená. Po vložení do elektroporátora bol zvolený program Ec2, čo odpovedá podmienkam 1600 kV po dobu 5 ms. Po samotnej elektroporácii bolo k bunkám v kyvete pridaný 1 ml SOC média. Ten bol následne prenesený do 2 ml Eppendorf skúmavky, uzáver skúmavky bol oblepený parafilmom a skúmavka bola upevnená v horizontálnej polohe na stojan.

Vzorky boli fixované na trepačke a inkubované pri 37 °C počas 90 minút pri neustálom miešaní (200 RPM). Po inkubácii sa celý objem každej vzorky sterilne vo flowboxe preniesol automatickou pipetou na Petriho misky obsahujúce LB médium s príslušným antibiotikom. Na rovnomerné rozotretie po povrchu média sa použila jednorazová bakteriologická hokejka. Po zaschnutí zvyškového média boli Petriho misky obrátene (médium nahor) umiestnené do inkubátora a kultivované cez noc pri 37 °C

V prípade transformácie za využitia elektroporačných kyviet je kyvety potrebné umyť a následne je ich možné použiť pre transformáciu opakovane. Čistenie kyviet prebiehalo najprv pomocou 70% etanolu kedy bol objem kyvety naplnený etanolom a následne vyliaty do tekutého GMO odpadu. Tento krok sa opakoval trikrát. Následne sa proces opakoval, ale s destilovanou vodou. Do kyviet sa následne napipetovala 0,3 M HCl a kyvety sa nechali inkubovať v digestore. Obsah sa následne 3x vymyl destilovanou vodou a následne 3x 70% etanolom. Kyvety sa omyli taktiež 96% ethanolom a nechali sa vyschnúť v prostredí flowboxu, pričom pre lepší účinok sterilizácie je možné ich tam ponechať aj pri samotnej sterilizácii flowboxu UV svetlom.

3.2.8 PCR kolónií

PCR kolónií („colony PCR“) slúži na identifikáciu transformovaných bakteriálnych kolónií, ktoré obsahujú správne rekombinovaný plazmid s požadovaným inzertom.

Kolónie vyrastené na Petriho miskách s tuhým LB médium doplneným o príslušné selekčné antibiotiká boli najprv spočítané a označené číslami. Z každej kolónie bola malá časť prenesená pomocou sterilných špičiek z automatickej pipety do PCR skúmaviek obsahujúcich 10 µl PCR vody. Pomocou pipetovania bol bakteriálny materiál dôkladne

rozsuspendovaný, čím vznikla zmes slúžiaca ako templát pre následnú PCR reakciu. Použité primery a ich sekvencie, zloženie reakcie a nastavenie programu je uvedené v tabuľke č.20, 21 a 22 v danom poradí.

Tab. 20: Použité primery pre PCR kolónii a ich sekvencie

názov	sekvencia	Teplota anelácie (°C)
SeqMe_M13Fw	TGTAAAACGACGGCCAGT	56,5
qPCR_MPK13_Fw3	GGTAAAGATTACGTTTCAGCAG	55,8

Tab. 21: Zloženie PCR reakcie za použitia DreamTaq polymerázy pre PCR kolónii

Zloženie PCR reakcie	Objem (μl)
PCR voda	6,75
10x DreamTaq pufor	1
10 mM dNTPs	0,2
Forward primer	0,5
Reverse primer	0,5
Polymeráza dTaq	0,05
Templát	1

Tab. 22: Teplotný program cykléru použitý pre PCR kolónii

Fáza	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet opakovaní
Iniciálna denaturácia	95	60	1x
Denaturácia	95	30	
Nasadanie primerov	55,8	30	40x
Polymerácia	72	60	
Finálna polymerácia	72	10	1x
Schladienie vzorky	4	∞	

3.2.9 Izolácia plazmidovej DNA

3.2.9.1 Izolácia pDNA

Na izoláciu plazmidovej DNA bola využitá bakteriálna kultúra (zdrojom kultúry bola kolónia *E. coli* narastená na tuhom LB médiu v Petriho miske po transformácii) kultivovaná cez noc v tekutom LB médiu doplnenom o príslušné selekčné antibiotiká. Kultivácia prebiehala pri teplote 37 °C za neustáleho trepania (200 RPM). Kolónia bola prenesená do tekutého média sterilným špáradlom, ktoré sa po odpichnutí ponorilo do skúmavky s LB médiom a ponechalo sa v nej počas celej inkubácie.

Následná izolácia plazmidovej DNA prebiehala pomocou protokolu P1P2P3 založeného na protokole kitu Qiagen (uvedený v prílohách v kapitole 9.1.7)

3.2.10 Restrikčné štiepenie plazmidov

Pozitívne klony boli vyhodnocované na základe zhody medzi *in silico* predikovanými štiepnymi fragmentami a pozorovanými štiepnymi fragmentmi jednotlivých plazmidov.

Reakčná zmes určená na restrikčné štiepenie mala finálny objem 10 µl a pozostávala zo 6,8 µl PCR H₂O, 1 µl tlmivého roztoku kompatibilného s použitou restrikčnou endonukleázou; 0,2 µl restrikčného enzýmu a 2 µl plazmidovej vzorky. V prípade súčasného použitia dvoch endonukleáz sa objem každého enzýmu znížil na 0,1 µl.

Vzorky boli následne inkubované pri optimálnej teplote enzýmu a potom dochádzalo k ich separácii na agarózovom géli.

3.2.11 Transformácia chemokompetentných buniek *Agrobacterium tumefaciens*

V prípade transformácie buniek *A. tumefaciens* a následnej transformácie listov *N. benthamiana* bol použitý rovnaký postup ako v bakalárskej práci (Lokajová, 2024)

Na transformáciu bol použitý kmeň *Agrobacterium tumefaciens* GV301, pričom baktérie boli transformované plazmidom izolovaným metódou P1P2P3 (kapitola 3.2.9.1). Chemokompetentné bunky uchovávané pri –80 °C boli najprv umiestnené na ľad na približne 2 minúty, aby sa mierne rozmrazili. Do takto pripravených buniek bolo následne automatickou pipetou pridaných 10 µl izolovaného, neprečisteného plazmidu. Skúmavky s bunkami zostali uložené na ľade po dobu 30 minút.

Po tejto inkubácii boli prenesené do tekutého dusíka na 5 minút a následne ponechané pri izbovej teplote ďalších 10 minút. Potom bolo do každej skúmavky pridaných 150 μ l S.O.C. média. Skúmavky umiestnené horizontálne na pevnej podložke sa inkubovali pri 28 °C a 200 RPM. Po dvojhodinovej inkubácii bol celý objem skúmavky rozotretý sterilnou hokejkou na povrch tuhého LB média obsahujúceho príslušné selekčné antibiotiká.

Petriho misky sa kultivovali obrátené médiom nahor počas dvoch nocí pri teplote 28°C. Získané kultúry sa následne využili na tranzientnú aj stabilnú transformáciu.

3.2.12 Tranzientná transformácia listov *N. benthamiana*

Na transformáciu bola použitá kultúra *A. tumefaciens* obsahujúca požadovaný plazmid. Do sterilnej plastovej skúmavky (50 ml) s 10 ml tekutého LB média doplneného o príslušné selekčné antibiotiká bolo inokulovaných 15 μ l bakteriálnej kultúry. Paralelne bola pripravená kontrola v 2 ml Eppendorf skúmavke, ktorá obsahovala len LB médium s antibiotikom. Takto pripravené vzorky boli inkubované spolu s kontrolou cez noc (približne 16 hodín) pri 28 °C a 180 RPM.

Na druhý deň prebehla centrifugácia kultúr pri 4 °C a 3000 g počas 10 minút. Supernatant bol opatrne odstránený a pelet rozpustený pomocou vortexu v 1 ml infiltračného média. Tento postup centrifugácie a resuspendácie sa zopakoval ešte raz za rovnakých podmienok. Z pripravených vzoriek bola následne meraná hodnota OD600 oproti čistému médiu. Pred samotnou infiltráciou boli vzorky nechávané inkubovať 2 hodiny v tme pri laboratórnej teplote. Potom sa kultúry nariedili v infiltračnom médiu na finálny objem 2 ml tak, aby konečná hodnota OD600 dosahovala 0,7.

Pripravené suspenzie sa následne aplikovali na spodnú (abaxiálnu) stranu listov *N. benthamiana* pomocou plastovej striekačky. Pre lepšie prenikanie baktérií do listového pletiva sa rastliny v deň experimentu ráno intenzívne zaliali, čím sa podporilo otvorenie prieduchov. Miesta aplikácie boli na hornej (adaxiálnej) strane listov vyznačené fixkou.

3.2.13 Analýza fúzných proteínov

Analýza fúzných proteínov prebiehala do veľkej miery podľa protokolu uvedeného v bakalárskej práci (Lokajová, 2024). V tejto práci bol modifikovaný proces imunoblotovania.

3.2.13.1 Extrakcia proteínov

Proteíny boli izolované z tranzientne transformovaných listov *N. benthamiana*, prípadne z listov *M. sativa*. Rastlinný materiál bol homogenizovaný v trecej miske v tekutom dusíku. Získaný jemný prášok použitý na extrakciu proteínov alebo uskladnený v Eppendorf skúmavkách pri -80 °C.

V prípade extrakcie bol k homogenizátom pridaný extrakčný roztok E s obsahom inhibítora proteáz Complete Tablets EDTA free a redukčného činidla DTT (0,1 M). Vychladený roztok E bol v objeme 100 µl pridaný k homogenizátu chladenému na ľade. Vzorky boli premiešané vortexom, krátko stočené na stolnej centrifúge („short spin“) a následne inkubované na ľade počas 30 minút.

Po inkubácii boli vzorky centrifugované pri 4 °C a 7000 g počas 10 minút vo vopred vychladenej centrifúge ScanSpeed 1730R Refrigerated microcentrifuge. Získaný supernatant bol automatickou pipetou prenesený do čistej, vopred vychladenej 1,5 ml Eppendorfovej skúmavky. Takto pripravené vzorky boli uskladnené pri -20 °C.

Pre extrakciu proteínov za účelom analýzy pomocou NATIVE PAGE bol využitý fosfátový tlmivý roztok a postup extrakcie prebiehal za rovnakých podmienok.

3.2.13.2 Stanovenie koncentrácie proteínov

Za týmto účelom bola využitá Bradfordova metóda. Protein Assay Dye Reagent Concentrate bol pred použitím nariadený MiliQ vodou v pomere 1:4. Pripravený roztok bol následne rozpipetovaný po 299 µl do jamiek 92-jamkovej mikrodostičky a do každej jamky bol pridaný 1 µl príslušnej proteínovej vzorky. Ako blank bolo použité činidlo s prídavkom 1 µl extrakčného roztoku E. Obsah jamiek bol dôkladne premiešaný a po 10 minútovej inkubácii pri laboratórnej teplote bola na prístroji Tecan Infinite F200 Fluorescence Microplate Reader zmeraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 595 nm.

Na základe kalibračnej krivky vytvorenej zo štandardov BSA so známou koncentráciou bola zostrojená rovnica grafu, pomocou ktorej sa vypočítali koncentrácie proteínov v jednotlivých vzorkách z nameraných hodnôt absorbancie. Takto určené koncentrácie boli následne použité na naniesenie rovnakého množstva proteínov do jednotlivých jamiek gélu.

3.2.13.3 SDS-PAGE

V rámci prípravy proteínových vzoriek pre SDS-PAGE boli izolované proteíny zmiešané s činidlom 4x Laemmli Sample Buffer (LSB). LSB obsahovalo 20% 2-merkaptopetanol (2-ME). Následne boli vzorky zmiešané s LSB v pomere 1:3. Vzorky boli denaturované pri 95°C počas 3 minút v termobloku. Po denaturácii boli vzorky ochladené na ľade a následne uskladnené pri -20°C.

Separácia vzoriek prebiehala v aparátúre Mini-PROTEAN® Tetra Cell. Do nej boli vložené vopred pripravené 10% polyakrylamidové gély a vaňa bola naplnená 1x elektroforetickým pufrom. Ako proteínový štandard bol použitý Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards. V prípade vzoriek bolo použité množstvo zodpovedajúce 20 µg. Elektroforéza prebiehala prvých 10 minút pri konštantnom napätí 100 V a následne pri 180 V počas 70 minút. Aparatúra bola napojená na zdroj PowerPac™ HC High-Current Power Supply. V aparátúre boli počas separácie vložené chladiace bloky vopred vychladené na -20°C.

3.2.13.4 Natívna elektroforéza

V prípade elektroforetickej separácie proteínov za účelom analýzy „native PAGE“ boli využité gély bez obsahu BFB, SDS a taktiež nebolo použité činidlo LSB. Podmienky separácie prebiehali rovnako ako v kapitole SDS PAGE (3.2.13.3). Po ukončení separácie boli gély premyté v MiliQ vode a následne vyfotené pomocou ChemiDoc™ MP Imaging System programom Pro-Q Emerald 488.

3.2.13.5 Western-blot

PVDF membrány s rozmermi 8,5 cm × 6 cm boli najskôr aktivované ponorením do metanolu na 30 sekúnd. Následne boli membrány vložené do transférových kaziet medzi dva filtračné papiere tak, aby membrána smerovala k anóde, pričom polyakrylamidové gély nesúce separované proteíny v prostredí SDS boli umiestnené na stranu katódy. Všetky komponenty (membrány, filtračné papiere aj gély) boli vopred namočené v 1x transférovom tlmivom roztoku s obsahom metanolu. Pomocou valčeka boli priebežne vytláčané vzduchové bubliny, aby sa zabezpečil čo najlepší kontakt jednotlivých vrstiev.

Kazety boli následne vložené do aparátúry Mini Trans-Blot® Cell pripojenej na zdroj PowerPac™ HC High-Current Power Supply. Transfer prebiehal počas noci pri 4°C pri konštantnom napätí 24 V, pričom prvých a posledných 10 minút transferu prebiehalo pri 100 V. Aparatúra bola počas transferu umiestnená v chladničke.

Membrány boli po ukončení transferu premyté v TBS tlmivom roztoku a následne blokované v 25 ml 5% roztoku mlieka rozpusteného v TBS-T. Blokácia prebiehala cez noc pri 4°C na trepačke pri rýchlosti 10 RPM. Na druhý deň ráno boli membrány premyté v TBS-T a pokračovalo sa imunodetekciou pomocou špecifických protilátok. Ku každej membráne bolo pridaných 12,5 ml primárnej myšej protilátky špecifickej voči GFP (anti-GFP), ktorá bola pripravená v 1% roztoku mlieka a riedená v pomere 1:2000. Membrány boli s primárnou protilátkou inkubované 1,5 hodiny na trepačke Mr-12 Rocker-Shaker pri 10 RPM. Po inkubácii nasledovalo premytie membrán v TBS-T tlmivom roztoku 5×5 minút pri 40 RPM. Po premytí nasledovala inkubácia so sekundárnou protilátkou špecifickou voči myšej protilátke. Anti-mouse sekundárna protilátka bola pripravená v 1% roztoku mlieka v TBS-T pri riedení 1:4000. Každá membrána bola inkubovaná v 12,5 ml roztoku sekundárnej protilátky počas 1,5 hodiny na trepačke pri 10 RPM. Po inkubácii nasledovalo premytie membrán 4×5 minút v TBS-T pri 40 RPM.

Na detekciu proteínov bol použitý chemiluminiscenčný substrát Clarity™ Western ECL Substrate, ktorý pozostával z peroxidu vodíka a luminolu zmiešaných v pomere 1:1. Membrány boli v tomto roztoku inkubované 2 minúty a následne bol signál zaznamenaný pomocou prístroja ChemiDoc™ MP Imaging System, ktorý detegoval produkt reakcie vo forme luminiscencie.

3.2.14 Mikroskopická analýza

Na overenie expresie pripravených konštruktov bol použitý epifluorescenčný mikroskop Axio Imager.M2. Pozorovanie rastlinného materiálu sa uskutočnilo tri dni po uskutočnenej transformácii.

Z listov po tranzientnej transformácii bol pripravený mikroskopický preparát tak, aby obsahoval časť infiltrovanej oblasti a zároveň aj neinfiltrovanú časť, ktorá slúžila ako kontrola autofluorescencie. Vystrihnutý fragment listu bol uložený na podložné sklíčko abaxiálnou stranou smerom k objektívu. Na povrch listu sa aplikovala kvapka vody a preparát bol prekrytý krycím sklíčkom.

3.2.15 Povrchová sterilizácia semien *A. thaliana*

Semená *Arabidopsis thaliana* boli umiestnené do 1,5 ml Eppendorf skúmavky, do ktorej sa následne pridalo 1 ml 70 % etanolu. Skúmavka so semenami bola trepaná v aseptických podmienkach po dobu 5 minút. Po odstránení roztoku bol objem nahradený

1 ml 96 % etanolu a semená sa opäť trepali, tentoraz 1 minútu. Následne prebehlo trojnásobné premytie sterilnou MiliQ vodou.

Premyté semená boli pomocou automatickej pipety prenesené na sterilný filtračný papier uložený v Petriho miske. Po ich dôkladnom vysušení boli misky uzavreté parafilmom a uložené v chladničke pri teplote 4 °C.

3.2.15.1 Kultivácia *A. thaliana* v *in vitro* podmienkach

Sterilizované semená boli pomocou sterilných špáradiel v aseptických podmienkach prenesené na povrch ½ MS média. Petriho misky boli uzavreté chirurgickou páskou a uložené do chladničky za účelom stratifikácie. Tento proces prebiehal pri 4 °C počas 1-2 dní. Po ukončení stratifikácie boli misky premiestnené do fytotronu, kde prebiehala kultivácia rastlín pri stabilných podmienkach – teplota 21 °C, fotoperiódka 16/8 h (svetlo/tma), relatívna vlhkosť 70 % a intenzita osvetlenia 80 μmol/m²/s.

3.2.16 Fenotypová analýza rastlín *A. thaliana*

Pre analýzu boli využité tri T-DNA inzerčné línie SALK pre gén *MPK13* (SALK_130193, SALK_204107C, SALK_048680). Fenotyp mutantných línií bol porovnávaný voči ekotypu Col-0 a v prípade analýzy doby kvitnutia aj voči štyrom T-DNA inzerčným SALK líniám pre gény *U2AF65A* a *U2AF65B* (SALK_144790, SALK_075828, SALK_104128, SALK_055049C). Pre zbieranie dát z mikroskopických obrázkov bol využitý software ZEN a pre kvantitatívne merania mikroskopických dát bol využitý software ImageJ. Pre vyhodnotenie výsledkov a tvorbu grafov bol využitý software Microsoft Excel.

V rámci fenotypovej analýzy boli porovnávané trichómy a ich vetvenie na prvých dvoch pravých listoch 14-dňových semenáčikov *A. thaliana* pestovaných v *in vitro* podmienkach na ½ MS médiu. V prípade analýzy doby kvitnutia boli semená sadené priamo do pôdy, prípadne boli sadené na Petriho misky za účelom etiolizácie v prvých 6 dňoch klíčenia. Taktiež bola vyhodnocovaná dĺžka etiolizovaných hypokotýlov.

3.2.16.1 Fenotypová analýza trichómov

Pre tento typ analýzy bola využitá metóda „clearing“ za účelom zbavenia rastlinného materiálu pigmentov. Rastlinný materiál bol pomocou nožničiek a pinzety odobraný do sklenenej vialky obsahujúcej vodu z vodovodu pre elimináciu javov spojených s osmózou. Po zozbieraní všetkého materiálu bola voda odsatá Pasteurovou pinzetou

a objem bol vymenený za odfarbovací roztok. Roztok obsahoval 96% etanol a kyselinu octovú v pomere 3:1. Rastlinný materiál bol v roztoku inkubovaný počas noci a na druhý deň ráno bol objem vymenený za 96% etanol. Opäť prebehla inkubácia počas jedného dňa a nasledujúci deň bol objem vymenený za nový objem etanolu. Takto pripravené vzorky bolo možné skladovať do doby použitia, za pravidelnej kontroly a dopĺňania odpareného etanolu.

Pre zvýšenie kontrastu a uľahčenie pozorovania jednotlivých štruktúr boli listy následne farbené pomocou farbiva toluidínová modrá rozpustenej vo vode. Etanol bol vymenený za objem destilovanej vody a rastlinný materiál bol premytý. Následne bol objem vymenený za toluidínovú modrú. Farbenie prebiehalo počas 30 sekúnd. Následne prebiehalo odfarbenie vo vode a výmena objemu kým sa voda neprestala zafarbovať. Takto ofarbený rastlinný materiál bol použitý pre tvorbu trvalých preparátov. Rastlinný materiál bol vložený do kvapky 50% glycerolu na podložnom sklíčku a po priložení krycieho sklíčka, odsatí prebytočného glycerolu bolo krycie sklíčko zalakované pomocou priesvitného laku na nechty. Preparáty boli následne uschované a 48 hodín po farbení boli pozorované pomocou zoom mikroskopu za účelom analýzy trichómov (po uplynutom čase sa farba stiahne a zafixuje v trichómoch).

V softwari Zen boli následne počítané jednotlivé trichómy, plocha listu a bolo počítané percentuálne zastúpenie trichómov vetvených dvakrát alebo trikrát.

3.2.16.2 Fenotypová analýza doby kvitnutia

V prípade analýzy doby kvitnutia boli použité nesterilné semená. Potrebná časť semien bola presypaná do 1,5 ml eppendorf skúmavky a skúmavky boli naplnené vodou z vodovodu. Takto pripravené semená na stratifikáciu chladom boli umiestnené na dva dni do tmavého prostredia chladničky. Po dvoch dňoch boli semená vysiate do mokrej pôdy pomocou automatickej pipety. Kvetináče boli umiestnené na tácku a boli zakryté pomocou priesvitnej fólie tak, aby sa zabránilo prieniku nežiadúcich semien. Fólia zároveň udržovala vlhké prostredie. Po vyklíčení boli rastliny pravidelne pretrhávané, aby v kvetináčoch zostali len rastliny v tom istom vývojovom štádiu. Vyhodnotenie doby kvitnutia prebiehalo v bode, v ktorom rastlina produkovala stonku rovnú alebo vyššiu ako 1 cm, pričom v tomto bode boli spočítané pravé listy ružice.

Zároveň prebehla analýza doby kvitnutia, spočívajúca v etiolizácii semenáčikov v prvých 6 dňoch klíčenia. V tomto prípade boli sterilné semená *A. thaliana* jednotlivých

linii sadené na $\frac{1}{2}$ MS médium v Petriho miskách, ktoré boli následne obalené v hliníkovej fólii a umiestnené na dva dni do chladu a tmy v prostredí chladničky. Takto stratifikované semená boli následne premiestnené do fytotronu a počas prvých 6 dní boli kultivované v tme. Následne bola hliníková fólia odstránená a kultivácia prebehla do bodu 14 DAT (dní po transfere do fytotronu). Následne boli rastliny presadené do hlíny a doba kvitnutia bola vyhodnocovaná rovnako ako v prvom prípade.

3.2.16.3 Fenotypová analýza dĺžky hypokotylu

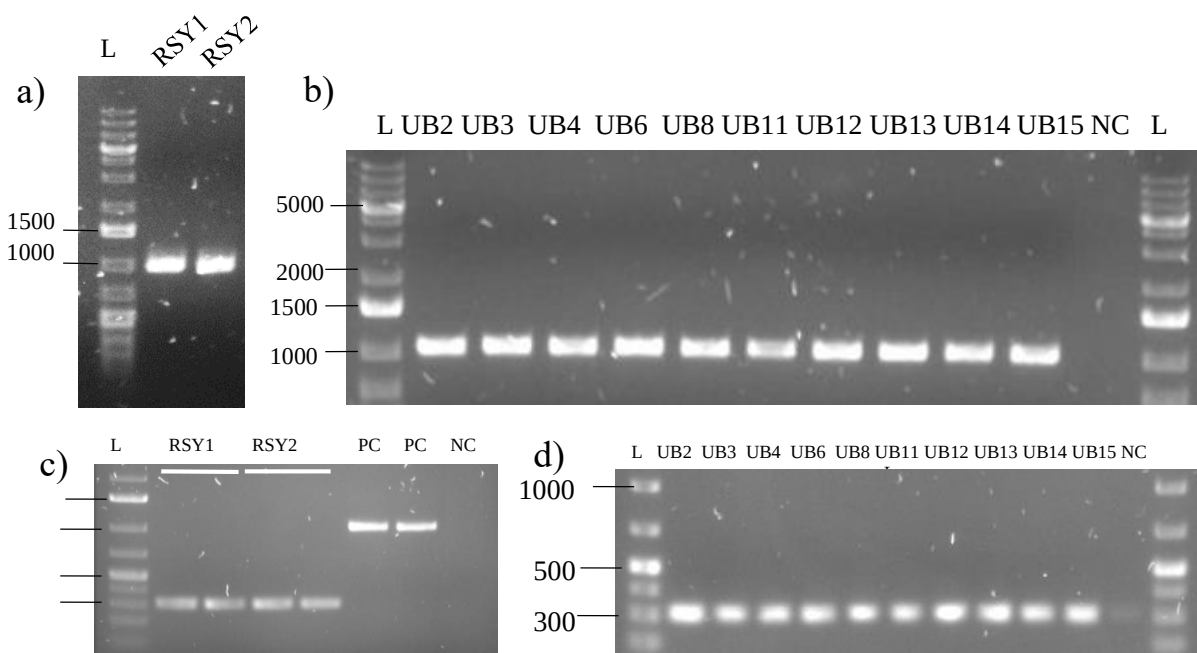
Pre túto analýzu boli využité rastliny rastúce na $\frac{1}{2}$ MS médiu v podmienkach tmy, ktorá bola zabezpečená počas prvých šiestich dní hliníkovou fóliou. Misky boli na tretí deň od presunu do fytotronu skenované a následne pomocou programu ImageJ a funkciou „segmented line“ bola meraná ich dĺžka.

4 Výsledky

4.1 Sekvencovanie rastlín *M. sativa*

4.1.1 PCR amplifikácia želaných úsekov záujmu génu *MMK3*

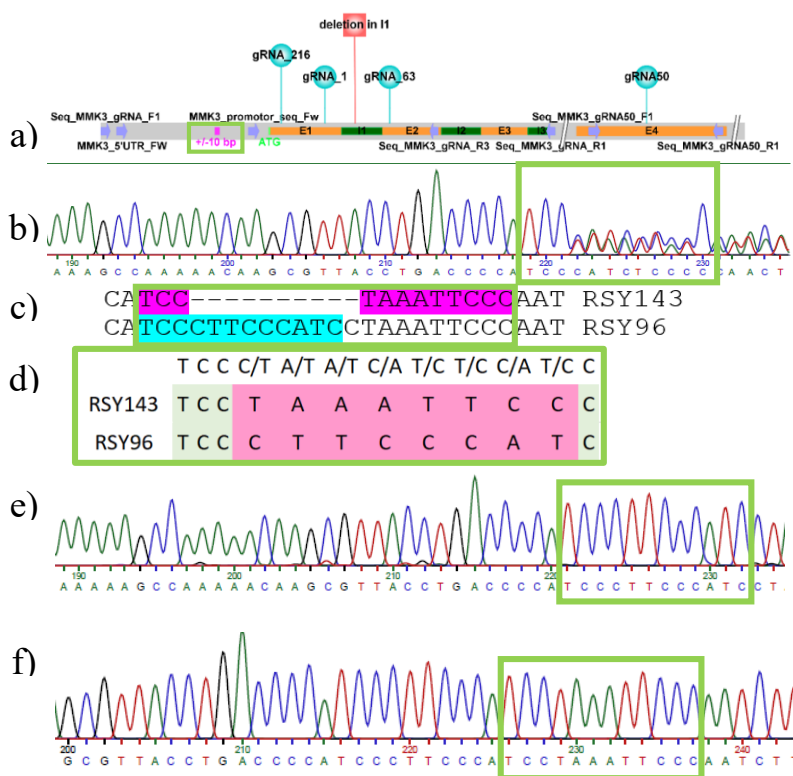
PCR reakcia prebehla pomocou enzýmu Phusion v niekoľkých krokoch pričom výsledky v podobe elektroforeogramov jednotlivých PCR reakcií je možné vidieť na obrázku 14. Najprv bolo potrebné amplifikovať rastliny divokého typu za účelom kontroly sekvencie (Obr. 14 a), c) a následne sa pristúpilo k amplifikácii úsekov génu z jednotlivých rastlín (Obr. 14 b), d)). Vzhľadom na pozíciu gRNA využitých v konštruktoch bolo potrebné amplifikovať úsek génu zahŕňajúci prvé dva exóny, kde boli cieľené 3 rôzne gRNA (Obr. 14 a), b). V druhom kroku bola amplifikovaná oblasť exónu 4 kde cieľila posledná, štvrtá gRNA (Obr. 14 c), d).



Obr. 14: Elektroforeogramy zobrazujúce PCR produkty vzniknuté amplifikáciou exónu 1 a 2 (a, b) a exónu 4 (c), d). Použité primery Seq_MMK3_gRNA_F1+Seq_MMK3_gRNA_R1 tvorili špecifický produkt o veľkosti 1023 bp (a), b). Použité primery Seq_MMK3_gRNA50_F1+Seq_MMK3_gRNA50_R1 tvorili špecifický produkt o veľkosti 301 bp (c),d). Separácia prebiehala v 1% agarózovom géli počas 30 (a), b) a 50 minút (c),d).

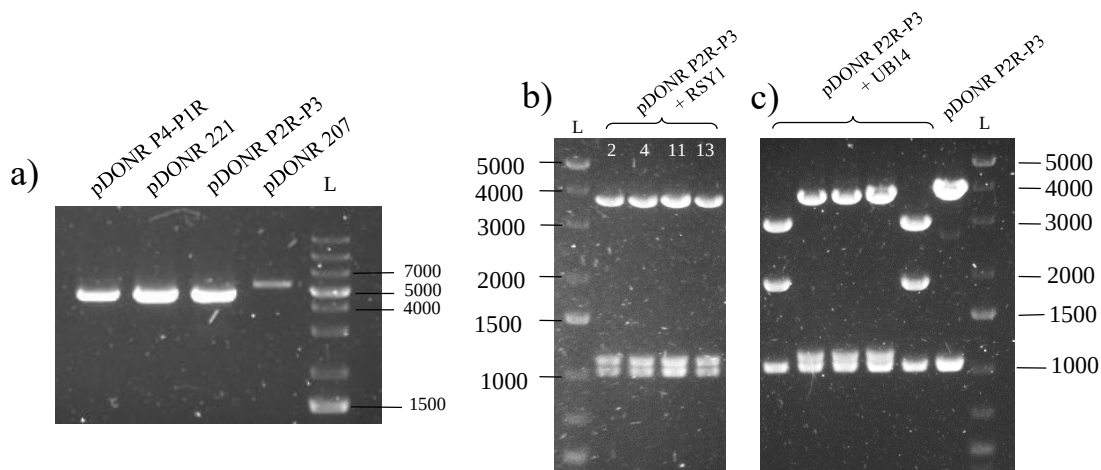
4.1.2 Sekvenovanie PCR produktov, klonovanie a *in silico* analýza

Po vyhodnotení chromatografu, ktorý zobrazoval výsledok sekvenovania PCR produktu pomocou primeru Seq_MMK3_gRNA_F1 z oblasti exónu 1 a 2 pochádzajúceho z rastliny RSY1 (Obr. 15b) bolo následne pristúpené k *in silico* analýze rôznych dostupných sekvencií *MMK3* génu v databáze Alfalfatoolbox (URL 8). Boli identifikované 4 rôzne sekvencie (RSY96, RSY143, RSY243 a RSY74), ktoré boli podrobené prirovnaniu pomocou ClustalW (URL 2) a vykazovali niekoľko odlišností v nekódujúcej sekvencii (časť porovnania dostupná v prílohe 9.2.1). Oblasť identifikovaná ako zdroj zdvojených píkov zodpovedala oblasti v promótorovej oblasti (Obr. 15c), čo je navyše doložené manuálnym doplnením odčítania sekundárnych píkov, ktoré odpovedali druhej promótorovej sekvencii s 10 nt deléciou (Obr. 15d).



Obr. 15. Zobrazenie postupu identifikácie príčiny prítomnosti zdvojených pík. a) všeobecná schéma génu *MMK3* a použitých primerov. b) výsledok Sangerovho sekvenovania PCR produktu z oblasti promótoru a prvých dvoch exónov. c) ClustalW prirovnanie dvoch odlišných promótorových sekvencií génu *MMK3*. d) Manuálne odčítanie sekundárnych pík zapríčinené deléciou a potvrdzujúce prítomnosť druhej odlišnej alely. e) Chromatograf zobrazujúci osekvenovanú alelu RSY96. f) Chromatograf zobrazujúci osekvenovanú alelu RSY143.

Pre jednoznačné určenie prítomnosti dvoch rôznych alel a potvrdenie, že sa jedná o spomínané sekvencie boli PCR produkty klonované pomocou restriktčného klonovania do plazmidu pDONR P2RP3 (Obr. 16). Obdržané pozitívne plazmidy boli náhodným výberom v počte 9 plazmidov sekvenované. Následná analýza chromatografu potvrdila prítomnosť viacerých alel v podobe chromatografu s jednoznačnými píkmi (Obr. 15e, f).



Obr. 16: Elektroforeogramy zobrazujúce postup klonovania. a) Overenie linearizovaných vektorov pomocou restriktčnej endonukleázy SmaI. Veľkosti vektorov korešpondovali s *in silico* predikovanými fragmentami (4777 bp, 4761 bp, 4773 bp, 5585 bp). b) Výsledok restriktčného štiepenia enzýmom PvuII. Veľkosti a počet fragmentov odpovedajú *in silico* predikovaným fragmentom, ktoré v prípade klonovania PCR produktu v smere reverse predstavovali 2917 bp, 1857 bp a 1022 bp a v prípade klonovania v smere forward 2917 bp, 1108 bp a 1022 bp. Separácia prebiehala v 1% agarózovom géli počas 45 minút (a) a 80 minút (b, c).

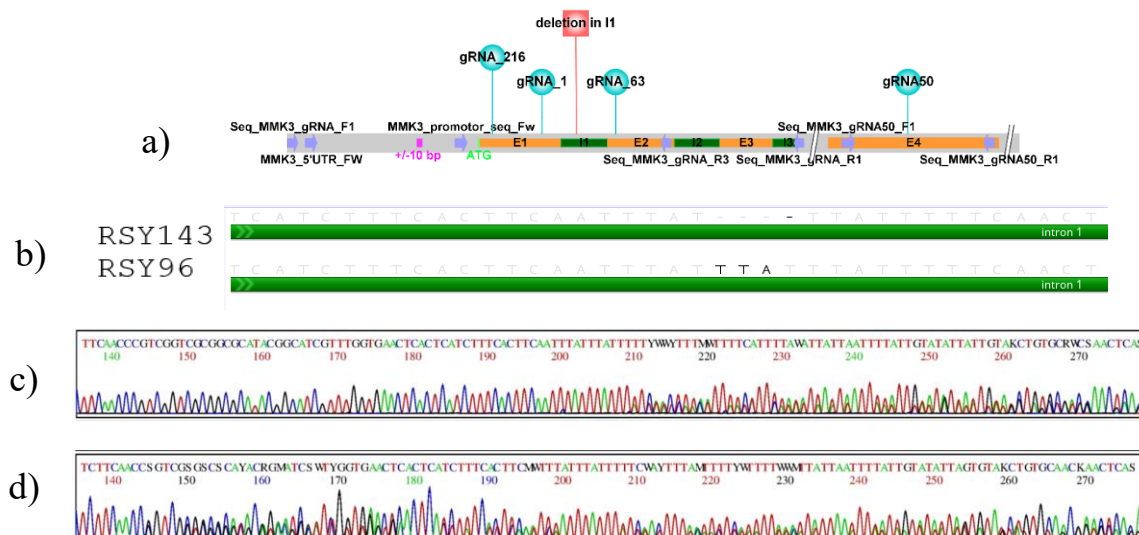
4.1.3 Sekvenovanie PCR produktov

Na základe doterajších výsledkov bola zvolená stratégia sekvenovania PCR produktov od primeru MMK3_promotor_seq_Fw umiestneného za oblasťou delécie (Obr. 17a), nakoľko *in silico* analýza nenaznačovala prítomnosť iných delécií medzi už potvrdenou a oblasťami záujmu kde cieľili gRNA. Tento primer bol použitý pre sekvenovanie všetkých PCR produktov zahŕňajúcich promótor a prvé dva exóny pochádzajúcich z potenciálne mutantných CRISPR-KO línii (UB2-15).

Stratégia sekvenovania bola inšpirovaná prirodzene sa vyskytujúcimi deléciami, ktoré boli zodpovedné za tvorbu zdvojených pík. Tento jav by mal nastať aj v prípade vytvorenia inzercie/delécie (indel) pomocou nehomologického spájania koncov v dôsledku opravy poškodeného DNA vplyvom cieľenej endonukleázy Cas9.

Týmto spôsobom prebehol „screening“ rastlín pre oblasť gRNA_216 a gRNA_1 a pre ďalšiu analýzu boli zvolené len tie rastliny, ktoré vykazovali prítomnosť zdvojených pík od miesta, kde gRNA cieľila endonukleázu Cas9. Touto metódou bola identifikovaná jedna rastlina (UB15), ktorá vykazovala prítomnosť zdvojených pík už v 146 nt Sangerovho sekvenovania (Obr. 17d), čo odpovedalo oblasti gRNA_1 na konci prvého exónu. Oproti tomu sa v rastlinách ktoré zodpovedali divokému typu objavili zdvojené píky až v oblasti 210 nt (Obr. 17c), čo zodpovedalo delícii v intróne 1 predpovedanej aj pomocou *in silico* analýzy (Obr. 17b).

Touto stratégiou boli sekvenované PCR produkty aj pomocou primeru Seq_MMK3_gRNA_R3 za účelom osekvenovania oblasti za deléciou v intróne 1 kde cieľila gRNA_63 (exón 2). V tomto prípade sa neobjavili žiadne zdvojené píky, žiadna z rastlín nevykazovala znaky prítomnej inzercie či delécie a ďalej táto oblasť nebola analyzovaná. Rovnaký prípad nastal v prípade štvrtého exónu, ktorý bol sekvenovaný pomocou primeru Seq_MMK3_gRNA50_F1, kedy sa neobjavili žiadne zdvojené píky a tieto oblasti tak neboli predmetom ďalšej analýzy.

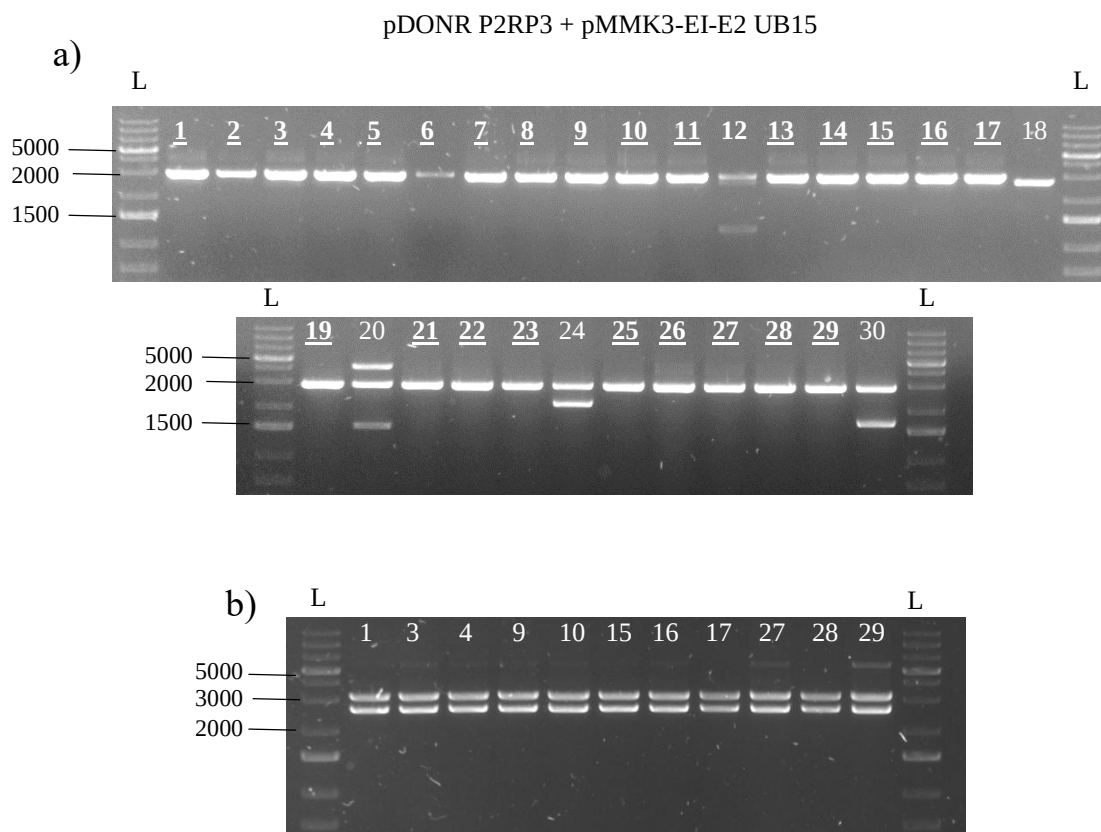


Obr. 17: Zobrazenie postupu „screeningu“ jednotlivých rastlín *M. sativa*. A) všeobecná schéma génu *MMK3* a použitých primerov. b) porovnanie oblastí intrónu 1 pochádzajúcich z dvoch rôznych alel pomocou programu GeniusPrime. c) Chromatograf zobrazujúci osekvenovanú oblasť exónu 2 a intrónu 1 rastliny UB2. d) Chromatograf zobrazujúci osekvenovanú oblasť exónu 2 a intrónu 1 rastliny UB15.

4.1.4 Klonovanie PCR produktov a validácia CRISPR-KO línie

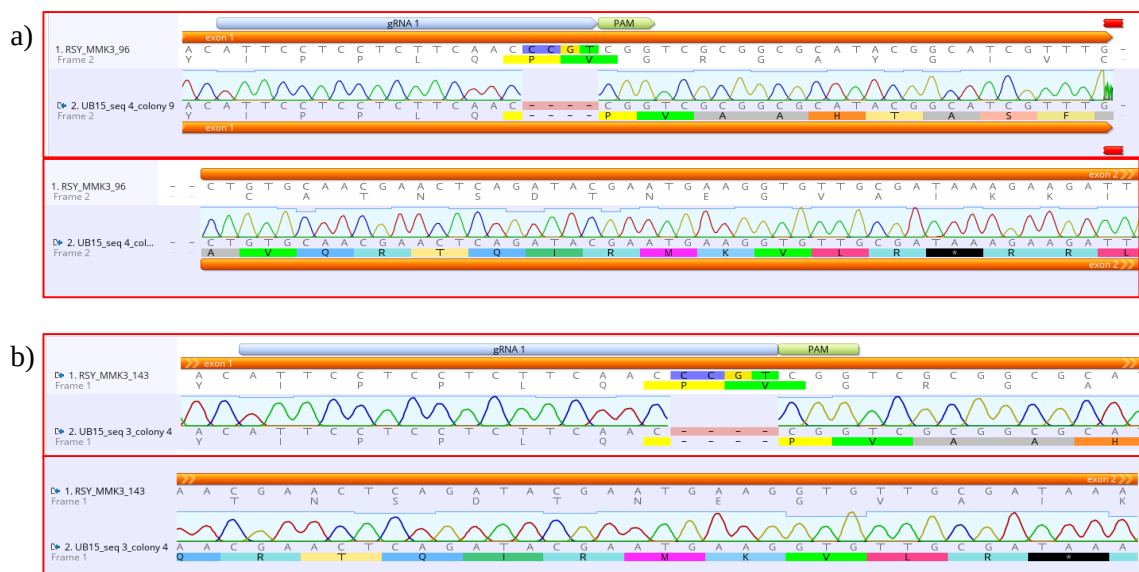
PCR produkt rastliny UB15 obsahujúci oblasť od promótora až po začiatok intrónu 3 bol klonovaný pomocou restriktčného klonovania enzýmom *Sma*I do vektoru pDONR P2RP3 tak ako produkty RSY. Na obrázku 18 je zobrazená restriktčná analýza obdržaných klonov (Obr. 18a). Pre nejednoznačnosť separácie daných fragmentov boli určité plazmidy štiepené opäť inou restriktčnou endonukleázou a validované (obr. 18b).

Plazmidy pri ktorých sa overilo správne zaklonovanie PCR produktu boli následne podrobené Sangerovmu sekvenovaniu a k jednotlivým výsledkom sa pristupovalo ako ku chromatografom jednotlivých alel.



Obr. 18: Elektroforeogramy priebehu restričného štiepenia a overenia správnosti klonovania. a) Štiepenie enzýmom PstI. Potenciálne pozitívne klony zhodujúce sa s *in silico* predikciou fragmentov o veľkosti 2923 bp a 2873 bp v prípade zaklonovania v oboch smeroch boli označené hrubým a podčiarknutým číslom. b) Dodatočné overenie restričnou endonukleázou NdeI, ktorá na základe *in silico* predikcii produkovala fragmenty o veľkosti 3178 bp a 2618 bp vo všetkých dodatočne overovaných plazmidoch. Separácia prebiehala v 1% agarózovom géli počas 40 (a) a 50 minút (b).

Porovnanie jednotlivých výsledkov zo sekvenácií, ich priradenie k jednotlivým alelám, následné vyhodnotenie prítomnosti inzercie či delécie a prítomnosť potenciálneho predčasného STOP kodónu boli vyhodnotené pomocou programu Genious. V tomto programe boli na základe SNP (z angl. „single nucleotide polymorphism“) polymorfizmov priradené jednotlivé klony a ich sekvenácie k jednotlivým alelám. V prípade dvoch rôznych alel došlo k posunu čítacieho rámca a bola zistená delécia o 4 nukleotidoch v oblasti exónu 1, konkrétne v oblasti gRNA1. Táto delécia bola prítomná v alele označovej podľa databázy ako číslo 96 a 143 a v oboch prípadoch vyústila do tvorby predčasného STOP kodónu v oblasti exónu 2 (obr. 19).



Obr.19: Vyhodnotenie posunu čítacieho rámca v programe Genious a identifikácie dvoch delécii v dvoch rôznych alelách.

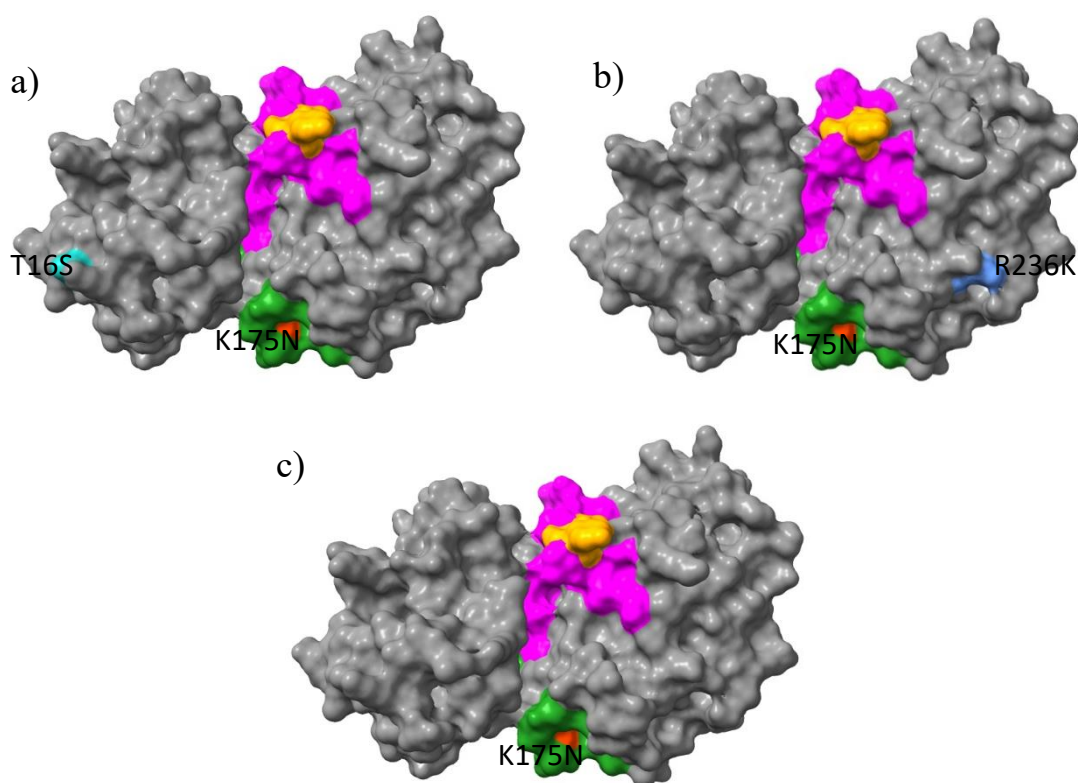
4.2 *In silico* analýza dostupných sekvencií *MMK3*

Jednotlivé dostupné sekvencie génu *MMK3* v databáze Alfalfatoolbox boli porovnávané medzi sebou a zároveň boli porovnané voči sekvencii dostupnej v databáze NCBI. Ich odlišnosť je zhrnutá v tabuľke 23.

Vzhľadom na prítomnosť jednoaminokyselinových substitúcií v produktoch jednotlivých alel boli následne tieto aminokyselinové sekvencie analyzované pomocou funkcie „ConservedDomainSearch“ dostupnej v databáze NCBI (URL 4). Táto funkcia predikovala prítomnosť funkčných miest a jednotlivé aminokyseliny, ktoré tieto funkčné miesta tvorili. V prípade ATP väzobného miesta a proteín viažuceho miesta nenastala žiadna zmena vplyvom substitúcií. Zmena, ktorá sa týkala aj funkčného miesta nastala v prípade 175N, kedy sa táto aminokyselina nachádzala v mieste zodpovedného za interakciu s kinázami (z angl. „kinase interacting motif“, „KIM“ motív) namiesto pôvodného lyzínu. Táto zmena bola prítomná vo všetkých sekvenciách porovnávaných voči sekvencii z NCBI. Ďalej bola detegovaná zmena v blízkosti tohto miesta a to konkrétne na mieste 236 zmenou arginínu za lysín v sekvenciách 143 a 96. V sekvencii 74 sa vyskytla ešte jedna zmena na pozícii 16, kde bol substituovaný tyrozín za serín. Prehľad pozície jednotlivých zmien a ich vzťahu k funkčným miestam je zobrazený na obrázku 20. Modely použité pre vizualizáciu boli vytvorené pomocou SwissModel na portáli ExPASy a ako templát bola zvolená sekvencia génu *MPK12* z *Gossypium hirsutum* dostupná v databáze Alphaphold pod označením A0A0A7R545.1.A (Obr. 20).

Tab. 23: prehľad jednotlivých rozdielov v DNA a proteínových sekvenciách medzi jednotlivými alelami a ich proteínovými produktami

alela	% GC promótor	%GC CDS	Aminokyselinová substitúcia (pozícia:NCBI>AlfaToolbox)
RSY_74	35,52	41,16	16:T>S;175:K>N
RSY_96	35,05	40,8	175:K>N;236:R>K
RSY_143	33,82	40,8	175:K>N;236:R>K
RSY_243	35,18	41,07	175:K>N



Obr. 20: Modely zobrazujúce aminokyselinové substitúcie v jednotlivých sekvenciách a ich vzťah k funkčným miestam proteínu porovnaných voči sekvencii dostupnej v databáze NCBI. a) RSY_74, b) RSY_96/RSY_143, c) RSY_243. Zelená – KIM motív, ružová – aktivačná smyčka, oranžová – TEY motív.

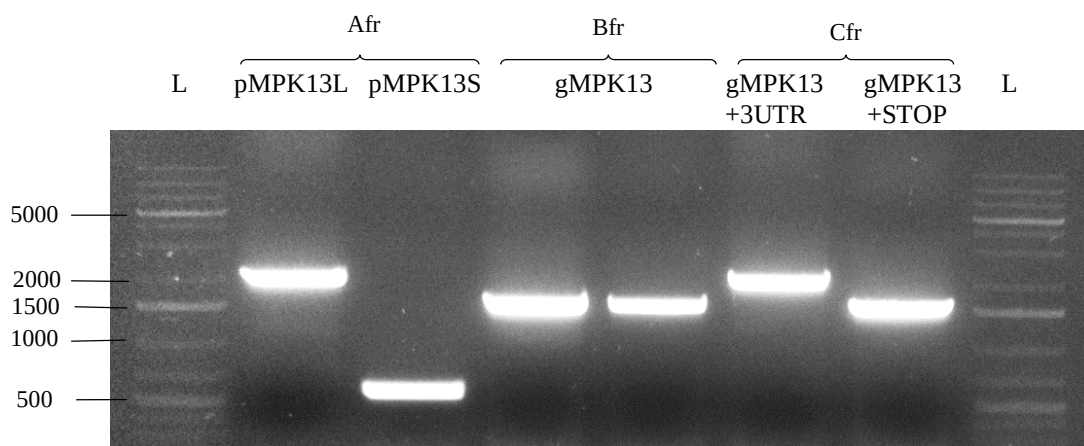
4.3 Klonovanie proteínu MPK13 vo fúzii s fluorescenčným proteínom

4.3.1 Klonovanie konštruktov pre trojkomponentnú reakciu

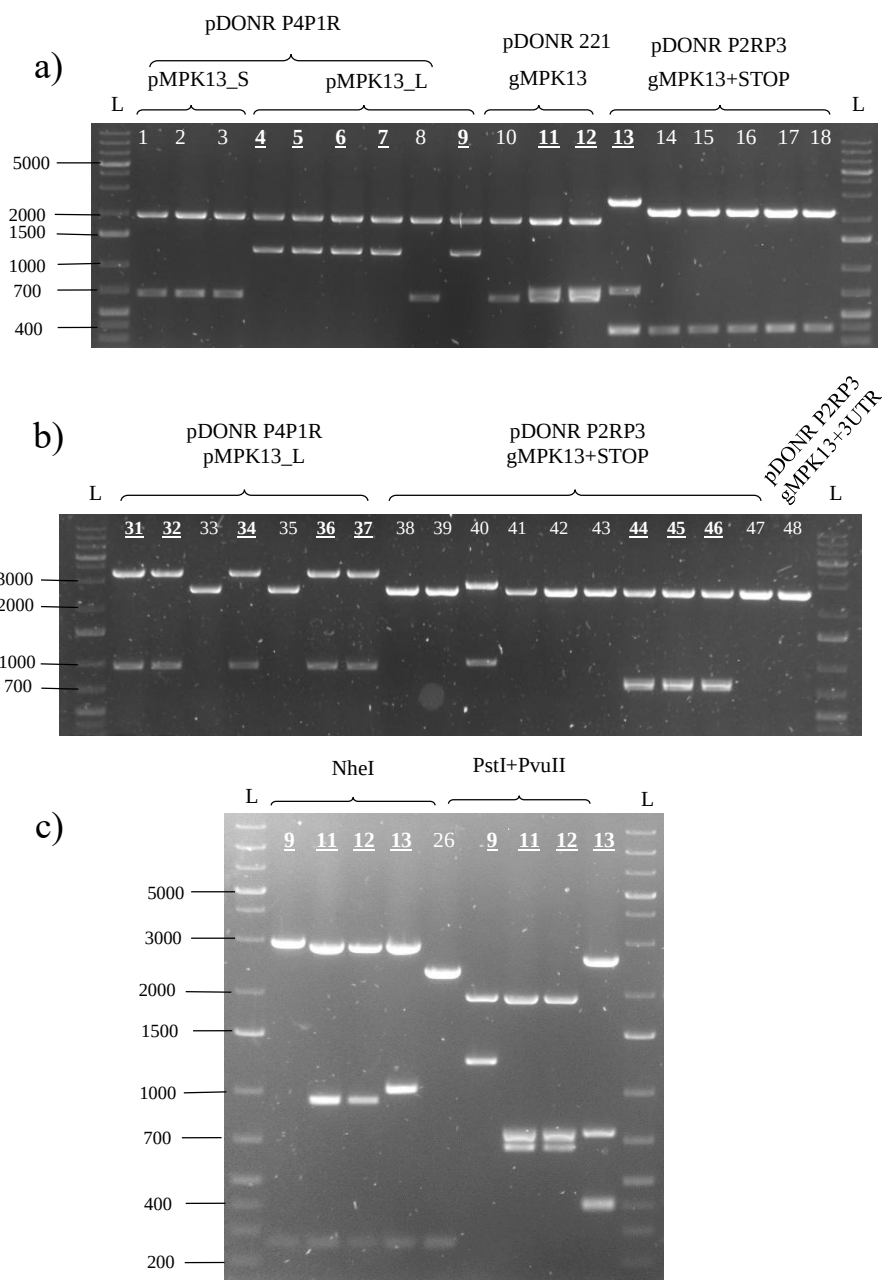
Za účelom prípravy konštruktu pod kontrolou natívneho promótorom génu *MPK13* bol zvolený postup trojkomponentového klonovania technológie Gateway. Pripravené PCR produkty so zavedenými *att* rekombinačnými sekvenciami charakteristickými pre jednotlivé fragmenty sú vizualizované na obrázku č. 21.

Pripravené boli vstupné klony tak, aby bolo možné gén klonovať nielen v N ale aj C terminálnej fúzii. V prípade N-terminálnej fúzie bola snaha vytvoriť klony nesúce jednak STOP kodón, ale aj klon s 3'UTR oblasťou pre zvýšenie stability konštruktu. PCR produkt pre túto rekombinačnú reakciu bol vytvorený avšak BP reakcia bola aj po niekoľkých pokusoch neúspešná. Vzhľadom na krátku anotáciu promótoru v databáze TAIR (URL 6) boli zvolené aj dve varianty natívneho promótoru, čo sa dĺžky týka, pričom kratšia odpovedá priamej anotácii a dlhšia bola predĺžená a neanotovanú oblasť pred génom.

Po selekcii kolónii na tuhom LB médiu prebehla izolácia pDNA a overenie správnosti klonovania pomocou restričných endonukleáz. Výsledok je možné vidieť na obrázku č. 22a) a 22yb) kde sú pozitívne klony vyznačené hrubým a podčiarknutým číslom. Nejasné výsledky boli následne validované dodatočným štiepením (Obr. 22c).



Obr. 21: Elektroforeogram zachytávajúci separované PCR produkty obsahujúce *att* sekvencie. Separácia v prostredí 1% agarózového gélu, 40 minút.



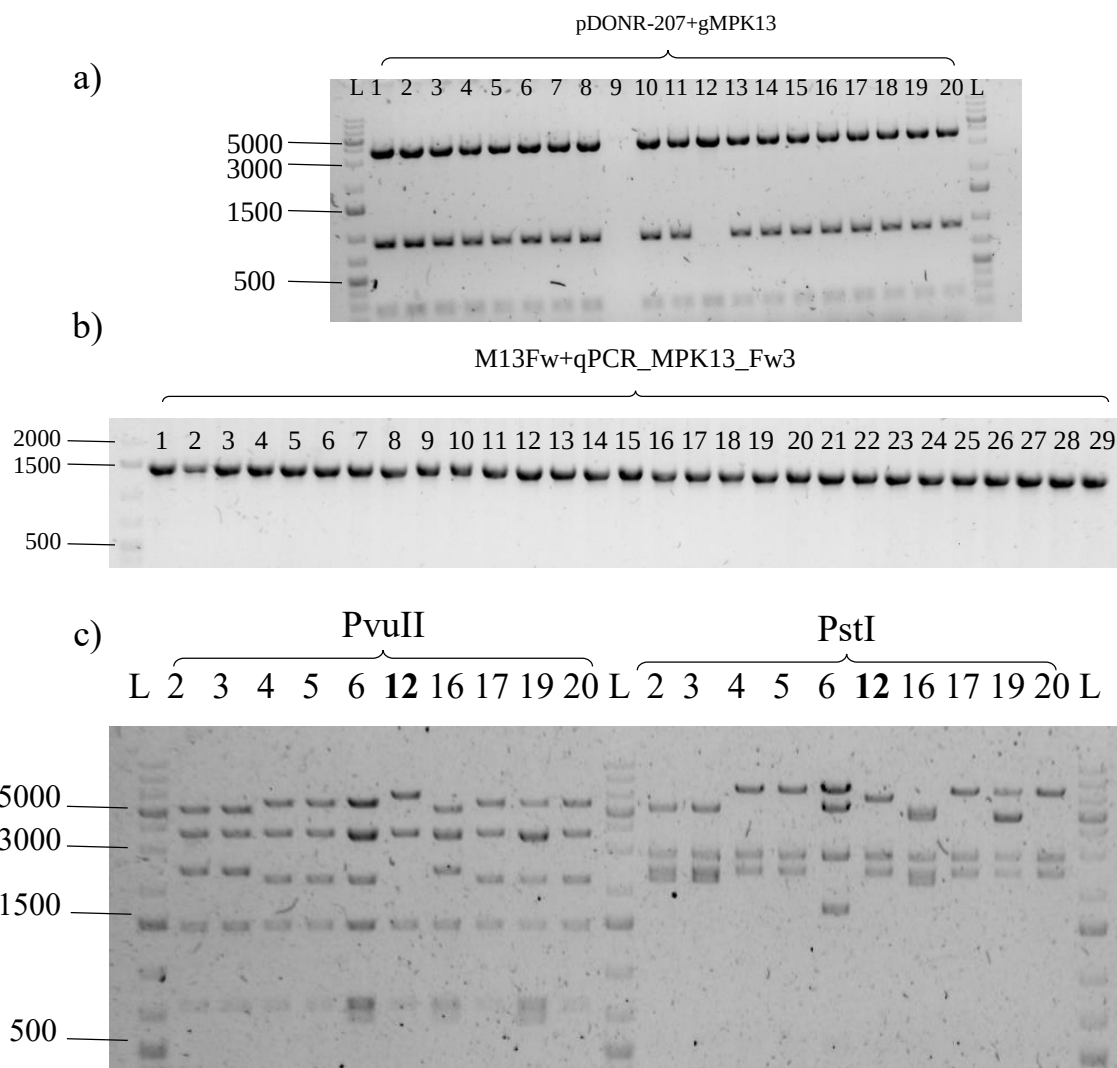
Obr. 22: Elektroforeogramy zachytávajúce restričné štiepenie vstupných klonov za účelom overenia. a) Restričné štiepenie enzýmami PstI a PvuII súčasne. Vzorky označené ako pozitívne spĺňajú *in silico* predikciu veľkosti fragmentov o 1945 bp a 1240 bp v prípade pMPK13_S. Separácia 50 min. b) Restričná analýza enzýmom PstI v prípade pMPK13_L, preukazujúca čiastočnú zhodu s *in silico* predikciou fragmentov o veľkosti 3504 bp, 962 bp, 192 bp. Vzorky gMPK13+STOP boli štiepené enzýmom PvuII a vyznačené vzorky zodpovedali *in silico* predikcii fragmentov o veľkosti 2619 bp, 799 bp a 744 bp. Separácia 50 min. c) Dodatočná analýza enzýmom NheI preukazujúca správnosť daných vzoriek. Veľkosť fragmentov zodpovedala *in silico* predikcii: 4392 bp, 266 bp v prípade pMPK13_L; 2854 bp, 944 bp, 266 bp v prípade gMPK13_pDONR 221 a 2873 bp, 1023 bp, 266 bp v prípade gMPK13+STOP. Dlhšia separácia zabezpečila aj oddelenie fragmentov z časti a). Separácia 80 min. Separácia prebiehala vždy v prostredí 1% agarózového gélu.

Pripravené vstupné klony boli overené Sangerovým sekvenovaním pričom sa potvrdila ich správnosť.

4.3.2 Klonovanie konštrukt pre 1 komponentnú reakciu

Vzhľadom na neuspokojivé výsledky počas priebehu klonovania pomocou LR reakcie 3 komponentovej reakcie bol zvolený prístup klonovania skrz jednokomponentovú LR reakciu. Pre tento prípad však bolo potreba preklonovať vstupný klon do vektoru s odlišnou selekciou nakoľko pôvodný vstupný klon mal rovnaký mechanizmus rezistencie ako destinačný vektor.

Za týmto účelom bol vytvorený vstupný klon s gMPK13 v pDONR P207 s rezistenciou na gentamycin, čo zabezpečilo možnosť klonovať do destinačného vektora s rezistenciou na kanamycin. Takto bol vytvorený konštrukt *pUB10Q::YFP:gMPK13* vo vektore pUBQ10 YFP-GW. Bakteriálne kolónie na Petriho miske boli podrobené „colony-PCR“ analýze (Obr. 23a). Pozitívne kolónie boli následne naočkované a izolovaná pDNA bola overená cez restričné štiepenie (Obr. 23b). Takto pripravený expresný vektor bol následne overený pomocou restričného štiepenia (Obr. 23c) a použitý pre kontrolu funkčnosti elektrokompetentných baktérii *E. coli* pripravených v tejto práci s cieľom zvýšiť efektívnosť transformácie 3 komponentovej LR reakcie. Konštrukt bol úspešne transformovaný týmto spôsobom do *E. coli* a následne do *A. tumefaciens*.

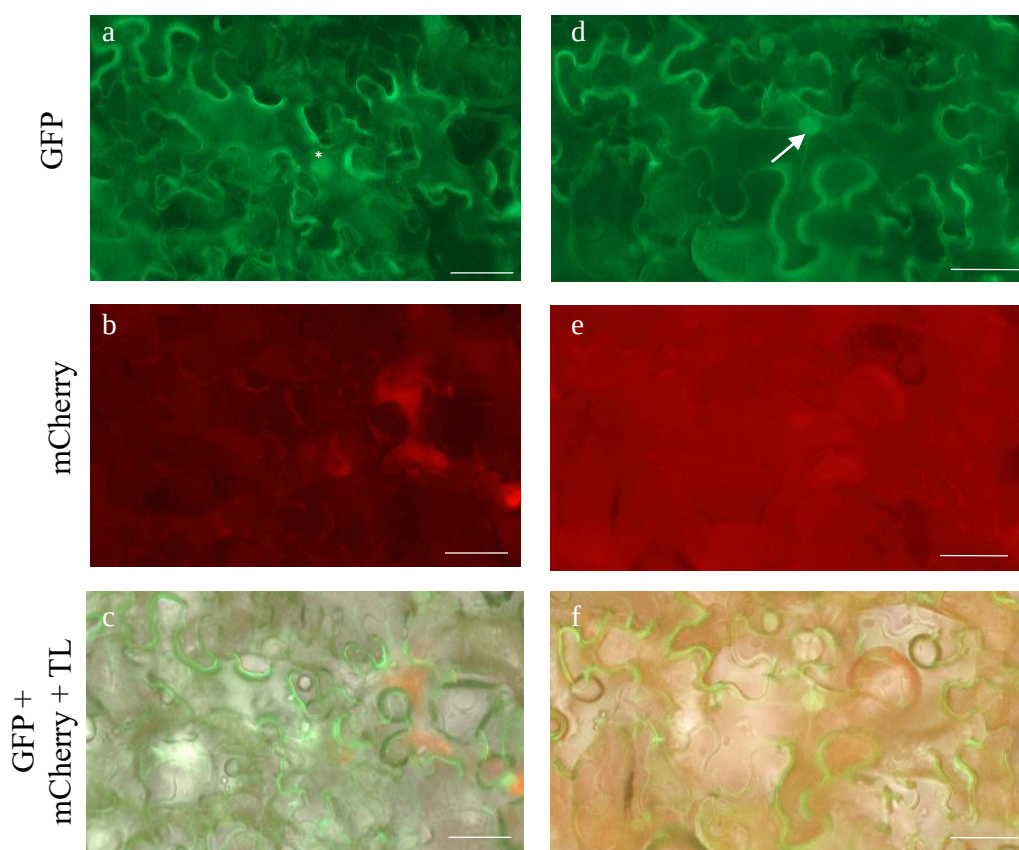


Obr. 23: Elektroforeogramy zachytávajúce jednotlivé kroky klonovania a prípravy expresného vektoru. a) Restričná analýza vstupných klonov potvrdzujúca správnosť klonovania vo väčšine izolovaných plazmidov. Fragmenty vzniknuté štiepením endonukleázou *NheI* odpovedajú predikovaným o veľkosti 3723 bp, 901 bp, 266 bp. Separácia 45 minút. b) PCR kolónii identifikujúca pozitívne kolónie nesúce gén MPK13 v destinačnom vektore. Separácia 45 minút. c) Restričná analýza potvrdzujúca správnosť klonovania v prípade vzorky č. 12. V prípade štiepenia enzýmom *PvuII* fragmenty odpovedajú veľkosti 6841 bp, 3722 bp, 1562 bp, 744. V prípade *PstI* dochádza k čiastočnej zhode oproti predikcii 6886 bp, 2835 bp, 2601 bp, 547 bp. Separácia prebiehala v 1% agarózovom géli. Inverzia elektroforeogramu použitá za účelom lepšieho zobrazenia.

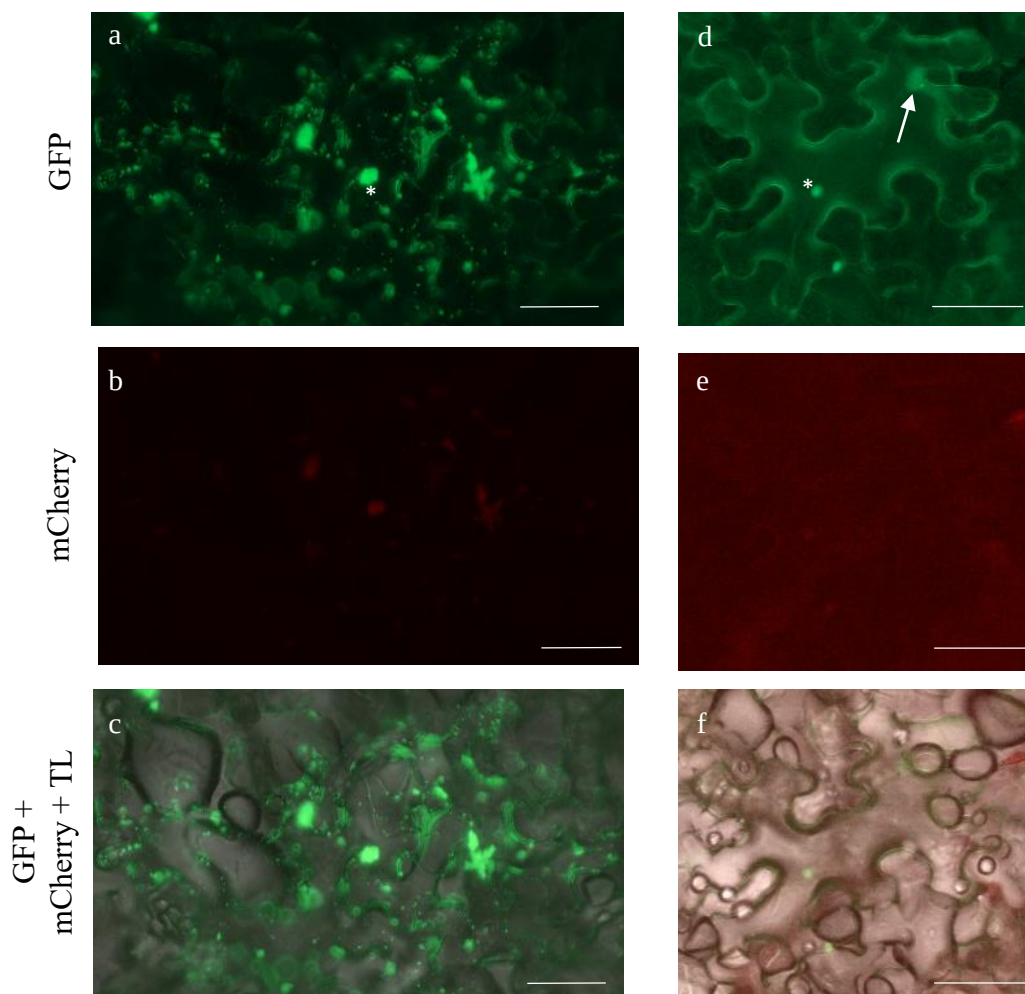
4.3.3 Overenie expresie konštrukt v listoch *N. benthamiana*

Pre overenie expresie pripraveného konštrukt bola využitá metóda tranzientnej transformácie listov *N. benthamiana* baktériou *A. tumefaciens* nesúcej overovaný konštrukt (pUBQ10:YFP-GW obsahujúci *AtUBQ10::YFP:gMPK13*).

Fluorescenčný signál pozorovaný na tretí deň od transformácie bol prítomný v jadre a cytoplazme (obr. 24), no zároveň sa v cytoplazme objavovali štruktúry neznámeho pôvodu vykazujúce silný fluorescenčný signál, ktoré v niektorých prípadoch vykazovali prekryv s červený fluorescenčným kanálom a v niektorých prípadoch bol signál prítomný výhradne z kanáli zelenom (obr. 25).



Obr. 24: Snímky z epifluorescenčného mikroskopu, transformovaných buniek listov *N. benthamiana* pomocou baktérie *A. tumefaciens* nesúcej konštrukt fluorescenčného MPK13 proteínu (*AtUBQ10::YFP:gMPK13*) tretí deň po transformácii (3DAT). a-c – kolónia č. 1, d-f – kolónia č. 4. Šípka označuje jadro, * označuje jadierko s chýbajúcim signálom. Mierka odpovedá 50 μ m. Fotografie boli vďaka prekrývajúcim sa excitačným spektrám GFP a YFP vyhotovené v kanále GFP dostupnom pomocou mikroskopu Axio Imager.M2 s objektívom LD Plan-Neofluar 20x.



Obr. 25: Snímky z epifluorescenčného mikroskopu transformovaných buniek listov *N. benthamiana* pomocou baktérie *A. tumefaciens* nesúcej konštrukt fluorescenčného MPK13 proteínu (*AtUBQ10::YFP:gMPK13*) tretí deň po transformácii (3DAT). a-c – kolónia č. 2, d-f – kolónia č. 3. Šípka označuje jadro, * označuje intenzívne „spoty“ vytvárajúce sa v cytoplazme. Mierka odpovedá 50 μ m. Fotografie boli vďaka prekryvajúcim sa excitačným spektrám GFP a YFP vyhotovené v kanále GFP dostupnom pomocou mikroskopu Axio Imager.M2 s objektívom LD Plan-Neofluar 20x.

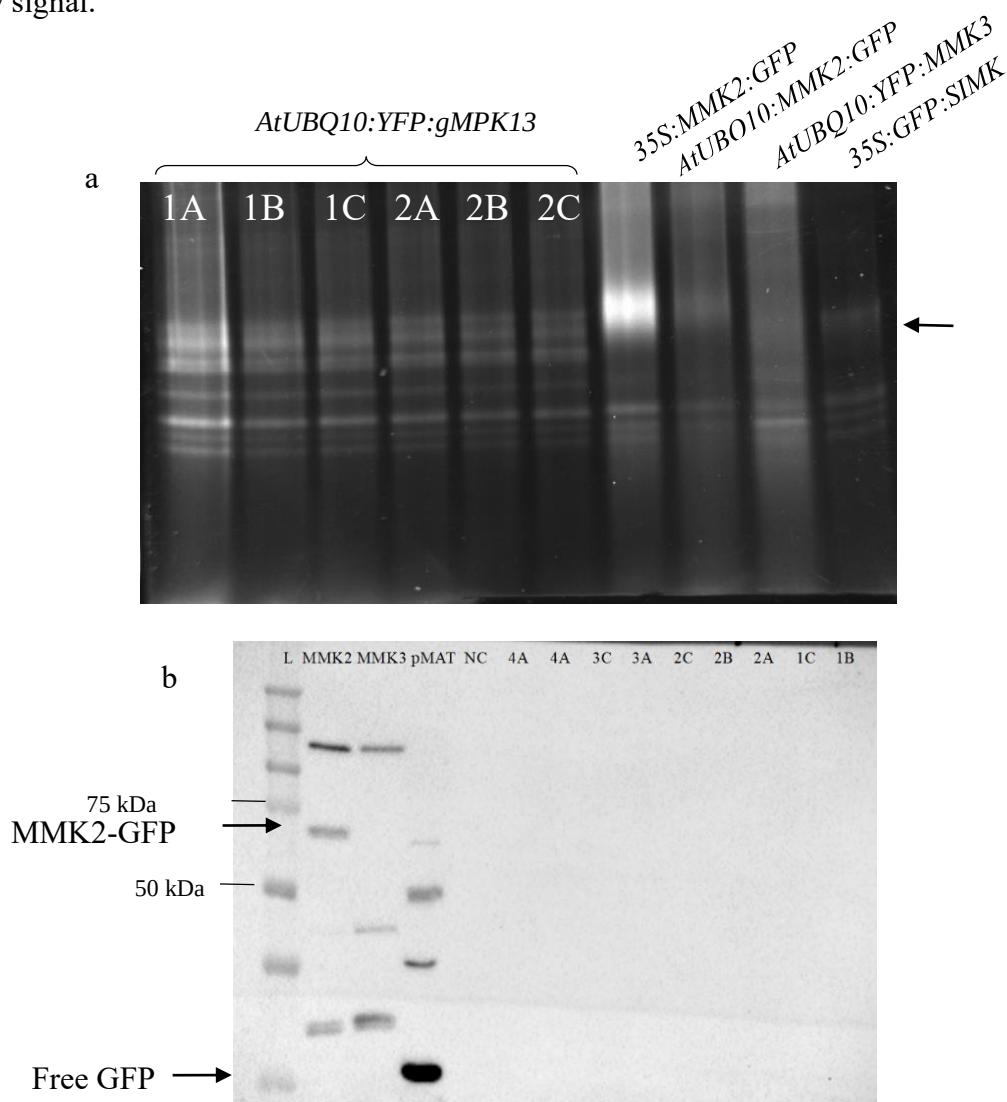
4.3.4 Detekcia fúzneho proteínu YFP-MPK13

Pre potvrdenie fúzie fluorescenčného proteínu s proteínom záujmu boli využité metódy natívnej elektroforézy a western blotu pre imunodetekciu.

V prvom kroku bol pomocou metódy natívnej elektroforézy overený fluorescenčný signál prítomný v géli, ktorý slúžil ako indikátor prítomnosti fluorescenčného proteínu. Pre účely kontroly boli využité stabilne transformované línie *M. sativa* dostupné v laboratóriu. Na obrázku 26a je výsledok overenia prvých dvoch biologických replík v troch technických replikách. Zostávajúce biologické repliky boli taktiež vyhotovené v troch technických replikách a zaznamenané výsledky sa zhodovali s výsledkami na

obrázku č. 26a. Záznam gélu bol vyhotovený pomocou ChemiDoc™ MP Imaging System a funkciou ProQ Emerald 488.

V druhom kroku sa pokračovalo s imunodetekciou pomocou anti-GFP protilátky. Na obrázku 26b je možné vidieť prítomný signál len v prípade kontroly pochádzajúcej zo stabilne transformovanej línie *M. sativa* (MMK2-GFP) a pMAT línie *A. thaliana* exprimujúcej voľné GFP (obe línie dostupné v laboratóriu). V prípade vzoriek pochádzajúcich z tranzientne transformovaných listov *N. benthamiana* nebol pozorovaný žiadny signál.

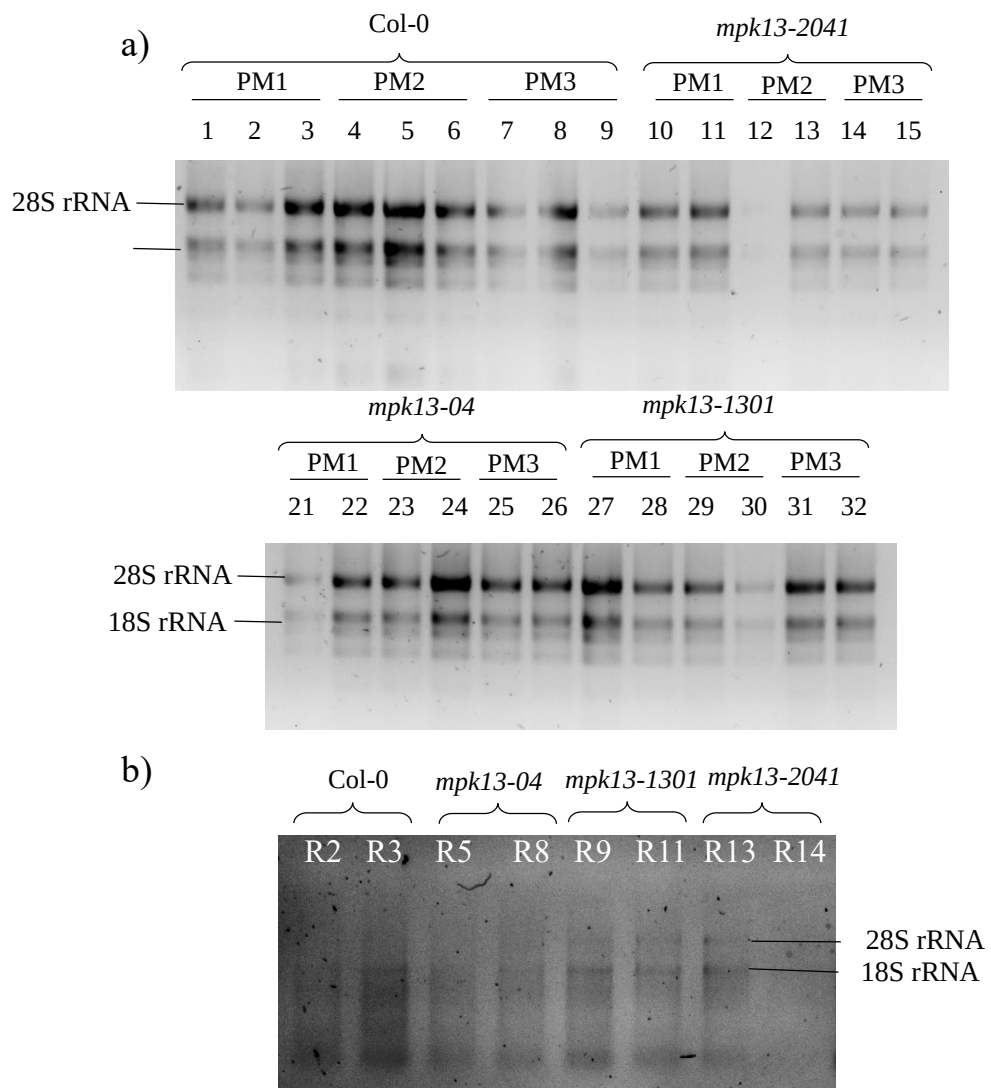


Obr. 26: a) Polyakrylamidový gél využitý pre separáciu proteínov v natívnych podmienkach a detekcia fluorescenčného signálu fúzných proteínov pri vlnovej dĺžke 488 nm. Ako kontrola boli využité vzorky pochádzajúce zo stabilne transformovaných línií rastlín *M. sativa*. b) Imunodetekcia fúzných proteínov YFP-MPK13 pochádzajúcich z tranzientne transformovaných listov *N. benthamiana*. Ako kontrola boli využité vzorky pochádzajúce zo stabilne transformovaných línií rastlín *M. sativa* a voľné GFP izolované z línie pMAT. L značí štandard Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards označujúci jednotlivé molekulové hmotnosti, NC značí negatívnu kontrolu, neinfiltrované listy *N. benthamiana*.

4.4 Transkripčná analýza mutantných línií *mpk13*

4.4.1 Izolácia mRNA

Izolácia RNA prebehla samostatne z nadzemnej (Obr. 27a) a podzemnej časti (Obr. 27b) 14 dňových semenáčikov *A. thaliana* genotypu Col-0 a *mpk13* mutantných línií. Následne prebehla kontrola integrity izolovanej RNA pomocou agarózovej gélovej elektroforézy za účelom selekcie vhodných vzoriek pre prepis mRNA do cDNA (Obr. 27).

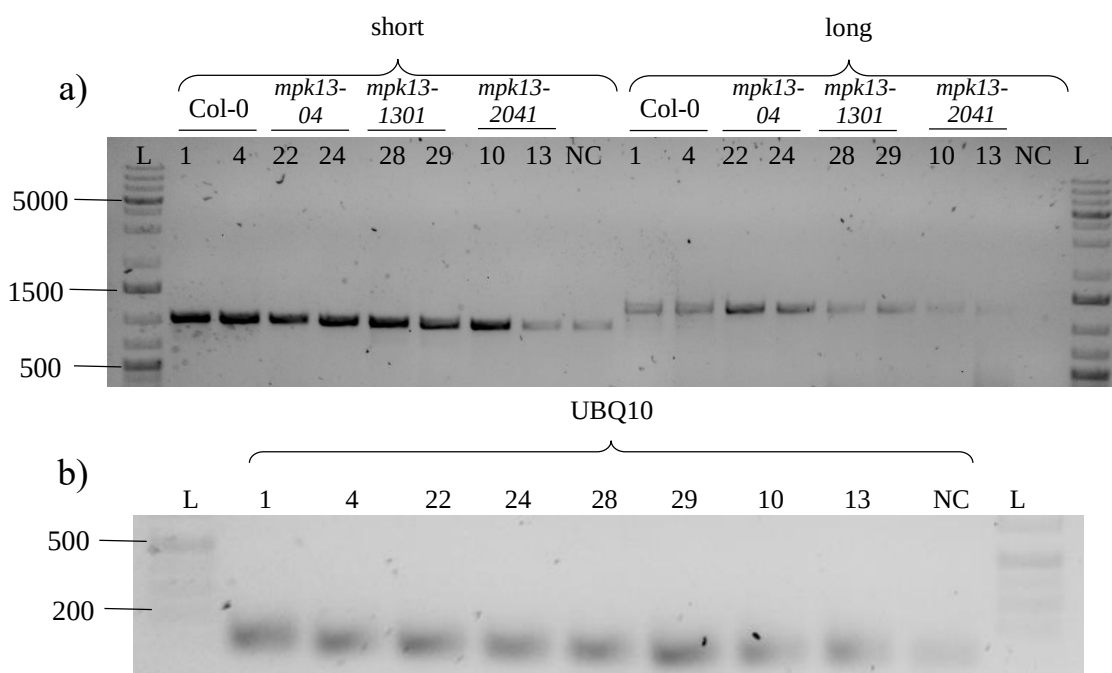


Obr. 27: Elektroforeogramy znázorňujúce integritu izolovanej RNA z nadzemných (a) a podzemných častí (b). Na fotkách je vyznačená rRNA vyskytujúca sa vo veľkej (28S) a malej (18S) podjednotke. Na základe tohto vzoru typického pre RNA boli vzorky vyhodnotené ako vhodné pre ďalšie kroky experimentu. Separácia v 1% agarózovom géle počas 60 minút (a) a 40 minút (b). Inverzia elektroforeogramu použitá za účelom lepšieho zobrazenia.

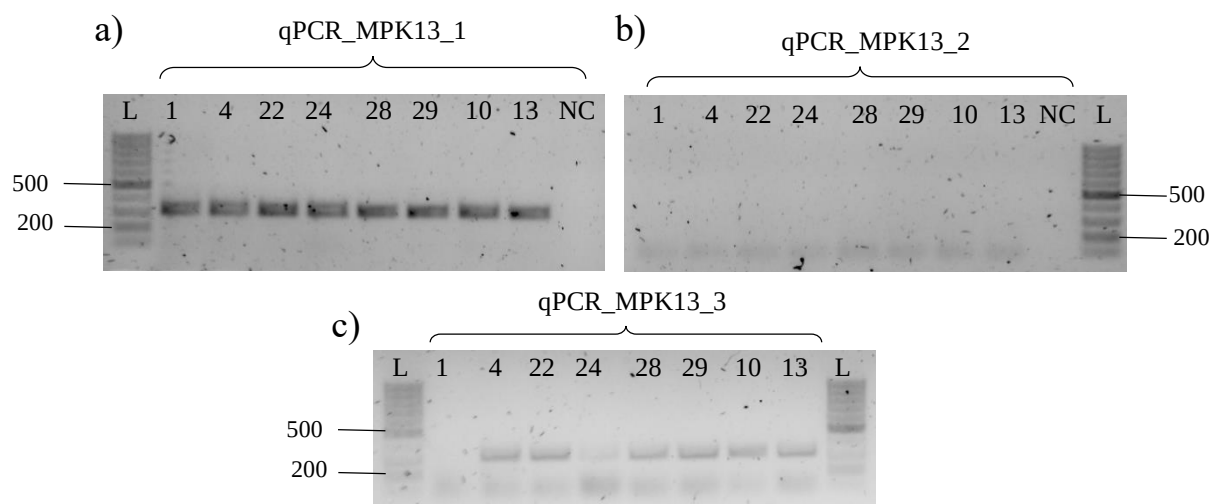
4.4.2 Semi qPCR

Vzhľadom na doteraz publikované výsledky bola vykonaná semi qPCR analýza s cieľom detegovať prítomnosť respektíve neprítomnosť jednotlivých transkriptov aj v mutantných líniah *mpk13*. Použitá bola cDNA pochádzajúca z nadzemných častí. Jednotlivé línie vykazovali prítomnosť transkriptov v oboch prípadoch a to za využitia primer párov cieliacich na dlhú formu transkriptu či krátku formu transkriptu. V prípade primer páru zameraného na dlhú formu transkriptu sa v línii *mpk13-04* vyskytla mierna odchýlka v intenzite PCR produktu oproti ostatným genotypom (Obr. 28a) a preto bola zvolená RT-qPCR analýza hladín transkriptov.

Semi qPCR bola využitá aj s cieľom overiť primery navrhnuté za účelom sledovať hladiny jednotlivých transkriptov génu *MPK13*. Overenie primerov prebehlo pomocou cDNA templátu pochádzajúceho z nadzemných častí a z obrázku 29b je viditeľné, že primer pár 2 bol vylúčený a pre ďalšiu analýzu boli použité primer páry 1 a 3, ktoré poskytli špecifické PCR produkty.



Obr. 28: a) Elektroforeogram zachytávajúci prítomnosť krátkych a dlhých foriem transkriptu vo všetkých vzorkách. b) Gén UBQ10 bol použitý ako kontrola množstva vstupnej DNA do PCR reakcie. Separácia 45 minút v 1% agarózovom géli. Inverzia elektroforeogramu použitá za účelom lepšieho zobrazenia.



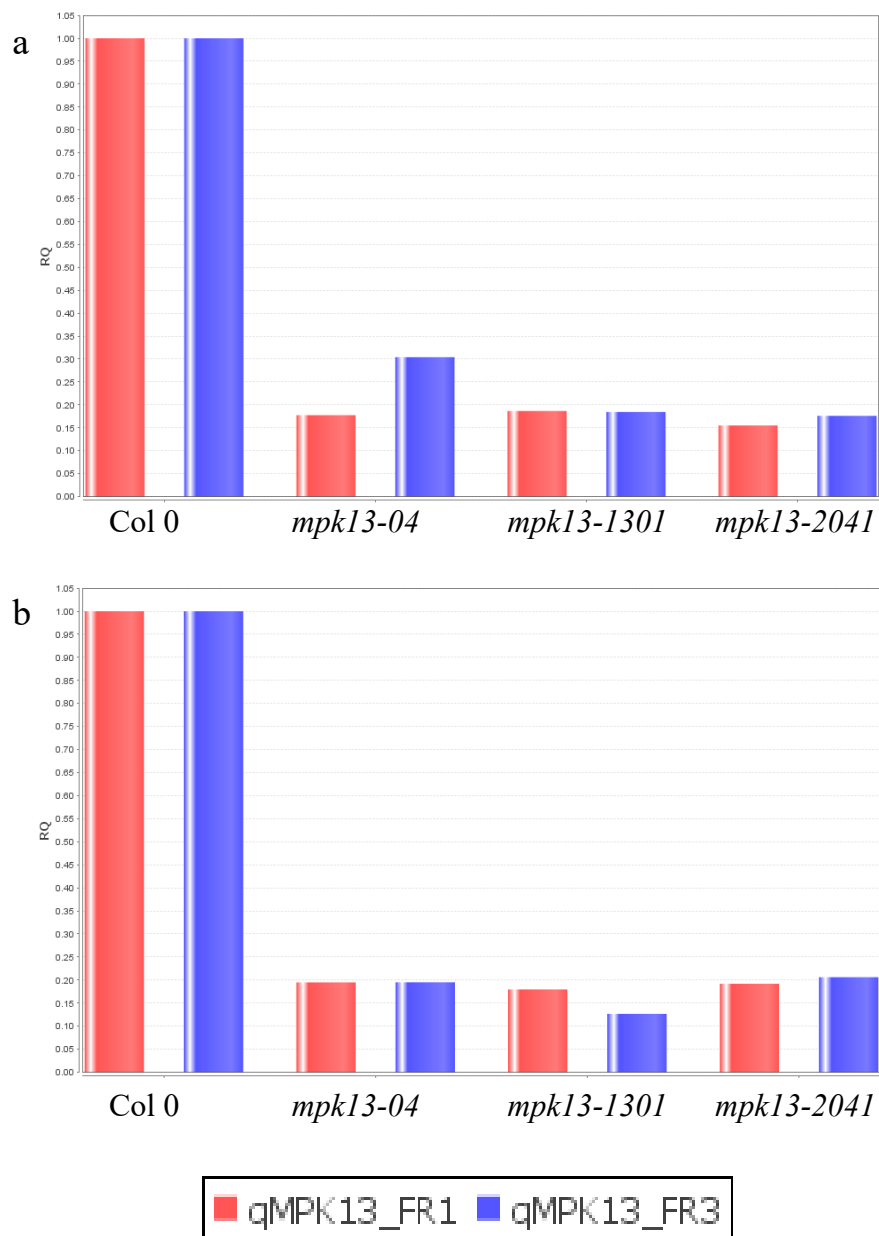
Obr. 29: Elektroforeogram zobrazujúci PCR produkty obdržané za použitia jednotlivých primer párov 1-3 s cieľom selekcie pre ďalšie RT-qPCR analýzy. Separácia 45 minút v 1% agarózovom géli. Inverzia elektroforeogramu použitá za účelom lepšieho zobrazenia.

4.4.3 RT-qPCR

Vzhľadom na prítomnosť transkriptu génu *MPK13* vo všetkých mutantných líniiach a na rôzne hladiny vyplývajúce z výsledkov semi kvantitatívnej PCR bola zvolená metóda RT-qPCR pre stanovenie hladín tohto génu v jednotlivých mutantných líniiach.

Ako prvé boli navrhnuté primery a použitie konkrétnych dvojíc bolo zvolené na základe výsledkov z webovej aplikácie RefFinder a následne bola prepočítaná ich eficiencia.

Pri analýze hladín transkriptov bol rastlinný materiál pri homogenizácii rozdelený na podzemnú a nadzemnú časť. Z jednotlivých častí bola samostatne izolovaná mRNA a následne prebehol prepis do cDNA pre obe časti zvlášť. Samotná analýza prebehla v dvoch biologických (Petriho miska) a dvoch technických replikách (platnička) pričom pri jednom technickom opakovaní vždy došlo k pipetovaniu 3 technických replík. Na obrázku 30 je možné vidieť zaznamenané hladiny z jednotlivých častí (a-nadzemná, b-podzemná). Z grafov možno usúdiť, že transkript je prítomný vo všetkých mutantných líniiach no v zníženej miere. Primer pár FR1 nasadal v prvej časti transkriptu pred miestom alternatívneho zostrihu transkriptu a primer pár FR3 nasadal na mieste nachádzajúce sa za miestom alternatívneho zostrihu.



Obr. 30: Grafy vyjadrujúce relatívne množstvo transkriptu génu *MPK13* v divokom type a jednotlivých mutantných líniách. Dáta boli vyhodnotené softwarom DataAssist.

4.5 Fenotypová analýza mutantných línií *mpk13 A. thaliana*

4.5.1 Fenotypová analýza kvitnutia

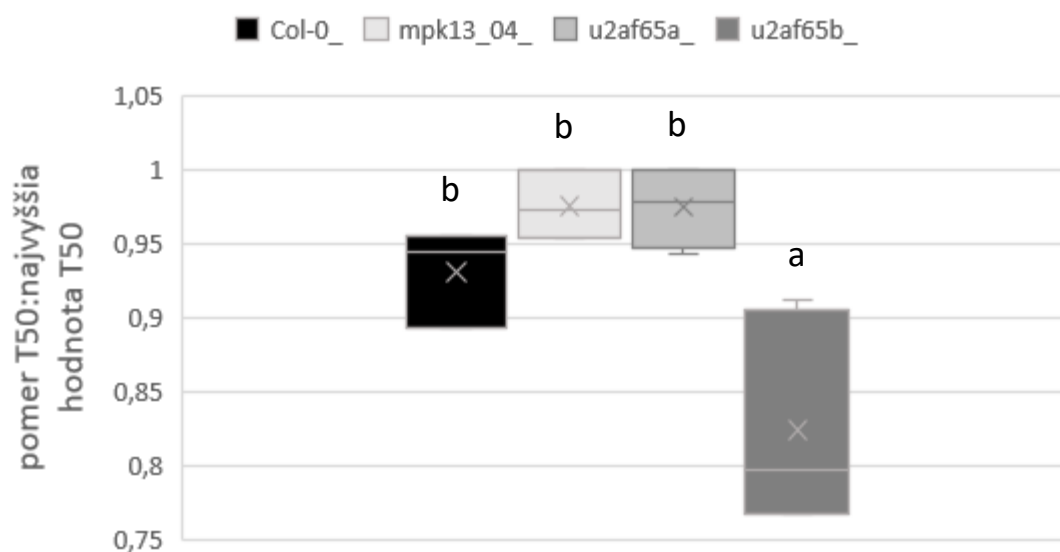
V rámci tejto fenotypovej analýzy boli vyhodnocované dva parametre. Konkrétne sa jednalo o dobu kedy genotyp vykazoval 50% kvitnúcich rastlín a počet listov ružice v dobe kvitnutia (Obr. 31 a 32). Zároveň boli použité mutantné línie *u2af65b_104128*, *u2af65b_055049C*, *u2af65a_144790*, *u2af65a_075828* za účelom kontroly doby kvitnutia, nakoľko pri týchto líniách už bol preukázaný fenotyp skorého (*u2af65b_104128*, *u2af65b_055049C*) a neskorého kvitnutia (*u2af65a_144790*, *u2af65a_075828*). V prípade použitia etiolizovaných rastlín nebol zaznamenaný výrazný rozdiel.

V prípade vyhodnotenia „surových“ dát doby kvitnutia preukázaná štatisticky významná zmena medzi jednotlivými genotypmi (graf uvedený v prílohe 9.2.2, obr. P2). Dáta boli následne transformované metódou pomeru hodnoty T50 k najvyššej hodnote T50. Po tejto transformácii bol zaznamenaný štatisticky významný rozdiel medzi líniami vykazujúcimi neskoré kvitnutie a všetkými ostatnými genotypmi (obr. 31a). Zároveň graf naznačuje prítomnú zmenu medzi divokým typom a líniou *mpk13-04* zároveň s líniami vykazujúcimi neskoré kvitnutie, čo by mohlo naznačovať posun doby kvitnutia línie *mpk13-04*. Táto zmena však nebola štatisticky potvrdená.

V prípade analýzy počtu listov ružice môžeme pozorovať, že priemerný počet listov ružice sa v mutantných líniách *mpk13* nachádza medzi počtom listov ružice divokého typu a počtom listov ružice línie vykazujúcej neskoré kvitnutie no rozdiel nebol preukázaný štatisticky (Obr. 31b).

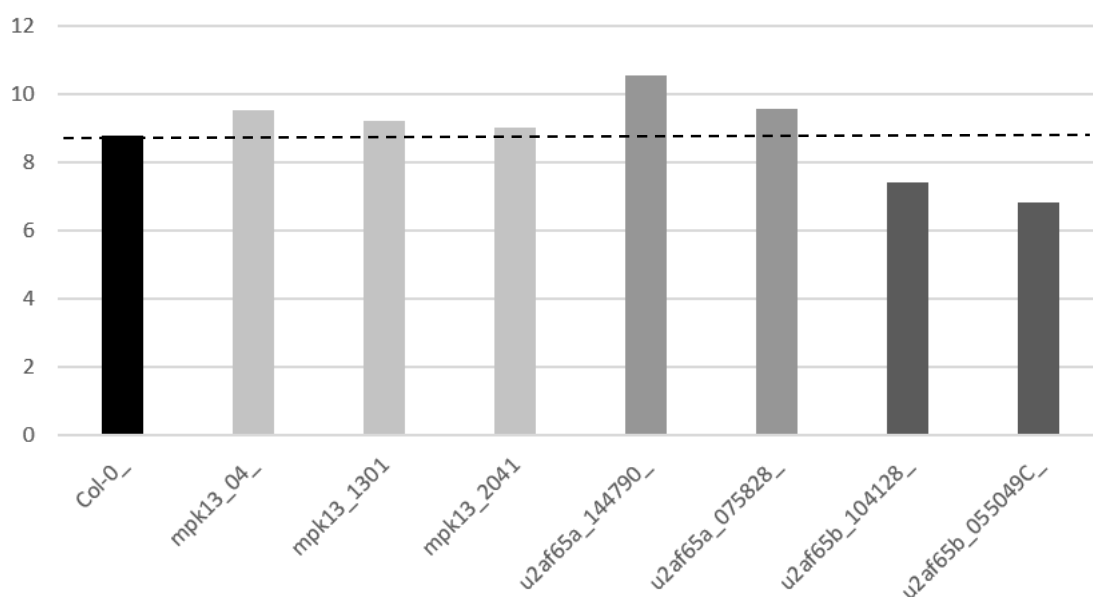
a)

transformované hodnoty T50 v závislosti od genotypu



b)

Počet listov ružice v dobe kvitnutia

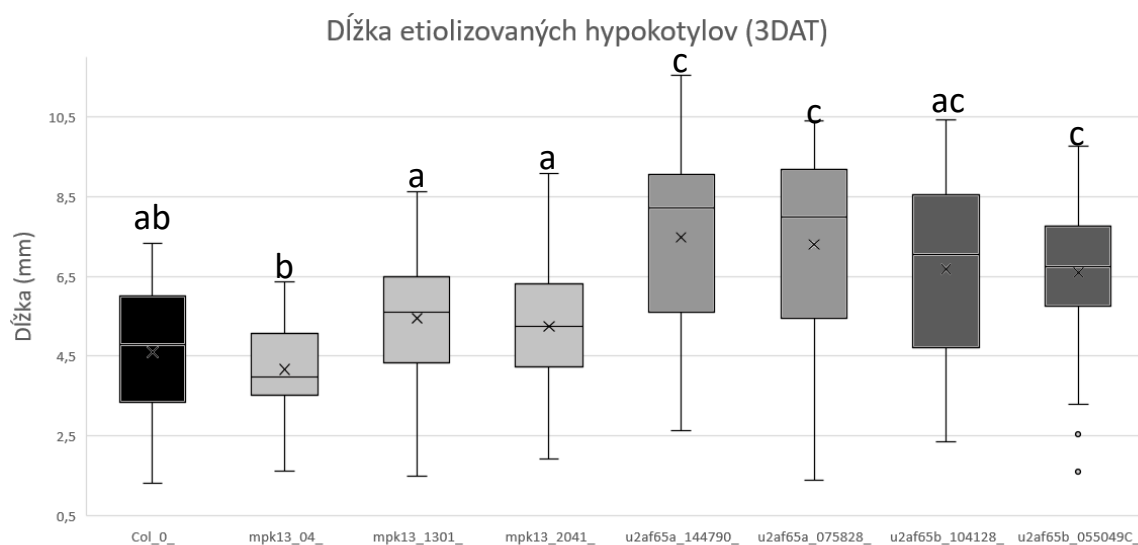


Obr. 31: Grafy zobrazujúce hodnoty T50 v závislosti od genotypu. a) transformované dáta metódou pomeru hodnoty T50 k najvyššej hodnote T50 v rámci daného genotypu. $n(\text{Col-0})=82$, $n(\text{mpk13-04})=66$, $n(\text{mpk13-1301})=51$, $n(\text{mpk13-2041})=63$, $n(\text{u2af65b-104128})=48$, $n(\text{u2af65b-055049C})=52$, $n(\text{u2af65a-144790})=30$, $n(\text{u2af65a-075828})=35$. Použitý štatistický test na hladine významnosti 0,05 – ANOVA (Duncan's method). b) priemerný počet listov ružice v dobe kvitnutia, prerušovaná čiara oddeľuje genotypy vykazujúce skoršie a neskoršie kvitnutie v porovnaní s divokým typom.

4.5.2 Fenotypová analýza hypokotylov

Rastliny *A. thaliana* pestované v podmienkach tmy počas prvých šiestich dní od umiestnenia do fytotronu boli využité aj pre analýzu dĺžky hypokotylu. V grafe na obrázku 33 je vidieť ich namerané dĺžky na tretí deň od umiestnenia do fytotronu.

Z grafu vyplýva že línie vykazujúce skoré a neskoré kvitnutie sa od seba nelíšili, pričom 3 z nich (u2af65a_144790, u2af65a_075828, u2af65b_055049C) boli odlišné od zvyšku genotypov. Línie *mpk13-1301* a *mpk13-2041* sa od seba neodlišovali, no zároveň boli odlišné od línie *mpk13-04*. Tá sa neodlišovala od divokého typu (obr. 32).

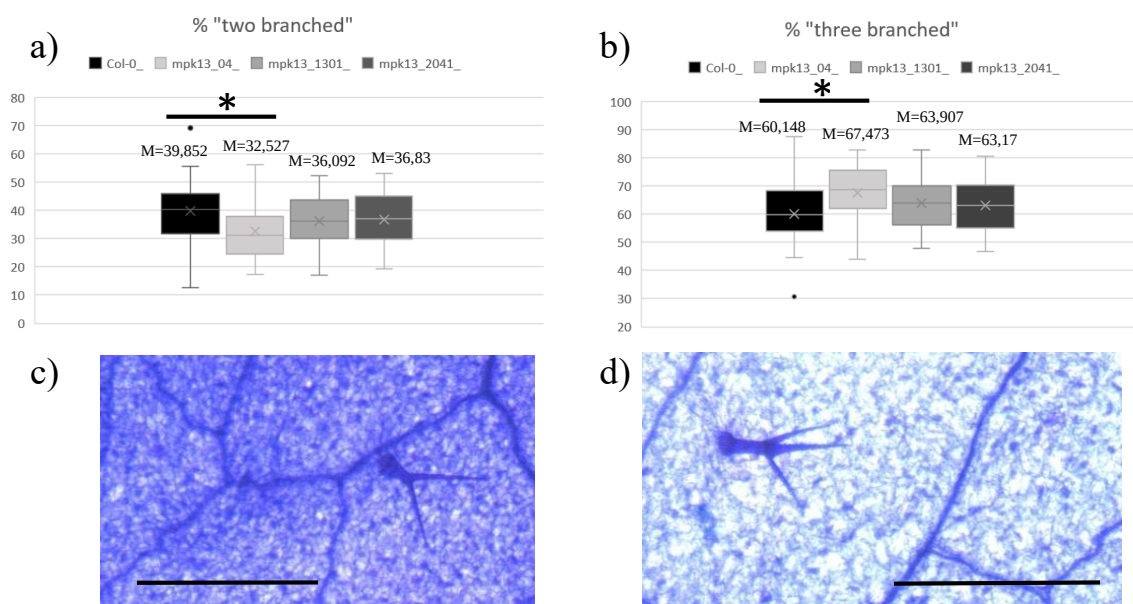


Obr. 32: Graf zobrazujúci dĺžky hypokotylov etiolizovaných semenáčikov *A. thaliana* na tretí deň od presunu do fytotronu. Počet použitých semenáčikov pre jednotlivé genotypy: n (Col-0)=59, n (*mpk13-04*)=76, n (*mpk13-1301*)=83, n (*mpk13-2041*)=52, n (u2af65a_144790)=43, n (u2af65a_075828)=45, n (u2af65b_104128)=47, n (u2af65b_055049C)=49. Použitý štatistický test na hladine významnosti 0,05 – ANOVA (Dunn's method).

4.5.3 Fenotypová analýza trichómov

V prípade analýzy morfológie trichómov sa nepreukázala štatisticky významná odchýlka mutantných línií od divokého typu. Najväčší rozdiel nastal medzi percentuálnym zastúpením dvojvetvových („two-branched“)/trojvetvových („three-branched“) trichómov medzi divokým typom a *mpk13-04* mutantnou líniou. Tento rozdiel však nebol dostatočne veľký aby sa preukázala štatisticky významná odchýlka v prípade porovnania všetkých 4 línií. Línia *mpk13-04* vykazovala vyššie zastúpenie trojvetvových trichómov, pričom v rastlinách divokého typu prevládali trichómy vetvené dvakrát. Grafy a reprezentatívne obrázky jednotlivých typov trichómov sú na obrázku č. 33.

Okrem analýzy morfológie trichómov bola vyhodnotená aj ich denzita. V tomto prípade sa však opäť nepreukázal štatisticky významný rozdiel medzi líniami a to ani v prípade línie *mpk13-04*. Graf uvedený v prílohe 9.2.2(Obr.P3).



Obr. 33: Grafy zobrazujúce podiel dvojvetvých/ trojvetvých trichómov na listoch jednotlivých línií (a,b). Počet použitých listov pre jednotlivé genotypy: n (Col-0)=20, n (*mpk13-04*)=22, n (*mpk13-1301*)=22, n (*mpk13-2041*)=25. Reprezentatívne obrázky jednotlivých typov trichómov ofarbené toluidínovou modrou a odfotené pomocou mikroskopu Axio Zoom.V16 objektívom PlanNeoFluar Z 1.0x. Zväčšenie 20x (c) a 25x (d). Mierka predstavuje 500 μ m. Použitý štatistický t-test.

5 Diskusia

5.1 Screening a validácia CRISPR KO mutantných línii *Medicago sativa*

Na základe výsledkov v tejto diplomovej práci založených najmä na sekvenácii jednotlivých klonov obsahujúcich jednotlivé PCR produkty považované za jednotlivé alely je možné predpokladať dva rôzne scenáre validácie.

V prvom prípade je možné identifikovanú mutantnú rastlinu považovať za heterozygota. Doposiaľ boli identifikované 2 alely, v ktorých dochádzalo k posunu čítacieho rámca a tvorbe predčasného kodónu. Zároveň boli v chromatografoch pochádzajúcich zo sekvenácie zmiešaného PCR produktu prítomné dvojité signály. Práve vďaka týmto dvojitým signálom sa podarilo identifikovať potenciálne inzercie či delécie. Avšak prítomnosť týchto dvojitých signálov zároveň implikuje prítomnosť alel bez editácie, čo by mohlo znamenať, že gén je v genóme prítomný v štyroch kópiách, nakoľko sa jedná o tetraploidný organizmus. Tento scenár tak predstavuje možnosť, že mutantná línia UB15 v sebe nesie iba dve editované alely zo štyroch prítomných.

Na druhej strane je tento scenár v rozpore s publikáciou zaoberajúcou sa sekvenáciou a analýzou mitogenom aktivovaných proteín kináz v *Medicago sativa* L (Liu *et al.*, 2024a). Autori publikácie uvádzajú, že v genóme sa nachádzajú dve kópie tohto génu. Prvú kópiu označujú ako *MsMAPK37* s identifikátorom MS.gene004136. Táto kópia sa nachádza na chromozóme 4.2 (42889970–42,893,908). Druhá kópia nesie označenie *MsMAPK46* s identifikátorom MS.gene65257 a nachádza sa na chromozóme 4.3 (41078319–41,082,249). Obe sekvencie identifikované v tejto štúdii produkujú proteín o dĺžke 374 aminokyselín a sú medzi sebou zhodné. Zároveň sú proteínové produkty identifikované v štúdii zhodné s aminokyselinovými sekvenciami produkovanými kódujúcimi sekvenciami, s ktorými sa v tejto práci pracovalo pod označením RSY_96 a RSY_143.

Zhodné kódujúce sekvencie a proteínové produkty s označením RSY_96 a RSY_143 však neznamenaajú zhodnosť sekvencie genomickej DNA. V tejto diplomovej práci bol identifikovaný rozdiel týchto dvoch sekvencií v intróne 1 a preto boli považované za dve rôzne alely.

Ďalej bola identifikovaná zhoda aminokyselinovej sekvencie RSY_74 s dvomi rôznymi sekvenciami vo vyššie spomínanej publikácii. Jedná sa konkrétne o sekvencie

MsMAPK32 (MS.gene08564, chr4.1:37986714–37,990,587) a MsMAPK52 (MS.gene049834, chr4.4:43623794–43,627,670). Táto zhoda poukazuje na fakt, že sekvencia kóduje iný gén. Nepatrný rozdiel v kódujúcej sekvencii spočíva v substitúcii 16tej aminokyseliny, kedy dochádza k zámene serínu za treonín.

Prítomnosť sekvencie RSY_243 nebola identifikovaná ani v opakovaných sekvenáciach jednotlivých klonov v tejto diplomovej práci a jej sekvencia nebola identifikovaná ani autormi vyššie spomínanej publikácie. Je tak pravdepodobné, že táto sekvencia sa v genóme nenachádza.

Z *in silico* analýzy teda vyplýva, že s najväčšou pravdepodobnosťou sa v genóme nachádzajú dve kópie génu *MMK3*, čo koreluje s vyššie spomínanou štúdiou. Tieto dve sekvencie zodpovedajúce génu *MMK3* autori označili ako *MsMAPK37/MsMAPK46*. Nachádzajú sa na chromozóme 4.2 a 4.3 a zhodujú sa so sekvenciami RSY_96 a RSY_143. Pomocou CRISPR KO konštruktu sa podarilo obe alely editovať a došlo posunu čítacieho rámca tvoriaceho predčasný STOP kodón v druhom exóne.

Prítomnosť dvojitych signálov na chromatografoch je možné vysvetliť práve druhou sekvenciou takmer identickou so sekvenciou génu *MMK3*, nachádzajúcou sa na chromozóme 4.1 a 4.4, ktorú autori označili ako *MsMAPK32/MsMAPK52*. Táto sekvencia produkuje pozmenený proteín v pozícii 16 a 236 oproti sekvenciám RSY_96 a RSY_143. v tejto práci bola označená ako RSY_74. Pri tvorbe PCR produktov s najväčšou pravdepodobnosťou dochádzalo aj k zmnoženiu a následnej analýze aj týchto úsekov DNA na základe vysokej podobnosti DNA sekvencie.

Vzhľadom na pozíciu predčasného STOP kodónu je možné predpokladať, že editácia vyústi do tvorby skrátenej a nefunkčnej mRNA, ktorá bude degradovaná po zaznamenaní STOP kodónu pred EJC signálom (z angl. „exon-junction complex“) ešte pred procesom translácie v procese NMD (z angl. „nonsense-mediated decay“) (Popp a Maquat, 2016). Ak by tento prípad nenastal a proteín by sa tvoril tak by sa tvoril výrazne pozmenený. Od miesta delécie jednak nastáva zmena poradia jednotlivých aminokyselín a zároveň STOP kodón nastáva v mieste, ktoré zodpovedá pozícii okolo 60tej aminokyseliny. Začiatok kinázovej domény je *in silico* predikovaný v pozícii 33-367 (Lokajová, 2024). STOP kodón v mieste 60tej aminokyseliny by tak výrazne narušil kinázovú doménu.

Pre ďalšie overenie prítomnosti transkriptu prípadne proteínu sú potrebné ďalšie experimenty. V prípade overovania prítomnosti/absencie transkriptu sa ponúka metóda

RT-qPCR, ktorá by odhalila aj zníženú mieru transkriptu. V prípade navrhnutia primer párov pred a za miestom STOP kodónu by bolo možné vyhodnotiť či sa daný transkript degraduje. V prípade overenia prítomnosti proteínu je možná metóda western blotu so špecifickou protilátkou. V oboch prípadoch je však potrebné brať do úvahy vysokú podobnosť sekvencie či už génu alebo proteínu MMK3 s jeho príbuzným génom v práci označovaným ako RSY_74 (*MsMAPK32/MsMAPK52*).

Takisto sa ponúka myšlienka do akej miery je gén *MsMAPK32/MsMAPK52* schopný kompenzovať rolu génu *MMK3*. Všetky spomínané gény a ich proteínové produkty boli v štúdiu zaoberajúcej sa sekvenáciou MAP kináz lokalizované v cytoplazme a zároveň zo zostrojeného fylogenetického stromu v tejto publikácii vyplýva ich evolučná príbuznosť. Medzi spomínanými proteínmi dochádza len k jednoaminokyselinovým substitúciám mimo aktívnych miest proteínu. Substitúcia lokalizovaná v KIM motíve je prítomná vo všetkých sekvenciách a vyplýva z rozdielu medzi týmito sekvenciami a databázou NCBI, tým pádom ju možno považovať za výsledok chybnjej anotácie v NCBI databáze. V prípade substitúcií aminokyselín mimo tohto miesta sa jedná o substitúciu v pozícii 16 a to konkrétne o zámenu treonínu (RSY_96/143) za serín (RSY_74), ktorá je považovaná za konzervovanú. V prípade druhej aminokyselinovej substitúcie sa jedná o zámenu arginínu (RSY_74) za lyzín (RSY_96/143). Táto substitúcia je takisto považovaná za konzervatívnu avšak nie je vyslovene neutrálna. Obe aminokyseliny sú síce kladne nabité, ale odlišujú sa štruktúrou postranných reťazcov. Bočný reťazec arginínu je dlhší, obsahuje guanidínovú skupinu a je schopný tvoriť silnejšie vodíkové väzby. Na druhej strane lyzín obsahuje kratší a flexibilnejší postranný reťazec s aminoskupinou. Tento rozdiel sa môže prejaviť hlavne v prípade ak sa jedná o zámenu v aktívnom mieste enzýmu, kde by mohlo dochádzať k proteín-proteín interakciám (Betts a Russell, 2003). V prípade MAP kináz sa tak môže jednať o zmenu substrátovej špecificity a zmenu v interakcii. V tomto prípade sa však substitúcia nenachádza priamo v aktívnom mieste ale iba v jeho blízkosti a preto by boli vhodné ďalšie experimenty pre určenie schopnosti vzájomnej funkcie týchto dvoch génov.

5.2 Klonovanie konštruktu fluorescenčne značeného génu *MPK13*

V práci bola najprv zvolená stratégia klonovania využívajúca trojkomponentný systém Multisite Gateway. Počas klonovania sa podarilo pripraviť vstupné klony, ktoré boli overené pomocou restriktčného štiepenia a boli podrobené sekvenovaniu za účelom

overenia správnosti klonovanej sekvencie a jednotlivých rekombinovaných *att* miest. Oba spôsoby potvrdili správnosť klonovania. Tieto klony boli uchované v podobe hlbokozmrazených bakteriálnych kultúr na -80 °C a taktiež bola uchovaná izolovaná plazmidová DNA obsahujúca tieto klony (-20 °C). Dokopy boli pripravené a uchované 4 rôzne typy klonov.

S klonmi sa ďalej pracovalo za účelom prípravy konštruktu fluorescenčne značeného proteínu génu *MPK13* pod kontrolou natívneho promótoru. LR reakcia využívajúca 3 komponenty bola v tomto prípade neúspešná. Na základe neúspešných pokusov o transformáciu chemokompetentných buniek *E. coli* kmeňa DH5α a TOP10 boli následne pripravené elektrokompetentné bunky kmeňa TOP10. Tie boli pripravené za účelom zvýšenia účinnosti transformácie. Ani pomocou týchto buniek však nedošlo k úspešnej LR trojkomponentovej rekombinačnej reakcii.

V prípade zlyhanej trojkomponentovej reakcie by neúspešný výsledok mohlo vysvetliť niekoľko príčin. Medzi ne zaradujeme nevhodný stechiometrický pomer a koncentrácia DNA, kvalita a topológia použitej DNA a v neposlednom rade kvalita a uskladnenie použitého enzýmu.

V prvom prípade stechiometrického pomeru hovoríme o ideálnom pomere v situácii pomeru 1:1:1:1 vstupných klonov a destinačného vektoru. Pri výpočte množstva DNA je potreba zohľadniť aj dĺžku jednotlivých plazmidov. Počas práce bola dĺžka zohľadnená, avšak zohľadnenie neprispelo k pozitívnemu výsledku. Pre optimalizáciu by bolo možné zvýšiť pomer vstupných klonov na pomer 2:1 voči destinačnému vektoru. Zároveň môže rolu v účinnosti reakcie zohrávať aj topológia použitej DNA. Pre tento typ reakcie je vhodná „supercoiled“ plazmidová DNA. Ak k jej prečisteniu dochádzalo nesprávnym spôsobom bolo by vhodné danú DNA re-precipitovať etanolom, čo by jej prinavrátilo želanú formu. Zároveň taktiež treba zohľadniť kvalitu používaného enzýmu, ktorý sa vyznačuje vysokou náchylnosťou na teplotu. Je potreba s ním manipulovať pri nízkych teplotách a opakované rozmrazenie mohlo viesť k jeho degradácii (ThermoFisher Scientific, 2012).

Následne bol zvolený postup jednokomponentovej LR reakcie. Za týmto účelom bol vytvorený vstupný klon s rezistenciou na gentamycin a bol použitý nový destinačný vektor s kanamycinovou rezistenciou. V tomto prípade bola transformácia

elektrokompetentných buniek úspešná a podarilo sa pripraviť jeden expresný klon pod kontrolou konštitutívneho promótoru (*AtUB10:gMPK13:YFP*).

Expresný vektor bol následne transformovaný do buniek *A. tumefaciens*. Rôzne kolónie boli použité pre tranzientnú transformáciu listov *N. benthamiana*. Na tretí deň od transformácie bol pozorovaný špecifický signál v jadre a cytoplazme. Zároveň bol pozorovaný nešpecifický signál vo veľmi silných zhlukoch. Na základe nedávnej publikácie Sojka *et al.*, (2026) spočívajúcej v tranzientnej expresii jednotlivých kináz Lucerny prvého a druhého rádu, prípadne ich kombinácii je možné predpokladať, že sa jedná o signál spôsobený stresom z nadexpresie daného génu. Je možné predpokladať, že nadexpresia vyústila do tvorby stresových granúl, ktoré boli v tejto publikácii pozorované. Toto tvrdenie však vyžaduje ďalšie experimenty ako napríklad vizualizácie stresových granúl pomocou špecifického markerového proteínu (Sojka *et al.*, 2026).

Následne boli izolované proteíny z transformovaných častí listov. Tieto vzorky boli následne overované pomocou elektroforézy v natívnych podmienkach a western blotu za účelom potvrdenia fúzie. Aj keď vzorky po separácii v géli v natívnych podmienkach signál vykazovali tak pomocou western blotu sa fúziu potvrdiť nepodarilo. V tomto prípade prichádza do úvahy možnosť degradácie vzoriek vplyvom nadexpresie alebo počas samotnej izolácie. Taktiež prichádza do úvahy fakt, že izolácia daných proteínov je v tomto prípade obtiažna nakoľko sa koncentrujú do zhlukovitých štruktúr a agregátov. Zároveň sa ponúka možnosť sekvenácie a kontroly celého plazmidu použitého pre tranzientnú transformáciu pre spätnú kontrolu klonovania a výskytu nežiadúcich sekvencií v kostre plazmidu.

5.3 Transkripty generované alternatívnym zostrihom génu

Štúdia pracujúca s T-DNA inzerčnou líniou SALK_130193 v géne *MPK13* naznačovala prítomnosť krátkej formy tohto génu vznikajúcej alternatívnym zostrihom aj v danej mutantnej línii *mpk13-1301* (Zeng, Chen, *et al.*, 2011a). Na základe tejto štúdie boli v predchádzajúcej bakalárskej práci analyzované polohy T-DNA inzercii v jednotlivých mutantných líniiach (Lokajová, 2024). V rámci tejto diplomovej práce boli následne jednotlivé línie analyzované pomocou PCR metód za účelom potvrdenia a rozšírenia znalostí o prítomnosti/neprítomnosti v jednotlivých mutantných líniiach.

Pre zopakovanie experimentu rozšíreného o ďalšie dve inzerčné línie boli vyhladané v doplnkových informáciách údaje o použitých primer pároch pre detekciu jednotlivých foriem. Tieto informácie sú dostupné v prílohe článku s názvom „AppendixS1“. Z *in silico* analýzy anelačných teplôt jednotlivých primer párov pomocou Tm kalkulatora dostupného na webe ThermoFisher Scientific (URL 7) však vyplýva, že v prípade primeru použitého pre nasadenie na oblasť dlhej zostrihovej varianty génu je anelačná teplota príliš nízka a jeho dĺžka príliš krátka. Konkrétne sa jedná o „reverse“ primer nazvaný ako MPK131 so sekvenciou TTACATATTCTTGAAGTG. Jeho dĺžka 18 nukleotidov a anelačná teplota 49,6 °C nie je kompatibilná s použitým „forward“ primerom nazvaným MPK13 o dĺžke 23 nukleotidov a anelačnej teplote 63,4 °C. Výsledok, ktorý autori uvádzajú v doplnkových informáciách pod prílohou S6 síce zobrazuje absenciu signálu na agarózovom géli, ktorý by odpovedal absencii signálu dlhej varianty transkriptu v línii *mpk13-1301*, avšak s najväčšou pravdepodobnosťou je táto absencia spôsobená chybným návrhom primerov, ktoré nevytvorili PCR produkt z dôvodu nevhodných anelačných teplôt.

Z tohto dôvodu bol pre analýzu použitý iný „reverse“ primer nasadajúci v oblasti za miestom alternatívneho zostrihu. Pri použití inej kombinácie primerov boli na géli detegované signály vo všetkých troch analyzovaných líniiach. Tieto signály by mali odpovedať obom formám zostrihových variant. Na základe odlišných intenzít signálu bola následne zvolená RT-qPCR metóda, ktorá potvrdila ich prítomnosť vo všetkých troch líniiach. Hladiny transkriptov tohto génu boli síce výrazne znížené oproti divokému typu, avšak stále prítomné. Výrazná zmena úrovne hladín transkriptov sa medzi jednotlivými líniami v tomto pilotnom experimente nepreukázala. Pre spoľahlivejšie overenie by bolo potreba analýzu zopakovať. Zároveň by prichádzalo do úvahy overiť nielen prítomnosť transkriptu, ale aj samotného proteínu, ktorý by potenciálne mohol vzniknúť. Overenie by mohlo prebiehať pomocou metódy western blot so špecifickou protilátkou.

5.4 Fenotypové analýzy

V rámci fenotypových analýz boli vykonané tri rôzne analýzy. Analýza doby kvitnutia bola založená na doposiaľ získaných predbežných výsledkoch v predchádzajúcej bakalárskej práci. Na ňu, vzhľadom na spoločné regulačné mechanizmy, nadviazala analýza dĺžky hypocotylu. Ako posledné bolo vyhodnocované percentuálne zastúpenie

dvojvetvených a trojvetvených trichómov na prvých dvoch pravých listoch ružice. Tento typ analýzy bol zvolený na základe eFP prehliadača (URL 3), ktorý poukazoval na zvýšenú mieru expresie génu *MPK13* v trichómoch.

Fenotypové analýzy si kládli za cieľ objasniť rozdiely medzi jednotlivými líniami pozorovanými v bakalárskej práci. Hypotéza bola založená na prítomnosti krátkych foriem zostrihových variant génu potenciálne v dvoch mutantných líniiach. Tento fakt sa však nepotvrdil. Experimenty založené na PCR metódach poukazujú na prítomnosť týchto transkriptov vo všetkých mutantných líniiach, čo s najväčšou pravdepodobnosťou vyúsťuje do fenotypových rozdielov bez štatistického významu.

Pre preukázania jasnej role krátkych či dlhých zostrihových variant by bolo vhodné molekulárne klonovanie jednotlivých zostrihových variant, ich následná transformácia buď do rastlín divokého typu alebo do mutantných rastlín s KO editáciou génu *MPK13* a fenotypové analýzy zamerané na potenciálne ovplyvnené znaky.

5.4.1 Analýza doby kvitnutia

Na základe surových dát hodnôt T50 nameraných počas tejto diplomovej práce nie je možné hovoriť o významných rozdieloch medzi jednotlivými mutantnými líniami a zároveň ani medzi mutantnými líniami a divokým typom.

Rozdiel medzi hodnotami T50 nastal až po transformácii dát. V tomto prípade bol síce štatisticky potvrdený len medzi líniiou vykazujúcou skoré kvitnutie a zbytkom analyzovaných genotypov. Zároveň však z grafu vyplýva posun doby kvitnutia línie *mpk13-04* smerom k dobe kvitnutia línie vykazujúcej neskoré kvitnutie. Tento fakt by mohol naznačovať posun doby kvitnutia k neskoršiemu fenotypu a mohol by byť vysvetlený miernym zvýšením hladiny transkriptu, ktorý bol detegovaný primer párom FR3.

Výsledok tejto fenotypovej analýzy je v priamom rozpore s výsledkami bakalárskej práce, na ktorých bol založený. S najväčšou pravdepodobnosťou sa jedná o zmenu metodiky, ktorá sa používala pre vyhodnotenie doby kvitnutia. V tejto práci bola využitá metóda považujúca za kvitnúcu rastlinu tú, ktorá vykazovala dĺžku stonky vyššiu ako jeden centimeter. Naopak v bakalárskej práci bola za kvitnúcu rastlinu považovaná rastlina, ktorá otvárala puky a podiel týchto rastlín bol vyhodnocovaný na tridsiaty deň

od sadenia. V oboch prípadoch sa jedná o vyhodnocovanie doby kvitnutia avšak diplomová práca pracuje s iným vývojovým štádiom.

Zároveň sa môže jednať o podmienený kondicionálny fenotyp prejavovaný v určitých podmienkach. V štúdií zameranej na rod chryzantém sa jednalo o dostupnosť fosforu (Liu *et al.*, 2023). V prípadných budúcich experimentoch by bolo možné využiť prístup zo spomínanej štúdie, prípadne rozšíriť podmienky o iný typ ošetrovania rastlín, ktorý by mohla predstavovať napríklad kyselina abscisová, ako jeden z hlavných hormonálnych regulátorov kvitnutia, ktorý je často využívaný za účelom modulácie doby kvitnutia (Xiong *et al.*, 2019).

5.4.2 Analýza dĺžky hypokotylu

Aj v prípade tejto analýzy došlo k rozdielu medzi líniou *mpk13-04* a zvyšnými dvomi mutantnými líniami. Opäť sa naskytá možnosť rozdiel vysvetliť mierne zvýšenou hladinou transkriptu, ktorý bol detegovaný primer párom FR3 a líniu tak odlišuje od ostatných dvoch. Zároveň však táto línia nevykazovala rozdiel od divokého typu a tým pádom s najväčšou pravdepodobnosťou rozdiel spočívajúci v nepatrnej zmene transkriptu nehrá dôležitú rolu.

5.4.3 Analýza trichómov

V tomto prípade bol prítomný rozdiel medzi líniou *mpk13-04* a divokým typom. Línia sa odlišovala v pomere dvoj a trojvetvených trichómov na prvých dvoch pravých listoch ružice.

Rozdiel by opäť mohol byť vysvetlený zvýšenou mierou transkriptu v porovnaní s ostatnými mutantnými líniami. Skrátené transkripty majú totižto narušenú kinázovú a dokovaciú doménu (Lin *et al.*, 2010). Zmena pomeru úplných a neúplných potenciálnych proteínových produktov by tak mohla vyústiť do zmeny zapojenia daného proteínu v regulačných procesoch skrz pozmenenú moduláciu proteínových komplexov (Maik-Rachline *et al.*, 2021).

Rozdiel bol však potvrdený len na úrovni t-testu medzi divokým typom a líniou *mpk13-04*. Pre zvýšenie robustnosti testovania by bolo vhodné v budúcich experimentoch zvýšiť hodnotu N.

Zároveň sa môže jednať o situáciu kedy je veľmi obtiažne zachytiť jasný kontrastný fenotypový prejav mutantnej línie vyplývajúci z povahy vysokej príbuznosti jednotlivých kináz. Počas bakalárskej práce na základe *in silico* analýz bola preukázaná vysoká miera podobnosti medzi génom záujmu *MPK13* a druhou kinázou prvého rádu *MPK11* (Lokajová, 2024). Zároveň publikácia využívajúca dvojité mutantné línie naznačuje prekrývajúce sa role s génom *MPK4*, nakoľko dvojité mutantné línie *mpk4/mpk13* v oboch génoch vykazovali výraznejší fenotyp ako jednotlivé mutantné línie samostatne (Su a Krysan, 2016).

6 Záver

V prvej časti sa práca venovala experimentom zameraným na gén *MPK13* z *A. thaliana*. Ako prvý bol pripravený konštrukt pod kontrolou konštitutívneho promótoru (*AtUBQ10::YFP:gMPK13*). Konštrukt bol použitý pre tranzientnú transformáciu listov *N. benthamiana*, kde vykazoval špecifický signál spolu so silnými akumulujúcimi sa agregátmi. Konštrukt sa následne nepodarilo validovať pomocou metódy western blot. Zároveň však boli pripravené všetky vstupné komponenty pre trojkomponentovú reakciu.

Ďalej sa práca zaoberala skúmaním prítomnosti krátkych a dlhých zostrihových variant v jednotlivých mutantných líniiach. Počas práce bola identifikovaná chyba v metodike, ktorá s najväčšou pravdepodobnosťou viedla k chybnému záveru v spomínanej štúdii. V práci boli identifikované obe formy génu naprieč všetkými tromi líniami. Následná analýza hladín transkriptov poukázala na zanedbateľné odchýlky, ktorými sa jednotlivé línie odlišujú a nebolo tak možné vysvetliť odlišnosti v prípade fenotypových analýz týmto spôsobom.

Fenotypové analýzy vykazovali mierny posun mutantných línii *mpk13* v dobe kvitnutia. Použité mutantné línie, hlavne línia *mpk13-04* vykazovala posun k línii vykazujúcej neskoršiu dobu kvitnutia. Táto línia (*mpk13-04*) sa zároveň odlišovala v pomere zastúpených dvoj- a troj-vetvených trichómov. Taktiež bola odlišná od zvyškových dvoch mutantných línii *mpk13* v prípade dĺžky hypokotylu.

Práca sa taktiež venovala overovaniu a validácii potenciálnej editácie ortológneho génu *MMK3* u Lucerny siatej. V tomto prípade bola úspešne selektovaná jedna „knock-out“ mutantná línia označená ako UB15. Daná línia bola validovaná pomocou Sangerovho sekvenovania s optimalizovanou metódou prípravy genetického materiálu určeného pre sekvenáciu. Následnou *in silico* analýzou bola preukázaná editácia v oboch alelách génu prítomného v dvoch kópiách v celom genóme Lucerny siatej. Daná línia bola spolu s líniiou divokého typu a nadexpresnou líniiou pripravenou počas bakalárskej práce zmnožená dvomi rôznymi metódami. Metóda odrezkovania vygenerovala veľké množstvo rastlín, ktoré by v budúcnosti mohli byť použité pre fenotypové analýzy. Metóda samoopelenia zabezpečila uchovanie materiálu v podobe semien.

7 Literatúra

7.1 Odborná literatúra

- Adrian, J., Torti, S., & Turck, F. (2009). From Decision to Commitment: The Molecular Memory of Flowering. *Molecular plant*, 2, 628–642. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp031>
- Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., Beemster, G. T. S., & Genschik, P. (2009). Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in Arabidopsis. *Current Biology: CB*, 19(14), 1188–1193. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.05.059>
- Ali, A., Zareen, S., Park, J., Khan, H. A., Lim, C. J., Bader, Z. E., Hussain, S., Chung, W. S., Gechev, T., Pardo, J. M., & Yun, D.-J. (2024). ABA INSENSITIVE 2 promotes flowering by inhibiting OST1/ABI5-dependent FLOWERING LOCUS C transcription in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 75(8), 2481–2493. <https://doi.org/10.1093/jxb/erae029>
- Bao, S., Hua, C., Huang, G., Cheng, P., Gong, X., Shen, L., & Yu, H. (2019). Molecular Basis of Natural Variation in Photoperiodic Flowering Responses. *Developmental Cell*, 50(1), 90–101.e3. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.05.018>
- Bethke, G., Pecher, P., Eschen-Lippold, L., Tsuda, K., Katagiri, F., Glazebrook, J., Scheel, D., & Lee, J. (2012). Activation of the Arabidopsis thaliana Mitogen-Activated Protein Kinase MPK11 by the Flagellin-Derived Elicitor Peptide, flg22. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 25(4), 471–480. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-11-0281>
- Betts, M. J., & Russell, R. B. (2003). Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions. V *Bioinformatics for Geneticists* (s. 289–316). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0470867302.ch14>
- Bhagat, P. K., Verma, N., Pandey, S., Verma, D., & Sinha, A. K. (2025). MPK3 mediated phosphorylation inhibits the dimerization of ABI5 to fine-tune the ABA signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 221, 109690. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2025.109690>
- Blümel, M., Dally, N., & Jung, C. (2015). Flowering time regulation in crops—What did we learn from Arabidopsis? *Current Opinion in Biotechnology, Food Biotechnology • Plant Biotechnology*, 32, 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.023>
- Bögre, L., Calderini, O., Binarova, P., Mattauch, M., Till, S., Kiegerl, S., Jonak, C., Pollaschek, C., Barker, P., Huskisson, N. S., Hirt, H., & Heberle-Bors, E. (1999). A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *The Plant Cell*, 11(1), 101–113.
- Calderini, O., Bögre, L., Vicente, O., Binarova, P., Heberle-Bors, E., & Wilson, C. (1998). A cell cycle regulated MAP kinase with a possible role in cytokinesis in tobacco cells. *Journal of Cell Science*, 111(20), 3091–3100. <https://doi.org/10.1242/jcs.111.20.3091>
- 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>
- Carrington, J. C., & Ambros, V. (2003). Role of microRNAs in plant and animal development. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5631), 336–338. <https://doi.org/10.1126/science.1085242>
- Cock, P. J. A., Antao, T., Chang, J. T., Chapman, B. A., Cox, C. J., Dalke, A., Friedberg, I., Hamelryck, T., Kauff, F., Wilczynski, B., & de Hoon, M. J. L. (2009). Biopython: Freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics*, 25(11), 1422–1423. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp163>
- Collin, A., & Daszkowska-Golec, A. (2025). Revising the role of ABA as regulator of flowering and seed development. *Journal of Plant Physiology*, 312, 154565. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2025.154565>

- Collin, A., Daszkowska-Golec, A., & Szarejko, I. (2021). Updates on the Role of ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5 (ABI5) and ABSCISIC ACID-RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTORS (ABFs) in ABA Signaling in Different Developmental Stages in Plants. *Cells*, 10(8), 1996. <https://doi.org/10.3390/cells10081996>
- Creux, N., & Harmer, S. (2019). Circadian Rhythms in Plants. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(9), a034611. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034611>
- Daigle, C., Mazin, B., & Matton, D. P. (2019). The *Solanum chacoense* Fertilization-Related Kinase 3 (ScFRK3) is involved in male and female gametophyte development. *BMC Plant Biology*, 19(1), 202. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1804-0>
- Datta, R., & Paul, S. (2019). Long non-coding RNAs: Fine-tuning the developmental responses in plants. *Journal of Biosciences*, 44. <https://doi.org/10.1007/s12038-019-9910-6>
- Davis, M. W., & Jorgensen, E. M. (2022). ApE, A Plasmid Editor: A Freely Available DNA Manipulation and Visualization Program. *Frontiers in Bioinformatics*, 2. <https://doi.org/10.3389/fbinf.2022.818619>
- Domagalska, M. A., Schomburg, F. M., Amasino, R. M., Vierstra, R. D., Nagy, F., & Davis, S. J. (2007). Attenuation of brassinosteroid signaling enhances FLC expression and delays flowering. *Development (Cambridge, England)*, 134(15), 2841–2850. <https://doi.org/10.1242/dev.02866>
- Du, C., Bai, H., Yan, Y., Liu, Y., Wang, X., & Zhang, Z. (2025). Exploring ABI5 regulation: Post-translational control and cofactor interactions in ABA signaling. *The Plant Journal*, 121(3), e17232. <https://doi.org/10.1111/tpj.17232>
- Eriksson, S., Böhlenius, H., Moritz, T., & Nilsson, O. (2006). GA4 Is the Active Gibberellin in the Regulation of LEAFY Transcription and Arabidopsis Floral Initiation. *The Plant Cell*, 18(9), 2172–2181. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.042317>
- Eul, J., & Patzel, V. (2013). Homologous SV40 RNA trans-splicing: A new mechanism for diversification of viral sequences and phenotypes. *RNA Biology*, 10(11), 1689–1699. <https://doi.org/10.4161/rna.26707>
- Feng, C.-Z., Chen, Y., Wang, C., Kong, Y.-H., Wu, W.-H., & Chen, Y.-F. (2014). Arabidopsis RAV1 transcription factor, phosphorylated by SnRK2 kinases, regulates the expression of ABI3, ABI4, and ABI5 during seed germination and early seedling development. *The Plant Journal*, 80(4), 654–668. <https://doi.org/10.1111/tpj.12670>
- Fernández, V., Takahashi, Y., Le Gourriec, J., & Coupland, G. (2016). Photoperiodic and thermosensory pathways interact through CONSTANS to promote flowering at high temperature under short days. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 86(5), 426–440. <https://doi.org/10.1111/tpj.13183>
- Fica, S. M., Tuttle, N., Novak, T., Li, N.-S., Lu, J., Koodathingal, P., Dai, Q., Staley, J. P., & Piccirilli, J. A. (2013). RNA catalyses nuclear pre-mRNA splicing. *Nature*, 503(7475), 229–234. <https://doi.org/10.1038/nature12734>
- Fornara, F., de Montaigu, A., & Coupland, G. (2010). SnapShot: Control of flowering in Arabidopsis. *Cell*, 141(3), 550, 550.e1-2. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.024>
- Freytes, S. N., Canelo, M., & Cerdán, P. D. (2021). Regulation of Flowering Time: When and Where? *Current Opinion in Plant Biology*, 63, 102049. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102049>
- Galvão, V. C., Horrer, D., Küttner, F., & Schmid, M. (2012). Spatial control of flowering by DELLA proteins in Arabidopsis thaliana. *Development*, 139(21), 4072–4082. <https://doi.org/10.1242/dev.080879>
- Gao, X.-H., Xiao, S.-L., Yao, Q.-F., Wang, Y.-J., & Fu, X. (2011). An Updated GA Signaling ‘Relief of Repression’ Regulatory Model. *Molecular plant*, 4, 601–606. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr046>
- Gil, K.-E., Park, M.-J., Lee, H.-J., Park, Y.-J., Han, S.-H., Kwon, Y.-J., Seo, P. J., Jung, J.-H., & Park, C.-M. (2017). Alternative splicing provides a proactive mechanism for the diurnal CONSTANS dynamics in Arabidopsis photoperiodic flowering. *The Plant Journal*, 89(1), 128–140. <https://doi.org/10.1111/tpj.13351>
- Hajdu, A., Ádám, É., Sheerin, D. J., Dobos, O., Bernula, P., Hiltbrunner, A., Kozma-Bognár, L., & Nagy, F. (2015). High-level expression and phosphorylation of phytochrome B

- modulates flowering time in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 83(5), 794–805. <https://doi.org/10.1111/tpj.12926>
- Han, X., Yu, H., Yuan, R., Yang, Y., An, F., & Qin, G. (2019). Arabidopsis Transcription Factor TCP5 Controls Plant Thermomorphogenesis by Positively Regulating PIF4 Activity. *iScience*, 15, 611–622. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.04.005>
- Hang, J., Wan, R., Yan, C., & Shi, Y. (2015). Structural basis of pre-mRNA splicing. *Science (New York, N.Y.)*, 349(6253), 1191–1198. <https://doi.org/10.1126/science.aac8159>
- Hayama, R., Sarid-Krebs, L., Richter, R., Fernández, V., Jang, S., & Coupland, G. (2017). PSEUDO RESPONSE REGULATORS stabilize CONSTANS protein to promote flowering in response to day length. *The EMBO Journal*, 36(7), 904–918. <https://doi.org/10.15252/emboj.201693907>
- Heidari, B., Nemie-Feyissa, D., Kangasjärvi, S., & Lillo, C. (2013). Antagonistic regulation of flowering time through distinct regulatory subunits of protein phosphatase 2A. *PloS One*, 8(7), e67987. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067987>
- Helliwell, C. A., Wood, C. C., Robertson, M., James Peacock, W., & Dennis, E. S. (2006). The Arabidopsis FLC protein interacts directly in vivo with SOC1 and FT chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex. *The Plant Journal*, 46(2), 183–192. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02686.x>
- Heo, J. B., & Sung, S. (2011). Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6013), 76–79. <https://doi.org/10.1126/science.1197349>
- Hou, X., Zhou, J., Liu, C., Liu, L., Shen, L., & Yu, H. (2014). Nuclear factor Y-mediated H3K27me3 demethylation of the SOC1 locus orchestrates flowering responses of Arabidopsis. *Nature Communications*, 5(1), 4601. <https://doi.org/10.1038/ncomms5601>
- Hu, Y. X., Wang, Y. H., Liu, X. F., & Li, J. Y. (2004). Arabidopsis RAV1 is down-regulated by brassinosteroid and may act as a negative regulator during plant development. *Cell Research*, 14(1), 8–15. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290197>
- Huang, W., Pérez-García, P., Pokhilko, A., Millar, A. J., Antoshechkin, I., Riechmann, J. L., & Mas, P. (2012). Mapping the Core of the Arabidopsis Circadian Clock Defines the Network Structure of the Oscillator. *Science*, 336(6077), 75–79. <https://doi.org/10.1126/science.1219075>
- Huang, X., Chen, S., Li, W., Tang, L., Zhang, Y., Yang, N., Zou, Y., Zhai, X., Xiao, N., Liu, W., Li, P., & Xu, C. (2021). ROS regulated reversible protein phase separation synchronizes plant flowering. *Nature Chemical Biology*, 17(5), 549–557. <https://doi.org/10.1038/s41589-021-00739-0>
- Hung, F.-Y., Shih, Y.-H., Lin, P.-Y., Feng, Y.-R., Li, C., & Wu, K. (2022). WRKY63 transcriptional activation of COOLAIR and COLDAIR regulates vernalization-induced flowering. *Plant Physiology*, 190(1), 532–547. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac295>
- Hwang, K., Susila, H., Nasim, Z., Jung, J.-Y., & Ahn, J. H. (2019). Arabidopsis ABF3 and ABF4 Transcription Factors Act with the NF-YC Complex to Regulate SOC1 Expression and Mediate Drought-Accelerated Flowering. *Molecular Plant*, 12(4), 489–505. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.01.002>
- Chamala, S., Feng, G., Chavarro, C., & Barbazuk, W. B. (2015). Genome-Wide Identification of Evolutionarily Conserved Alternative Splicing Events in Flowering Plants. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00033>
- Chen, Y., Song, S., Gan, Y., Jiang, L., Yu, H., & Shen, L. (2020). SHAGGY-like kinase 12 regulates flowering through mediating CONSTANS stability in Arabidopsis. *Science Advances*, 6(24), eaaw0413. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw0413>
- Cheng, J.-Z., Zhou, Y.-P., Lv, T.-X., Xie, C.-P., & Tian, C.-E. (2017). Research progress on the autonomous flowering time pathway in Arabidopsis. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(3), 477–485. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0458-3>
- Cheng, X.-F., & Wang, Z.-Y. (2005). Overexpression of COL9, a CONSTANS-LIKE gene, delays flowering by reducing expression of CO and FT in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 43(5), 758–768. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02491.x>

- Ibañez, C., Delker, C., Martinez, C., Bürstenbinder, K., Janitza, P., Lippmann, R., Ludwig, W., Sun, H., James, G. V., Klecker, M., Grossjohann, A., Schneeberger, K., Prat, S., & Quint, M. (2018). Brassinosteroids Dominate Hormonal Regulation of Plant Thermomorphogenesis via BZR1. *Current Biology: CB*, 28(2), 303–310.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.077>
- Ichimura, K. (2002). *Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: A new nomenclature*. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02302-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02302-6)
- Ito, S., Song, Y. H., Josephson-Day, A. R., Miller, R. J., Breton, G., Olmstead, R. G., & Imaizumi, T. (2012a). FLOWERING BHLH transcriptional activators control expression of the photoperiodic flowering regulator CONSTANS in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(9), 3582–3587. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118876109>
- Ito, S., Song, Y., & Imaizumi, T. (2012b). LOV Domain-Containing F-Box Proteins: Light-Dependent Protein Degradation Modules in Arabidopsis. *Molecular plant*, 5, 573–582. <https://doi.org/10.1093/mp/sss013>
- Jin, R., Klasfeld, S., Zhu, Y., Fernandez Garcia, M., Xiao, J., Han, S.-K., Konkol, A., & Wagner, D. (2021). LEAFY is a pioneer transcription factor and licenses cell reprogramming to floral fate. *Nature Communications*, 12(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20883-w>
- Jin, S., & Ahn, J. H. (2021). Regulation of flowering time by ambient temperature: Repressing the repressors and activating the activators. *New Phytologist*, 230(3), 938–942. <https://doi.org/10.1111/nph.17217>
- Jin, S., Kim, S. Y., Susila, H., Nasim, Z., Youn, G., & Ahn, J. H. (2022). FLOWERING LOCUS M isoforms differentially affect the subcellular localization and stability of SHORT VEGETATIVE PHASE to regulate temperature-responsive flowering in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 15(11), 1696–1709. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2022.08.007>
- Jing, Y., Guo, Q., & Lin, R. (2019). The Chromatin-Remodeling Factor PICKLE Antagonizes Polycomb Repression of FT to Promote Flowering1. *Plant Physiology*, 181(2), 656–668. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00596>
- 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>
- Kim, D.-H., Xi, Y., & Sung, S. (2017). Modular function of long noncoding RNA, COLDAIR, in the vernalization response. *PLOS Genetics*, 13(7), e1006939. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006939>
- Kreynes, A. E., Yong, Z., Liu, X.-M., Wong, D. C. J., Castellarin, S. D., & Ellis, B. E. (2020). Biological impacts of phosphomimic AtMYB75. *Planta*, 251(3), 60. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03350-0>
- Kumar, S. V., Lucyshyn, D., Jaeger, K. E., Alós, E., Alvey, E., Harberd, N. P., & Wigge, P. A. (2012). Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering. *Nature*, 484(7393), 242–245. <https://doi.org/10.1038/nature10928>
- Kyung, J., Jeon, M., & Lee, I. (2022). Recent advances in the chromatin-based mechanism of FLOWERING LOCUS C repression through autonomous pathway genes. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.964931>
- Lai, H.-C., Ho, U. Y., James, A., De Souza, P., & Roberts, T. L. (2021). RNA metabolism and links to inflammatory regulation and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(1), 21. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-04073-5>
- Lee, J., & Lee, I. (2010). Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator. *Journal of Experimental Botany*, 61(9), 2247–2254. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq098>
- Lee, Z., Kim, S., Choi, S., Joung, E., Kwon, M., Park, H., & Shim, J. (2023). Regulation of Flowering Time by Environmental Factors in Plants. *Plants*, 12, 3680. <https://doi.org/10.3390/plants12213680>
- Li, D., Liu, C., Shen, L., Wu, Y., Chen, H., Robertson, M., Helliwell, C. A., Ito, T., Meyerowitz, E., & Yu, H. (2008). A Repressor Complex Governs the Integration of

- Flowering Signals in Arabidopsis. *Developmental Cell*, 15(1), 110–120.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.05.002>
- Li, X., Lai, M., Li, K., Yang, L., Liao, J., Gao, Y., Wang, Y., Gao, C., Shen, W., Luo, M., & Yang, C. (2024). FLZ13 interacts with FLC and ABI5 to negatively regulate flowering time in Arabidopsis. *New Phytologist*, 241(3), 1334–1347.
<https://doi.org/10.1111/nph.19445>
- Li, X., Zhang, G., Liang, Y., Hu, L., Zhu, B., Qi, D., Cui, S., & Zhao, H. (2021). TCP7 interacts with Nuclear Factor-Ys to promote flowering by directly regulating SOC1 in Arabidopsis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 108(5), 1493–1506.
<https://doi.org/10.1111/tpj.15524>
- Lin, W.-Y., Matsuoka, D., Sasayama, D., & Nanmori, T. (2010). A splice variant of Arabidopsis mitogen-activated protein kinase and its regulatory function in the MKK6–MPK13 pathway. *Plant Science*, 178(3), 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.01.006>
- Liu, C., Shao, H., Heng, Y., Xia, M., Qu, X., Tang, X., Gui, Y., & Zhang, N. (2023). Regulatory network mediated by CmMKK5–CmMPK13 cascade response to phosphorus starvation in chrysanthemum. *Industrial Crops and Products*, 199, 116730.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116730>
- Liu, F., Quesada, V., Crevillén, P., Bäurle, I., Swiezewski, S., & Dean, C. (2007). The Arabidopsis RNA-binding protein FCA requires a lysine-specific demethylase 1 homolog to downregulate FLC. *Molecular Cell*, 28(3), 398–407.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.10.018>
- Liu, H., Li, X., He, F., Li, M., Zi, Y., Long, R., Zhao, G., Zhu, L., Hong, L., Wang, S., Kang, J., Yang, Q., & Chen, L. (2024a). Genome-wide identification and analysis of abiotic stress responsiveness of the mitogen-activated protein kinase gene family in *Medicago sativa* L. *BMC Plant Biology*, 24(1), 800. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05524-4>
- Liu, L., Xuan, L., Jiang, Y., & Yu, H. (2021). Regulation by FLOWERING LOCUS T and TERMINAL FLOWER 1 in Flowering Time and Plant Architecture. *Small Structures*, 2(4), 2000125. <https://doi.org/10.1002/sstr.202000125>
- Liu, W., Xie, Y., Ma, J., Luo, X., Nie, P., Zuo, Z., Lahrmann, U., Zhao, Q., Zheng, Y., Zhao, Y., Xue, Y., & Ren, J. (2015). IBS: An illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 31(20), 3359–3361.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv362>
- Liu, Y., Do, S., Huynh, H., Li, J.-X., Liu, Y.-G., Du, Z.-Y., & Chen, M.-X. (2024b). Importance of pre-mRNA splicing and its study tools in plants. *Advanced Biotechnology*, 2(1), 4.
<https://doi.org/10.1007/s44307-024-00009-9>
- Liu, Z., & Mara, C. (2010). Regulatory mechanisms for floral homeotic gene expression. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21(1), 80–86.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.11.012>
- Lokajová J. (2024): Štúdium MMK3 proteínu v Lucerne sietej a jeho ortológu MPK13 v arábkovke Thalovej. [Bakalárska práca]. UPOL Olomouc, Česká republika
- Lu, S. X., Webb, C. J., Knowles, S. M., Kim, S. H. J., Wang, Z., & Tobin, E. M. (2012). CCA1 and ELF3 Interact in the Control of Hypocotyl Length and Flowering Time in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 158(2), 1079–1088.
<https://doi.org/10.1104/pp.111.189670>
- Luo, X., Yin, M., & He, Y. (2022). Molecular Genetic Understanding of Photoperiodic Regulation of Flowering Time in Arabidopsis and Soybean. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 466. <https://doi.org/10.3390/ijms23010466>
- MacMillan, J. (2001). Occurrence of Gibberellins in Vascular Plants, Fungi, and Bacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20(4), 387–442.
<https://doi.org/10.1007/s003440010038>
- Maik-Rachline, G., Wortzel, I., & Seger, R. (2021). Alternative Splicing of MAPKs in the Regulation of Signaling Specificity. *Cells*, 10(12), 3466.
<https://doi.org/10.3390/cells10123466>

- Marasco, L. E., & Kornblihtt, A. R. (2023). The physiology of alternative splicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 24(4), 242–254. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00545-z>
- Marquardt, S., Boss, P. K., Hadfield, J., & Dean, C. (2006). Additional targets of the Arabidopsis autonomous pathway members, FCA and FY. *Journal of Experimental Botany*, 57(13), 3379–3386. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl073>
- Martignago, D., Falavigna, V. da S., Lombardi, A., Gao, H., Kurkowski, P. K., Galbiati, M., Tonelli, C., Coupland, G., & Conti, L. (2023). The bZIP transcription factor AREB3 mediates FT signalling and floral transition at the Arabidopsis shoot apical meristem. *PLOS Genetics*, 19(5), e1010766. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010766>
- Martignago, D., Siemiatkowska, B., Lombardi, A., & Conti, L. (2020). Absciscic Acid and Flowering Regulation: Many Targets, Different Places. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9700. <https://doi.org/10.3390/ijms21249700>
- Melikant, B., Giuliani, C., Halbmayr-Watzina, S., Limmongkon, A., Heberle-Bors, E., & Wilson, C. (2004). The Arabidopsis thaliana MEK AtMKK6 activates the MAP kinase AtMPK13. *FEBS Letters*, 576(1), 5–8. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.08.051>
- Menges, M., Dóczi, R., Ökrész, L., Morandini, P., Mizzi, L., Soloviev, M., Murray, J. A. H., & Bögre, L. (2008). Comprehensive gene expression atlas for the Arabidopsis MAP kinase signalling pathways. *New Phytologist*, 179(3), 643–662. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02552.x>
- Mitchum, M. G., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kuwahara, A., Yoshioka, Y., Kato, T., Tabata, S., Kamiya, Y., & Sun, T.-P. (2006). Distinct and overlapping roles of two gibberellin 3-oxidases in Arabidopsis development. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 45(5), 804–818. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02642.x>
- Moon, J., Suh, S.-S., Lee, H., Choi, K.-R., Hong, C. B., Paek, N.-C., Kim, S.-G., & Lee, I. (2003). The SOC1 MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in Arabidopsis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 35(5), 613–623. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01833.x>
- Mulekar, J. J., Bu, Q., Chen, F., & Huq, E. (2012). Casein kinase II α subunits affect multiple developmental and stress-responsive pathways in Arabidopsis. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 69(2), 343–354. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04794.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>
- Nakamichi, N., Kiba, T., Henriques, R., Mizuno, T., Chua, N.-H., & Sakakibara, H. (2010). PSEUDO-RESPONSE REGULATORS 9, 7, and 5 Are Transcriptional Repressors in the Arabidopsis Circadian Clock. *The Plant Cell*, 22(3), 594–605. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072892>
- Nakashima, K., Fujita, Y., Kanamori, N., Katagiri, T., Umezawa, T., Kidokoro, S., Maruyama, K., Yoshida, T., Ishiyama, K., Kobayashi, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). Three Arabidopsis SnRK2 Protein Kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, Involved in ABA Signaling are Essential for the Control of Seed Development and Dormancy. *Plant and Cell Physiology*, 50(7), 1345–1363. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcp083>
- Nitta, Y., Ding, P., & Zhang, Y. (2014). Identification of additional MAP kinases activated upon PAMP treatment. *Plant Signaling & Behavior*, 9(11), e976155. <https://doi.org/10.4161/15592324.2014.976155>
- Ouaked, F., Wilfried, R., Lecourieux, D., & Hirt, H. (2003). A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg131>
- Park, K.-H., Kim, S.-B., & Jung, J.-H. (2023). Analysis of temperature effects on the protein accumulation of the FT–FD module using newly generated Arabidopsis transgenic plants. *Plant Direct*, 7(12), e552. <https://doi.org/10.1002/pld3.552>
- Park, M.-J., Kwon, Y.-J., Gil, K.-E., & Park, C.-M. (2016). LATE ELONGATED HYPOCOTYL regulates photoperiodic flowering via the circadian clock in

- Arabidopsis. *BMC Plant Biology*, 16(1), 114. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0810-8>
- Park, Y.-J., Lee, J.-H., Kim, J. Y., & Park, C.-M. (2019). Alternative RNA Splicing Expands the Developmental Plasticity of Flowering Transition. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00606>
- Patel, A. A., & Steitz, J. A. (2003). Splicing double: Insights from the second spliceosome. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(12), 960–970. <https://doi.org/10.1038/nrm1259>
- Pavlíková M. (2022): Úlohy vabraných MAPK proteinů u vojtešky *Medicago sativa*. [Bakalárska práca]. UPOL Olomouc, Česká republika
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
- Popp, M. W., & Maquat, L. E. (2016). Leveraging Rules of Nonsense-Mediated mRNA Decay for Genome Engineering and Personalized Medicine. *Cell*, 165(6), 1319–1322. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.053>
- Porri, A., Torti, S., Romera-Branchat, M., & Coupland, G. (2012). Spatially distinct regulatory roles for gibberellins in the promotion of flowering of Arabidopsis under long photoperiods. *Development (Cambridge, England)*, 139(12), 2198–2209. <https://doi.org/10.1242/dev.077164>
- Posé, D., Verhage, L., Ott, F., Yant, L., Mathieu, J., Angenent, G. C., Immink, R. G. H., & Schmid, M. (2013). Temperature-dependent regulation of flowering by antagonistic FLM variants. *Nature*, 503(7476), 414–417. <https://doi.org/10.1038/nature12633>
- Quesada, V., Macknight, R., Dean, C., & Simpson, G. G. (2003). Autoregulation of FCA pre-mRNA processing controls Arabidopsis flowering time. *The EMBO Journal*, 22(12), 3142–3152. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg305>
- Quiroz, S., Yustis, J. C., Chávez-Hernández, E. C., Martínez, T., Sanchez, M. de la P., Garay-Arroyo, A., Álvarez-Buylla, E. R., & García-Ponce, B. (2021). Beyond the Genetic Pathways, Flowering Regulation Complexity in Arabidopsis thaliana. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5716. <https://doi.org/10.3390/ijms22115716>
- Riboni, M., Robustelli Test, A., Galbiati, M., Tonelli, C., & Conti, L. (2016). ABA-dependent control of GIGANTEA signalling enables drought escape via up-regulation of FLOWERING LOCUS T in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany*, 67(22), 6309–6322. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw384>
- Rodriguez, M. C. S., Petersen, M., & Mundy, J. (2010). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 621–649. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112252>
- Sanchez, S. E., & Kay, S. A. (2016). The Plant Circadian Clock: From a Simple Timekeeper to a Complex Developmental Manager. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(12), a027748. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027748>
- Sarid-Krebs, L., Panigrahi, K. C. S., Fornara, F., Takahashi, Y., Hayama, R., Jang, S., Tilmes, V., Valverde, F., & Coupland, G. (2015). Phosphorylation of CONSTANS and its COP1-dependent degradation during photoperiodic flowering of Arabidopsis. *The Plant Journal*, 84(3), 451–463. <https://doi.org/10.1111/tpj.13022>
- Sawa, M., Nusinow, D. A., Kay, S. A., & Imaizumi, T. (2007). FKF1 and GIGANTEA Complex Formation Is Required for Day-Length Measurement in Arabidopsis. *Science*, 318(5848), 261–265. <https://doi.org/10.1126/science.1146994>
- Shavrukov, Y., Kurishbayev, A., Jatayev, S., Shvidchenko, V., Zotova, L., Koekemoer, F., de Groot, S., Soole, K., & Langridge, P. (2017). Early Flowering as a Drought Escape Mechanism in Plants: How Can It Aid Wheat Production? *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01950>

- Shen, L., Zhang, Y., & Sawettalake, N. (2022). A Molecular switch for FLOWERING LOCUS C activation determines flowering time in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 34(2), 818–833. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab286>
- Shu, K., Chen, Q., Wu, Y., Liu, R., Zhang, H., Wang, S., Tang, S., Yang, W., & Xie, Q. (2016). ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 4 negatively regulates flowering through directly promoting Arabidopsis FLOWERING LOCUS C transcription. *Journal of Experimental Botany*, 67(1), 195–205. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv459>
- Schippers, J. H., Foyer, C. H., & van Dongen, J. T. (2016). Redox regulation in shoot growth, SAM maintenance and flowering. *Current Opinion in Plant Biology, Growth and development*, 29, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.11.009>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Siriwardana, N. S., & Lamb, R. S. (2012). The poetry of reproduction: The role of LEAFY in Arabidopsis thaliana flower formation. *The International Journal of Developmental Biology*, 56(4), 207–221. <https://doi.org/10.1387/ijdb.113450ns>
- Sojka, J., Luptovčiak, I., Novák, D., Dvořák, P., Medelská, M., & Šamaj, J. (2026). Killers or protectors: Contrasting roles of alfalfa SIMKK and PRKK in *Nicotiana benthamiana* cell death. *Plant Stress*, 21, 101334. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2026.101334>
- Song, Y. H., Smith, R. W., To, B. J., Millar, A. J., & Imaizumi, T. (2012). FKF1 conveys timing information for CONSTANS stabilization in photoperiodic flowering. *Science*, 336(6084), 1045–1049. <https://doi.org/10.1126/science.1219644>
- Spanudakis, E., & Jackson, S. (2014). The role of microRNAs in the control of flowering time. *Journal of Experimental Botany*, 65(2), 365–380. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert453>
- Su, S.-H., & Krysan, P. J. (2016). A double-mutant collection targeting MAP kinase related genes in Arabidopsis for studying genetic interactions. *The Plant Journal*, 88(5), 867–878. <https://doi.org/10.1111/tpj.13292>
- Su, T., Wang, P., Li, H., Zhao, Y., Lu, Y., Dai, P., Ren, T., Wang, X., Li, X., Shao, Q., Zhao, D., Zhao, Y., & Ma, C. (2018). The Arabidopsis catalase triple mutant reveals important roles of catalases and peroxisome-derived signaling in plant development. *Journal of Integrative Plant Biology*, 60(7), 591–607. <https://doi.org/10.1111/jipb.12649>
- Sun, T.-P., & Gubler, F. (2004). Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 197–223. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141753>
- Sun, Y., Pri-Tal, O., Michaeli, D., & Mosquana, A. (2020). Evolution of Absciscic Acid Signaling Module and Its Perception. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00934>
- Sureshkumar, S., Dent, C., Seleznev, A., Tasset, C., & Balasubramanian, S. (2016). Nonsense-mediated mRNA decay modulates FLM-dependent thermosensory flowering response in Arabidopsis. *Nature Plants*, 2(5), 16055. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.55>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tao, Z., Shen, L., Gu, X., Wang, Y., Yu, H., & He, Y. (2017). Embryonic epigenetic reprogramming by a pioneer transcription factor in plants. *Nature*, 551(7678), 124–128. <https://doi.org/10.1038/nature24300>
- ThermoFisher Scientific (2012) MultiSite Gateway® ThreeFragment Vector Construction Kit
- Verma, N., Singh, D., Mittal, L., Banerjee, G., Noryang, S., & Sinha, A. K. (2023). *MPK4 mediated phosphorylation of PIF4 controls thermosensing by regulation of H2A.Z deposition in Arabidopsis* (s. 2023.06.30.547269). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.06.30.547269>
- Wang, B.-B., & Brendel, V. (2006). Molecular Characterization and Phylogeny of U2AF35 Homologs in Plants. *Plant Physiology*, 140(2), 624–636. <https://doi.org/10.1104/pp.105.073858>

- Wang, J.-W. (2014). Regulation of flowering time by the miR156-mediated age pathway. *Journal of Experimental Botany*, 65(17), 4723–4730. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru246>
- Wang, P., Clark, N. M., Nolan, T. M., Song, G., Bartz, P. M., Liao, C.-Y., Montes-Serey, C., Katz, E., Polko, J. K., Kieber, J. J., Kliebenstein, D. J., Bassham, D. C., Walley, J. W., Yin, Y., & Guo, H. (2022). Integrated omics reveal novel functions and underlying mechanisms of the receptor kinase FERONIA in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 34(7), 2594–2614. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac111>
- Wang, P., Liu, W.-C., Han, C., Wang, S., Bai, M.-Y., & Song, C.-P. (2024). Reactive oxygen species: Multidimensional regulators of plant adaptation to abiotic stress and development. *Journal of Integrative Plant Biology*, 66(3), 330–367. <https://doi.org/10.1111/jipb.13601>
- Wang, Y., Li, L., Ye, T., Lu, Y., Chen, X., & Wu, Y. (2013). The inhibitory effect of ABA on floral transition is mediated by ABI5 in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 64(2), 675–684. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers361>
- Wang, Y.-Y., Xiong, F., Ren, Q.-P., & Wang, X.-L. (2020). Regulation of flowering transition by alternative splicing: The role of the U2 auxiliary factor. *Journal of Experimental Botany*, 71(3), 751–758. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz416>
- Will, C. L., & Lührmann, R. (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(7), a003707. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003707>
- Winter, C. M., Yamaguchi, N., Wu, M.-F., & Wagner, D. (2015). Transcriptional programs regulated by both LEAFY and APETALA1 at the time of flower formation. *Physiologia Plantarum*, 155(1), 55–73. <https://doi.org/10.1111/ppl.12357>
- Xie, F., Wang, J., & Zhang, B. (2023). RefFinder: A web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes. *Functional & Integrative Genomics*, 23(2), 125. <https://doi.org/10.1007/s10142-023-01055-7>
- Xing, D., Zhao, H., Xu, R., & Li, Q. Q. (2008). *Arabidopsis* PCFS4, a homologue of yeast polyadenylation factor Pcf11p, regulates FCA alternative processing and promotes flowering time. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 54(5), 899–910. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03455.x>
- Xiong, F., Ren, J.-J., Yu, Q., Wang, Y.-Y., Lu, C.-C., Kong, L.-J., Otegui, M. S., & Wang, X.-L. (2019). AtU2AF65b functions in abscisic acid mediated flowering via regulating the precursor messenger RNA splicing of ABI5 and FLC in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 223(1), 277–292. <https://doi.org/10.1111/nph.15756>
- Xu, F., Li, T., Xu, P.-B., Li, L., Du, S.-S., Lian, H.-L., & Yang, H.-Q. (2016). DELLA proteins physically interact with CONSTANS to regulate flowering under long days in *Arabidopsis*. *FEBS Letters*, 590(4), 541–549. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12076>
- Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 225–251. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804>
- Zelinková V. (2024): Cílená mutagenéza génov *MMK2* a *MMK3* pomocou CRISPR-Cas9 a transformácia lucerny sitej (*Medicago sativa* L.) [Diplomová práca]. UPOL Olomouc, Česká republika
- Zeng, J., Dong, Z., Wu, H., Tian, Z., & Zhao, Z. (2017). Redox regulation of plant stem cell fate. *The EMBO Journal*, 36(19), 2844–2855. <https://doi.org/10.15252/embj.201695955>
- Zeng, Q. (2010). *DISSECTING MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE CASCADES INVOLVING ARABIDOPSIS MKK6*.
- Zeng, Q., Chen, J.-G., & Ellis, B. E. (2011a). AtMPK4 is required for male-specific meiotic cytokinesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 67(5), 895–906. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04642.x>
- Zeng, Q., Sritubtim, S., & Ellis, B. E. (2011b). AtMKK6 and AtMPK13 are required for lateral root formation in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*, 6(10), 1436–1439. <https://doi.org/10.4161/psb.6.10.17089>
- Zeng, X., Gao, Z., Gu, J., Qin, G., Ou, Y., Gao, Z., Wang, P., & He, Y. (2025). CK2 kinase-PRC2 signalling regulates genome-wide H3K27 trimethylation and transduces

- prolonged cold exposure into epigenetic cold memory in plants. *Nature Plants*, 11(8), 1572–1590. <https://doi.org/10.1038/s41477-025-02054-1>
- Zhang, Y., Hua, C., Kiang, J. X., & Shen, L. (2024). A dephosphorylation-dependent molecular switch for FT repression mediates flowering in Arabidopsis. *Plant Communications*, 5(3). <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2023.100779>
- Zhu, Y., Klasfeld, S., Jeong, C. W., Jin, R., Goto, K., Yamaguchi, N., & Wagner, D. (2020). TERMINAL FLOWER 1-FD complex target genes and competition with FLOWERING LOCUS T. *Nature Communications*, 11(1), 5118. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18782-1>
- Zografos, B. R., & Sung, S. (2012). Vernalization-mediated chromatin changes. *Journal of Experimental Botany*, 63(12), 4343–4348. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers157>

7.2 Hypertextové odkazy

URL1: BioRender. <https://app.biorender.com/> (25.8.2025)

URL2: ClustalW. <https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw> (8.11.2024)

URL3: eFPbrowser.

https://bar.utoronto.ca/efp2/Arabidopsis/Arabidopsis_eFPBrowser2.html (5.3.2025)

URL4: NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (20.1.2026)

URL5: SWISS-MODEL. <https://swissmodel.expasy.org/> (26.3.2026)

URL6: TAIR. <https://www.arabidopsis.org/index.jsp> (25.10.2024)

URL7: ThermoFisher Scientific Tm calculator. (25.10.2024)

URL8: Alfalfa toolbox. <https://medicago.legumeinfo.org/> (5.11.2024)

8 Zoznam skratiek

ABI2/4/5	z angl. „ABA-Insensitive 2/4/5“
ABFs/AREBs	z angl. „ABRE BINDING FACTORs/ABRE-BINDING
PROTEINs“	
AGL24	z angl. „AGAMOUS-LIKE 24“
AP1	z angl. „APETALA 1“
APS	z angl. „Ammonium persulfate“
AS	z angl. „alternative splicing“
bHLH	z angl. „basic helix-loop-helix“
BSA	bovínny sérový albumín
BFB	z angl. „bromophenolblue“
BR	brazinosteroidy
bZip	z angl. „BASIC LEUCINE ZIPPER“
BZR1	z angl. „BRASSINAZOLE RESISTANT 1“
CCA1	z angl. „CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1“
CcdB	z angl. „control of cell death“
CCT	(CONSTANS, CONSTANS-LIKE, TOC1 domain)
CD	doména z angl. „common docking domain“
CDF	z angl. „CYCLING DOF FACTORs“
CDPK6	vápnik závislá proteín kináza 6
CDS	z angl. „Coding Sequence“
CK2	kazein kináza CK2
CO	z angl. „CONSTANS“
COLD AIR	z angl. „COLD ASSISTED INTRONIC NONCODING RNA“
COOL AIR	z angl. „COLD INDUCED LONG ANTISENSE INTRAGENIC
RNA“	
COP1	z angl. „CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1“
CPL2	z angl. „C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE 2“
CPL3	z angl. „CTD PHOSPHATASE-LIKE 3“
CRISPR	z angl. „Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic
Repeats“	
cry2	krytochróm 2
DAT	deň po transformácii/transfére

DMSO	dimetylsulfoxid
DSP	duálne špecifická fosfatáza
DTT	dithiotreitol
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
EJC	z angl. „exon-junction complex)
EFM	z angl. „EARLY FLOWERING MYB PROTEIN“
EGTA	kyselina etylenglykol-2-bis(2-aminoetyleter)tetraoctová
FAC	florigen aktivujúci komplex
FER	z angl. „FERONIA“
FES1	z angl. „FRI ESSENTIAL 1“
FKF1	z angl. „FLOWERING KELCH FACTOR 1“
FLC	z angl. „FLOWERING LOCUS C“
Flg22	22 aminokyselín dlhý peptid pôvodom z flagelínu
FLX / FLX4	z angl. „FLC EXPRESSOR / FLC EXPRESSOR 4“
FLZ13	z angl. „FCS-LIKE ZINC FINGER PROTEIN 13“
FRI-C	komplex FRIGIDA-C
FRL1	z angl. „FRIGIDA-LIKE 1“
FT	z angl. „FLOWERING LOCUS T“
FUL	z angl. „FRUITFULL“
GA	kyselina giberelová
GAI	z angl. „GA-INSENSITIVE“
GENT	gentamycin
GFP	z angl. „green fluorescent protein“
GI	z angl. „GIGANTEA“
GID1	receptory giberelínov
gMPK13	gDNA sekvencia MPK13 génu
GO	z angl. „Gene Ontology“
HEPES	2-[4-(2-hydroxyetyl)piperazin-1-yl]etanesulfonová kyselina
IM	z angl. „inflorescence meristem“
JA	kyselina jasmónová
KAN	kanamycin
KIM motív	z angl. „Kinase Interacting Motif“
KO	z angl. „Knock-Out“
LB médium	Luria-Bertani

LD	z angl. „LUMINIDEPENDENS“
LFY	z angl. „LEAFY“
LHY	z angl. „LATE ELONGATED HYPOCOTYL“
LKP2	z angl. „LOV KELCH PROTEIN 2“
lncRNA	dlhá nekódovacia RNA
MAPK / MPK	Mitogen-Aktivovaná Proteín Kináza
MAPKK	Mitogen-Aktivovaná Proteín Kináza Kináza
MAPKKK	Mitogen-Aktivovaná Proteín Kináza Kináza Kináza
MBP	z angl. „Myelin Basic Protein“
MS	Murashige & Skoog
NF-Y	z angl. „Nuclear Factor Y“
NMD	z angl. „nonsense-mediated decay“
OMTK1	oxidatívnym stresom indukovaná MAPKKK
ORF	z angl. „Open Reading Frame“
OST1	z angl. „OPEN STOMATA 1“
OXI1	z angl. „Oxidative-Signal inducible 1“
PAGE	polyakrylamidová gélová elektroforéza
PCFS4	Protein for Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor 4
PCR	z angl. „Polymerase Chain Reaction“
PEPB	z angl. „phosphatidylethanolamine-binding protein“
phyA / phyB	fytochróm A / fytochróm B
PIF4	z angl. „PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4“
PP2A	fosfatáza PP2A
PP2C	proteínová fosfatáza 2C
PRC2	z angl. „POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX 2“
PRR	z angl. „PSEUDORESPONSE REGULATOR“
PSP	serín-threonínová fosfatáza
PTP	proteín tyrozínová fosfatáza
PYR/PYL/RCAR	z angl. „PYRABACTIN RESISTANCE PROTEINS/PYR-LIKE PROTEINS/REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTOR“
RAK10	z angl. „Raf-like kináza 10“
RAV1	z angl. „Related to ABI3/VP1“
REF6	z angl. „RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6“
RGA / RGL1-3	z angl. „REPRESSOR OF ga1-3 / RGA-LIKE“

ROS	reaktívna forma kyslíku
RPM	z angl. „rotation per minute“
RSY	Regen SY
RT-PCR	z angl. „Real-Time Polymerase Chain Reaction“
SAM	z angl. „shoot apical meristem“
SDS	dodecylsulfát sodný
SEP3	z angl. „SEPALLATA 3“
SF1	zostrihový faktor 1
SK12	z angl. „SHAGGY-like kinase 12“
SLY1	z angl. „SLEEPY1“
SOC1	z angl. „SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF
CONSTANS 1“	
SPE	spektinomycin
SPL	z angl. „SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-
LIKE“	
SUF4	z angl. „SUPPRESSOR OF FRIGIDA 4“
SVP	z angl. „SHORT VEGETATIVE PHASE“
TAE	tlmivý roztok s kyselinou octovou, EDTA a Tris-bázou
TBS	z angl. „Tris Buffer Saline“
TBS-T	z angl. „Tris Buffer Saline with Tween-20“
TCP	z angl. „Teosinte Branched 1/Cycloidea/Proliferating Cell Factor“
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin
TF	transkripčný faktor
TFL1	z angl. „TERMINAL FLOWER 1“
TMF	z angl. „TERMINATING FLOWER“
U2AF	z angl. „U2 pomocný faktor“
VIN3	z angl. „VERNALIZATION INSENSITIVE 3“
VNTR5	z angl. „Variable Number of Tandem Repeats 5“
YFP	žltý fluorescenčný proteín (z angl. „yellow fluorescent protein“)
ZTL	z angl. „ZETLUPE“

9 Zoznam príloh

Príloha 1: 9.1 Metodické prílohy

Príloha 2: 9.2 Výsledkové prílohy

9.1 Príloha 1: Metodické prílohy

9.1.1 Protokol ku kitu „Nucleo spin gel and PCR clean up“

K produktu v minimálnom objeme 50 μ l bol pridaný dvojnásobný objem roztoku NTI. Vzorky sa preniesli na kolonku vloženú do kolekčnej tuby a centrifugovali sa 30 sekúnd pri 11 000 g. Po odstránení stečeného roztoku sa na kolonku pridalo 700 μ l NT3 roztoku obsahujúceho etanol a opätovne sa centrifugovalo za rovnakých podmienok. Tento krok sa zopakoval ešte raz. Na úplné odstránenie zvyškov roztoku nasledovala centrifugácia trvajúca 1 minútu pri 11 000 g. Kolonky v kolekčných tubách sa následne umiestnili na 2 minúty do termobloku pri teplote 70 °C. Po tomto kroku boli kolonky vložené do nových Eppendorf skúmaviek, na kolonku sa pridalo 30 μ l roztoku NE a vzorky sa centrifugovali 1 minútu pri 11 000 g. Finálne prečistený PCR produkt bol uskladnený pri -20 °C a následne využitý na klonovanie.

V prípade prečistenia produktu vyrezaného z agarózového gélu bol postup nasledujúci. Vyrezaný kúsok agarózového gélu bol v eppendorf skúmavke zvážený a bol k nemu pridaný 2-násobný objem NTI pufru (na 1 mg gélu odpovedajú 2 μ l NTI pufru). Následne bola eppendorf skúmavka inkubovaná počas 5-10 minút v termobloku pri teplote 50°C za občasného premiešania až do úplného rozpustenia gélu. Nasledovalo naniesenie objemu skúmavky na kolonku a centrifugácia pri 11 000 g počas 30 sekúnd za účelom zachytenia DNA na membráne. Eluát bol spätne nanosený na kolonku a proces bol zopakovaný ešte 2 krát. Nasledovalo premytie kolonky NT3 pufrom (700 μ l) s obsahom etanolu a centrifugácia 30 sekúnd pri 11 000 g. Po odstránení eluátu bola ďalším krokom bola centrifugácia kolonky bez pridania akéhokoľvek roztoku za účelom odstránenia prebytočného etanolu (30 sek, 11 000 g). Potom prebehla inkubácia v termobloku pri 70 °C počas 3 minút za účelom odparenia etanolu. V tomto kroku bola v skúmavke v termobloku taktiež zahriata PCR voda, ktorá bola následne nanosená na kolonku v objeme 30 μ l. Po inkubácii o 30 sekúnd bola kolonka centrifugovaná (1 min, 11 000 g) a eluát s obsahom prečisteného PCR produktu bol uskladnený na -20 °C.

9.1.2 Molekulárne klonovanie metódou „Multisite Gateway“

Samotný princíp klonovania je postavený na rekombinácii medzi špecifickými *att* sekvenciami, ktoré sú prítomné na PCR produktoch a vektoroch (plazmidoch). Po doplnení rekombinačných miest k cieľovému génu a následnom prečistení PCR

fragmentov sa pripravujú vstupné klony prostredníctvom BP reakcie katalyzovanej enzýmom Gateway® BP Clonase® II. Do tejto reakcie vstupuje 50 fmol PCR produktu spolu s ekvivalentným množstvom (50 fmol) prázdneho donorového vektora. Správnosť vloženia génu do vektora sa následne potvrdzuje restriktčnou analýzou a sekvenovaním, ktoré zároveň overuje zachovanie otvoreného čítacieho rámca (open reading frame, ORF). Na ďalší krok – LR rekombináciu – sa používa enzým LR Clonase® Plus Enzyme, pričom reakčná zmes obsahuje 20 fmol destinačného vektora spolu so vstupnými klonmi: 10 fmol pre fragment A, 10 fmol pre fragment B a 10 fmol pre fragment C. Pri jednokomponentovej LR reakcii sa namiesto toho používa 150 ng vstupného klonu a rovnaké množstvo (150 ng) destinačného vektora.

9.1.3 Agarózová gélová elektroforéza

Príprava vzoriek na elektroforézu spočívala v zmiešaní 1 µl 6xLoadingDye (LD), 1 µl vzorky a 4 µl PCR H₂O, pričom po dôkladnom premiešaní bol získaný objem 6 µl. Ten sa následne nanášal do jamiek agarózového gélu pomocou automatickej pipety. Prípadne podľa potreby bol na gél nanesený celý objem PCR reakcie a to za použitia 6xLoadingDye tak aby finálna koncentrácia 6xLD predstavovala po zmiešaní s PCR produktom 1x. Ako veľkostný marker bol v krajných jamkách použitý štandard GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder v objeme 1,5 µl.

9.1.4 PCR za účelom klonovania metódou „Multisite Gateway“ (príprava pre BP reakciu)

Na tento účel sa využili dve sady primerov. Každý z primerov pozostával z 18–25 bp komplementárnych k cieľovej sekvencii a zároveň niesol 22–25 bp dlhý úsek zodpovedajúci *attB* sekvencii, ktorá je potrebná pre následnú rekombináciu do príslušného vektora. Obe sady pozostávali z forward a reverse primeru. Pre vstupný klon A bola použitá dvojica primerov, kde forward primer niesol *attB4* miesto a reverse primer *attB1* miesto. V prípade fragmentu B išlo o primerovú dvojicu obsahujúcu forward primer s *attB1* miestom a reverse primer s *attB2* miestom a v neposlednom prípade primer dvojice pre vstupný klon C obsahoval forward primer s miestom *attB2* a reverse primer s *attB3* miestom (Tab. 17).

Primery bolo potrebné najskôr nariediť na zásobnú koncentráciu 100 µmol/l a následne na pracovnú koncentráciu 10 µmol/l pomocou PCR H₂O. Reakčná zmes bola pripravená

tak, aby finálny objem jednej PCR reakcie bol 50 µl a zloženie 1 reakcie je uvedené v tabuľke č. 18. Reakčné zmesi boli vložené do termocykléru T100™ Thermal Cycler a PCR prebehla podľa programu uvedeného v tabuľke č. 19.

Získané PCR produkty boli overené pomocou gélovej elektroforézy a následne boli pozitívne PCR vyrezané z agarozového gélu za pomoci UV iluminátora. Následne prebiehalo prečistenie pomocou kitu NucleoSpin Gel and PCR Clean-up.

9.1.5 BP a LR reakcie

BP reakcia prebieha medzi *attB* sekvenciami prítomnými na PCR produkte a *attP* sekvenciami na donorovom vektore. Výsledkom je vznik vstupného klonu (entry klon) s inzertom (PCR produktom) a novovytvorenými rekombinačnými miestami označovanými ako *attL* a *attR*. Na uskutočnenie reakcie bol použitý enzým Gateway® BP Clonase® II. Finálny objem reakčnej zmesi bol 10 µl a pozostával z PCR H₂O, prečisteného PCR produktu, donorového vektora a 2 µl enzýmu. Množstvo PCR produktu aj donorového plazmidu zodpovedalo 50 fmol.

Inkubácia prebiehala v PCR skúmavke pri teplote 25 °C počas noci (približne 16 hodín). Reakcia sa ukončovala pridaním 1 µl proteinázy K (súčasť kitu) a následnou 10-minútovou inkubáciou pri 37 °C. Takto pripravené produkty BP reakcie sa využili na transformáciu chemokompetentných buniek *E. coli* kmeňov TOP10 alebo DH5α. Po transformácii sa baktérie selektovali na Petriho miskách s LB médiom obsahujúcim príslušné antibiotiká. Za účelom overenia prítomnosti transformovaného plazmidu bol určitý vybraný počet kolónii bol následne naočkovaný do tekutého LB média s obsahom príslušného selekčného antibiotika. Skúmavky boli kultivované počas noci pri 37°C a 200 rpm. Izolované plazmidy metódou P1P2P3 sa ďalej analyzovali restričným štiepením, elektroforézou a po vyhodnotení pozitívneho štiepneho vzoru boli dané plazmidy prečistené, osekvenované a použité pre LR reakcie.

Na rozdiel od BP reakcie, LR reakcia prebieha medzi rekombinačnými miestami *attL* a *attR*. Tento proces zabezpečuje vloženie vstupných klonov a ich DNA fragmentov do destinačného vektora v správnej orientácii, čím vzniká expresný vektor. Rekombinácia bola uskutočnená pomocou enzýmu Gateway® LR Clonase® Enzyme. Celkový objem reakcie bol opäť 10 µl, pričom reakčná zmes obsahovala PCR H₂O, tri vstupné klony (každý v množstve 10 fmol), destinačný vektor (20 fmol) a 2 µl enzýmu. Reakcia

prebiehala v termocykléry pri teplote 25 °C počas noci. Ukončenie reakcie a inaktivácia enzýmu sa vykonávali rovnakým spôsobom ako pri BP reakcii. Produkt LR reakcie bol využitý na transformáciu elektrokompetentných buniek *E. coli*. Transformované bunky boli selektované ako v prípade BP reakcie

9.1.6 Prečistenie pDNA kitom Qiaprep

Pomocou tohto kitu boli vzorky prečistené za ďalším účelom sekvenácie alebo nasledujúcich krokov klonovania. K 50 µl vzorky bolo pridaných 250 µl PB pufru a celý obsah sa po premiešaní pipetou naniesol na kolonku. Prebehla centrifugácia na stolnej centrifúge počas 1 minúty a za podmienok 15 600 g. Eluát bol pomocou automatickej pipety opäť prenesený na kolonku a opäť prebehla centrifugácia za rovnakých podmienok. Proces bol opakovaný dokopy 4 krát, potom bol eluát odstránený a kolonka bola 2 krát premytá 750 µl PE pufru pri centrifugácii za rovnakých podmienok ako v prípade väzby DNA na membránu. Následne prebehla elúcia 30 µl PCR vody do čistej 1,5 ml Eppendorf skúmavky.

9.1.7 Izolácia pDNA protokolom P1P2P3

Zo skúmavky s narastenou kultúrou sa odliali 2 ml do Eppendorf skúmavky. Vzorky sa centrifugovali 2 minúty pri 9800 g pri laboratórnej teplote. Po centrifugácii bol supernatant starostlivo odstránený a k peletu sa pridal nový objem LB kultúry. Následne sa centrifugácia zopakovala za rovnakých podmienok. Celkový objem použitej bakteriálnej kultúry predstavoval 4 ml tekutého LB média.

Po odstránení supernatantu sa k peletu pridalo 300 µl P1 roztoku doplneného RNAázou A (1 µl/ml). Pelet sa dôkladne resuspendoval pomocou vortexu a do zmesi sa následne pridalo 300 µl P2 roztoku. Skúmavky boli jemne prevrátené približne 10-krát a inkubované najviac 5 minút pri laboratórnej teplote. Po tomto kroku sa do vzoriek pridalo 300 µl predchladeného P3 roztoku, skúmavky sa opäť 10-krát prevrátili a počas 5 minút inkubovali na ľade.

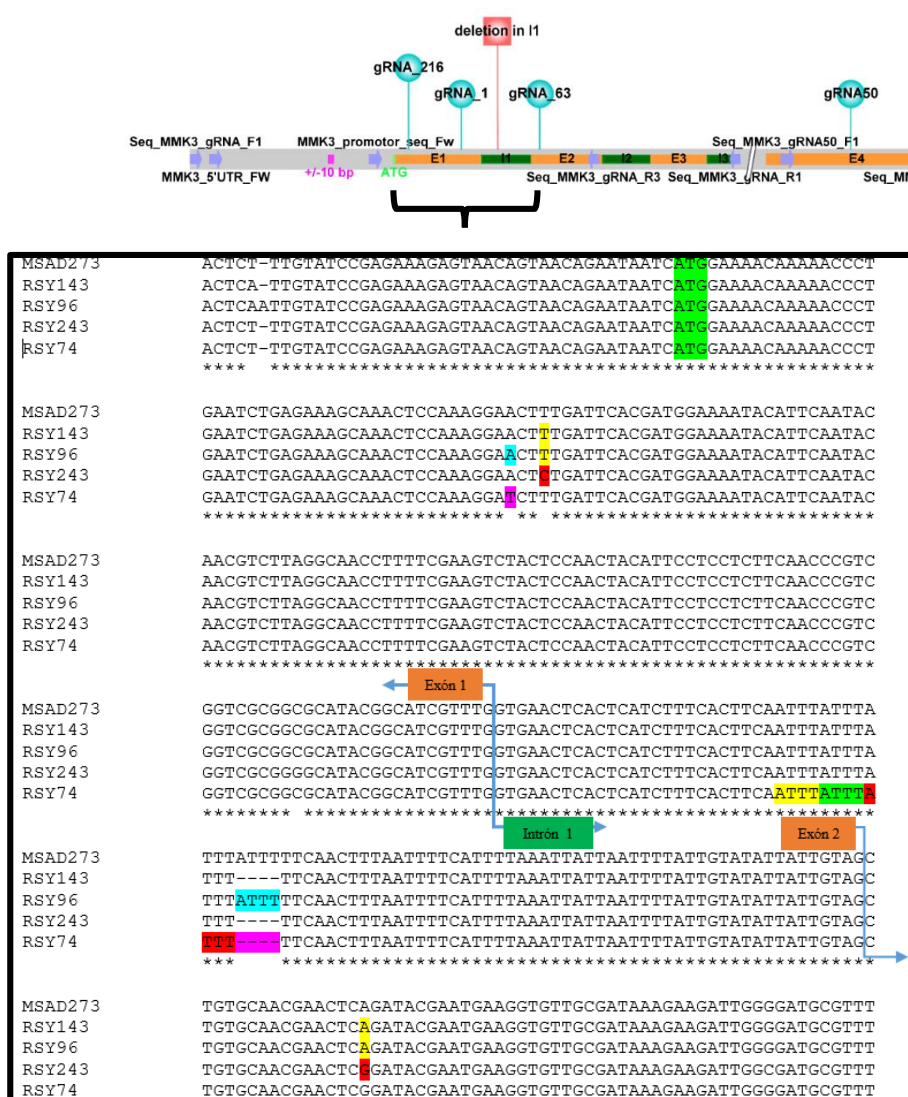
Vzorky boli následne centrifugované 15 minút pri 16 000 g a 4 °C. Získaný supernatant sa odobral automatickou pipetou a preniesol do čistej 1,5 ml Eppendorf skúmavky obsahujúcej 600 µl 100 % izopropanolu. Po 5-minútovej inkubácii pri laboratórnej teplote nasledovala centrifugácia počas 20 minút pri 16 000 g pri izbovej teplote. Supernatant bol odstránený a k peletu sa pridalo 750 µl vychladeného 75 % etanolu na premytie. Po

odlepení peletu od steny skúmavky prebehla ďalšia centrifugácia (5 minút, 16 000 g, laboratórna teplota). Supernatant sa znovu odstránil a zvyšky etanolu boli odsaté pipetou.

Pelet sa nechal dosušiť v otvorenej skúmavke na vzduchu a následne sa resuspendoval v 50 µl PCR H₂O. Takto pripravené vzorky sa uchovávali na ľade alebo boli uskladnené pri -20 °C. Plazmidová DNA izolovaná týmto postupom však obsahuje nečistoty vo forme degradovaných RNA fragmentov a pre ďalšiu analýzu ich je potreba prečistiť.

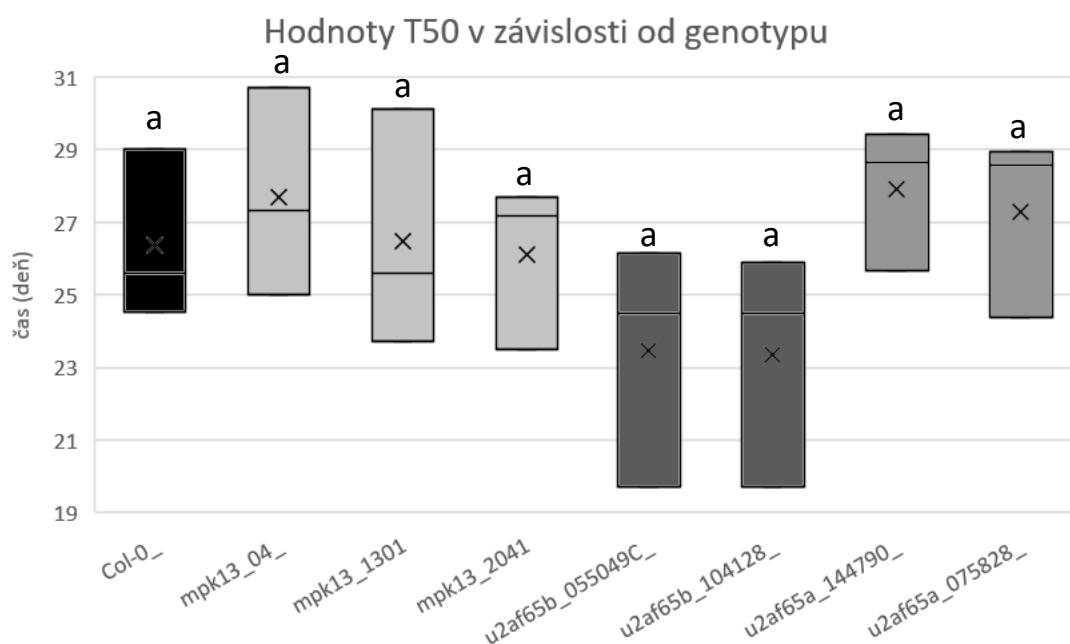
9.2 Príloha 2: Výsledkové prílohy

9.2.1 Prirovnávanie sekvencií

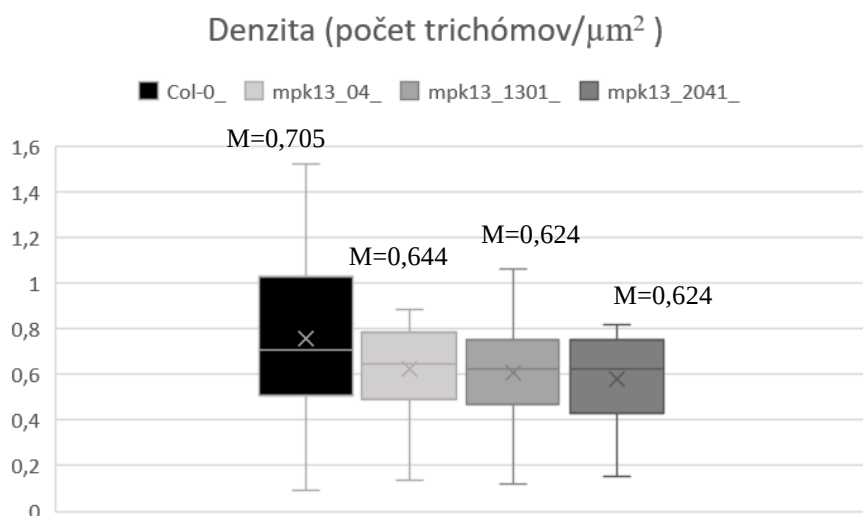


Obr. P1: Prirovnávanie jednotlivých sekvencií a ich priradenie ku konkrétnej oblasti génu. SNP vyznačené farebne slúžili pre identifikáciu jednotlivých alel v jednotlivých klonoch použitých pre sekvenáciu. Sekvencia označená ako MSAD273 bola poskytnutá školiteľom ako referenčná, s ktorou bolo pracované doposiaľ aj počas bakalárskej práce.

9.2.2 Fenotypové analýzy



Obr. P2: Graf zobrazujúci vyhodnotenie hodnoty T50 na základe „surových“ dát doby kvitnutia jednotlivých genotypov.



Obr. P3: Graf zobrazujúci vyhodnotenie denzity trichómov prvých dvoch pravých listov jednotlivých línii *A. thaliana*. Počet použitých listov pre jednotlivé genotypy: $n(\text{Col-0})=20$, $n(\text{mpk13-04})=22$, $n(\text{mpk13-1301})=22$, $n(\text{mpk13-2041})=25$. Analýza štatistickým testom One way ANNOVA nepreukázala štatisticky významný rozdiel medzi líniami.