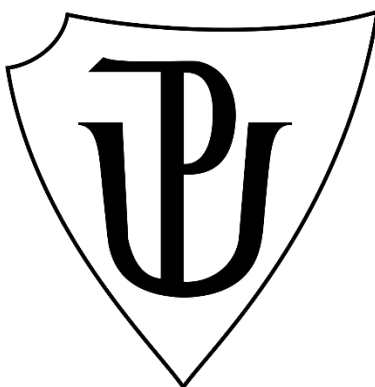


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



Cílená mutagenéza génov *MMK2* a *MMK3* pomocou CRISPR/Cas9 a transformácia lucerny siatej (*Medicago sativa* L.)

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor:	Bc. Veronika Zelinková
Študijný program:	N0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství
Špecializácia:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma štúdia:	Prezenční
Vedúci práce:	prof. RNDr. Jozef Šamaj, DrSc.
Konzultantka:	Mgr. Michaela Tichá, Ph.D
Rok:	2024

Vyhlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne pod vedením školiteľa a konzultantky 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 zoznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa

.....

Podpis študenta

„Moje poďakovanie patrí vedúcemu mojej diplomovej práce, prof. RNDr. Jozefovi Šamajovi, DrSc., za jeho pomoc a ústretovosť počas vypracovania tejto práce a tiež za možnosť pracovať v laboratóriu a využívať všetky zariadenia a prístroje. Rada by som tiež poďakovala konzultantke Mgr. Michaelle Tichej, Ph.D. za všetku pomoc počas experimentov a za konzultácie. Ďalej by som chcela poďakovať Mgr. Ivanovi Luptovčiakovi, Ph.D., za pomoc s RT-qPCR metódou počas experimentu. Touto cestou by som sa ešte rada poďakovala všetkým zamestnancom na Katedre biotechnológií, ktorí boli vždy veľmi ochotní mi poradiť alebo pomôcť. Táto práca bola podporená študentským projektom IGA_PrF_2023_015, „Vliv hladiny stresem-indukované mitogen-aktivované protein kinasy na odolnost vojtešky seté proti oxidativnímu stresu“.

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Bc. Veronika Zelinková
Názov práce	Cielená mutagenéza génov <i>MMK2</i> a <i>MMK3</i> pomocou CRISPR/Cas9 a transformácia lucerney siatej (<i>Medicago sativa</i> L.)
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Katedra biotechnológií
Vedúci práce	prof. RNDr. Jozef Šamaj, DrSc.
Konzultantka	Mgr. Michaela Tichá, Ph.D
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt

Mitogénom aktivované proteín kinázy (MAPK) sú enzýmy dôležité pre život eukaryotických buniek. Majú signalizačnú úlohu počas mnohých bunkových procesov, ale aj pri reakcii organizmov na rôzne podnety z okolia. Predkladaná diplomová práca je zameraná na *Medicago* MAPK 2 (*MMK2*) a *Medicago* MAPK 3 (*MMK3*) v poľnohospodársky významnej lucerne siatej (*Medicago sativa* L.). Tieto kinázy sa u lucerney podieľajú na signalizácii počas niektorých abiotických stresov a tiež v prítomnosti mikrobiálnych elicitorov. Okrem toho sa uvažuje o podiele týchto kináz na regulácii bunkového delenia. Prínosom pre štúdium MAPK u lucerney môže byť vyradenie génov *MMK2* a *MMK3* z funkcie. Pre cieľnú mutagenézu týchto génov v tetraploidnej lucerne bola zvolená technológia multiplex CRISPR/Cas9 („clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated protein 9“), teda systém zložený z úsekov prokaryotickej DNA, pozostávajúcich z krátkych palindromatických repetitívnych sekvencií pravidelne usporiadaných v klastroch a asociovaného proteínu Cas9. Tento multiplexný CRISPR/Cas9 systém je založený na simultánnej expresii viacerých navádzajúcich RNA zacielených súčasne na niekoľko miest v genóme organizmu. Expresia *Cas9* je v jednom variante pripravených CRISPR-KO vektorov pod kontrolou konštitutívneho promótoru, pričom druhý variant obsahuje chemicky-inducibilný promótor, ktorý môže eliminovať možné nežiaduce následky konštitutívnej nadexpresie *Cas9*. Vzhľadom na to, že tento inducibilný systém nebol ešte použitý u lucerney siatej, boli v rámci tejto diplomovej práce optimalizované podmienky pre jeho praktické využitie. Za účelom cielenej mutagenézy génov *MMK2* a *MMK3*, boli CRISPR-KO vektory stabilne transformované do listových explantátov

lucerny siatej. Pripravené transgénne línie môžu byť v budúcnosti využité pre ďalšie analýzy s cieľom vyhodnotiť úspešnosť cielej mutagenézy génov *MMK2* a *MMK3*.

Kľúčové slová *Medicago sativa*, mitogénom aktivovaná proteín kináza 2 v *Medicago*, mitogénom aktivovaná proteín kináza 3 v *Medicago*, multiplex CRISPR/Cas9, chemicky-indukovateľná expresia.

Počet strán 97

Počet príloh 5

Jazyk slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Veronika Zelinková
Title	Targeted mutagenesis of <i>MMK2</i> and <i>MMK3</i> genes using CRISPR/Cas9 and transformation of alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.)
Type of thesis	Diploma
Department	Department of Biotechnology
Supervisor	Prof. RNDr. Jozef Šamaj, DrSc.
Consultant	Mgr. Michaela Tichá, Ph.D
The year of presentation	2024

Abstract

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are enzymes important for the life of eukaryotic cells. They have a signalling role in many cellular processes, but also in the response of organisms to various environmental stimuli. This thesis focuses on *Medicago* MAPK 2 (*MMK2*) and *Medicago* MAPK 3 (*MMK3*) in the agriculturally important crop alfalfa (*Medicago sativa* L.). These two kinases are involved in alfalfa cellular signaling to some abiotic stresses and also to the presence of microbial elicitors. In addition, the involvement of the kinases in the regulation of cell division is considered. The knockout of the *MMK2* and *MMK3* genes may be beneficial for the study of MAPKs in alfalfa. The multiplex CRISPR/Cas9 ("clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated protein 9") technology was chosen for targeted mutagenesis of these two genes in tetraploid alfalfa. It represents a system composed of sections of prokaryotic DNA consisting of short palindromic repeat sequences arranged regularly in clusters and the associated Cas9 protein. Such multiplex CRISPR/Cas9 system is based on the simultaneous expression of multiple guide RNAs simultaneously targeting several sites in the genome of an organism. *Cas9* expression is under the control of a constitutive promoter in one variant of the prepared CRISPR-KO vectors, while the other variant contains a chemically-inducible promoter that can eliminate the possible undesirable consequences of constitutive overexpression of *Cas9*. Such inducible system has not yet been used in alfalfa so far, therefore conditions for its practical use were optimized in this thesis. For the purpose of targeted mutagenesis of *MMK2* and *MMK3* genes, CRISPR-KO vectors were stably transformed into alfalfa leaf explants. The transgenic alfalfa lines

regenerated through somatic embryogenesis can be used for future analyses evaluating the success of targeted mutagenesis of *MMK2* and *MMK3* genes.

Keywords *Medicago sativa*, mitogen-activated protein kinase 2 in *Medicago*, mitogen-activated protein kinase 3 in *Medicago*, multiplex CRISPR/Cas9, chemically-inducible expression.

Number of pages 97

Number of appendices 5

Language Slovak

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	2
2.1	Mitogénom aktivované proteín kinázy	2
2.1.1	<i>Medicago</i> MAPK 2 (MMK2)	2
2.1.2	<i>Medicago</i> MAPK 3 (MMK3)	3
2.1.3	MMK2 a MMK3 v podmienkach abiotického stresu	3
2.2	MAPK v <i>Medicago</i> spp. počas interakcií s mikroorganizmami	5
2.2.1	Úloha MAPK v <i>Medicago</i> spp. počas interakcie s baktériami rodu <i>Sinorhizobium</i>	5
2.2.2	MAPK lucerny aktivované elicitorami mikroorganizmov	6
2.3	Systém CRISPR/Cas9 a jeho modifikácie	6
2.3.1	Využitie modifikovaných CRISPR/Cas9 technológií	11
2.3.2	Inducibilná CRISPR/Cas9 editácia genómu rastlín	12
2.4	Multiplexná technológia CRISPR/Cas9	14
2.4.1	Zlepšovanie vlastností rastlín pomocou multiplexnej CRISPR/Cas9 technológie	15
2.5	Selekcia transgénnych rastlín	18
2.6	Analýza úspešnosti CRISPR/Cas9 editácie genómu rastlín	19
2.6.1	Analýza editovanej DNA	19
2.6.2	Sledovanie miery expresie génov pomocou kvantitatívnej PCR v reálnom čase	22
2.6.3	Fenotypová analýza mutantných rastlín	23
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	24
3.1	Materiál	24
3.1.1	Biologický materiál	24
3.1.1.1	Rastlinný materiál	24
3.1.1.2	Baktérie	24
3.1.1.3	Plazmidy	25
3.1.2	Chemikálie	26

3.1.3	Kultivačné médiá	27
3.1.4	Roztoky a pufry	29
3.1.5	Kity	31
3.1.6	Použité restričné endonukleázy	31
3.1.7	Použité primery	31
3.2	Prístroje	32
3.3	Software	33
3.4	Metódy	34
3.4.1	Návrh gRNA pre mutagenézu <i>MMK3</i>	34
3.4.2	Príprava dvojvláknových oligonukleotidov obsahujúcich gRNA	35
3.4.3	„Golden Gate“ klonovanie gRNA do príslušných akceptorových vektorov	36
3.4.4	Príprava finálnych multiplexných CRISPR-KO vektorov.....	37
3.4.4.1	Dizajn klonovania	37
3.4.4.2	„Green Gate“ klonovanie multiplexných CRISPR-KO vektorov pre mutagenézu <i>MMK2</i> a <i>MMK3</i>	37
3.4.6	Transformácia chemokompetentných buniek <i>E. coli</i>	39
3.4.7	Kultivácia baktérii <i>E. coli</i> , selekcia kolónii obsahujúcich požadovaný konštrukt a izolácia plazmidovej DNA.....	39
3.4.8	Overovanie konštruktov restričným štiepením	39
3.4.9	Gélová elektroforéza a izolácia DNA z agarového gélu.....	40
3.4.10	Transformácia chemokompetentných buniek <i>A. tumefaciens</i> (kmeň GV3101)	40
3.4.11	Metóda colony PCR.....	41
3.4.12	Príprava nočnej kultúry <i>A. tumefaciens</i>	42
3.4.13	Tranzientná transformácia listov <i>N. benthamiana</i>	42
3.4.14	Konfokálna laserová skenovacia mikroskopia	42
3.4.15	Príprava bakteriálnych konzerv	43
3.4.16	Príprava kultivačných médií	43
3.4.17	Stabilná transformácia lucerny siatej a regenerácia rastlín pomocou somatickej embryogenézy.....	43
3.4.17.1	Sterilizácia listov lucerny siatej	45

3.4.17.2	Stabilná transformácia listových explantátov lucerny siatej.....	45
3.4.17.3	Kultivácia lucerny siatej na B5H médiu	45
3.4.17.4	Kultivácia lucerny siatej na B50 médiu	46
3.4.17.5	Kultivácia lucerny siatej na MMS médiu.....	46
3.4.17.6	Kultivácia lucerny siatej na MS médiu	46
3.4.18	Selekcia transgéennej lucerny siatej obsahujúcej multiplexné CRISPR-KO vektory	46
3.4.19	Genotypizácia transgéennej lucerny siatej pomocou PCR.....	46
3.4.20	Optimalizácia kultivačných podmienok pre indukciu expresie systému CRISPR-KO regulovaného chemicky-indukovateľným promótorom	48
3.4.21	Izolácia mRNA	48
3.4.22	Prepis RNA do komplementárnej DNA (cDNA)	50
3.4.23	PCR pre overenie navrhnutých primerov	51
3.4.24	Kvantitatívna PCR v reálnom čase („real-time quantitative PCR“, RT-qPCR).....	52
3.4.25	Izolácia genómovej DNA a amplifikácia požadovaných úsekov	53
4	VÝSLEDKY	55
4.1	Príprava gRNA pre mutagenézu génu <i>MMK3</i>.....	55
4.1.1	Návrh gRNA	55
4.1.2	Klonovanie molekúl gRNA pre mutagenézu génu <i>MMK3</i>	57
4.2	Finalizácia multiplexných CRISPR-KO vektorov pre mutagenézu génov <i>MMK2</i> a <i>MMK3</i>	58
4.2.1	Overenie správnosti prípravy multiplexných CRISPR-KO vektorov prostredníctvom restriktívneho štiepenia	61
4.3	Potvrdenie úspešnej transformácie multiplexných CRISPR-KO vektorov do <i>A. tumefaciens</i> prostredníctvom „colony PCR“.....	62
4.4	Overenie funkčnosti multiplexných CRISPR-KO vektorov.....	63
4.5	Regenerácia lucerny siatej po stabilnej transformácii multiplexnými CRISPR-KO vektormi	64
4.5.1	Potvrdenie prítomnosti transgéenného konštruktu u lucerny pomocou PCR..	65

4.6	Indukcia expresie chemicky-indukovateľného CRISPR-KO konštruktú v transgéennej lucerne	66
4.7	Selekcia transgénnych rastlín	70
4.8	Sledovanie expresie <i>MMK2</i> a <i>MMK3</i> génov v transgénnych rastlinách..	74
5	DISKUSIA	77
6	ZÁVER.....	80
7	LITERATÚRA	82
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	91
9	PRÍLOHY	93

CIELE PRÁCE

Teoretická časť

1. Charakteristika a funkcie mitogénom aktivovaných proteín kináz (MAPK) MMK2 (*Medicago* MAPK2) a MMK3 (*Medicago* MAPK3) v lucerne siatej (*Medicago sativa* L.).
2. Úloha MAPK počas interakcií *Medicago* spp. s prospešnými a patogénnymi mikroorganizmami.
3. Modifikácie systému CRISPR/Cas9 a ich využitie.
4. „Multiplexné“ technológie pre editáciu genómu rastlín a zlepšovanie vlastností plodín.
5. Metódy selekcie a analýzy mutovaných rastlín pripravených pomocou CRISPR-KO.

Praktická časť

1. Návrh gRNA pre mutagenézu *MMK3* génu pomocou „multiplex CRISPR“.
2. Anelácia oligonukleotidov a klonovanie gRNA do vstupných vektorov pre mutagenézu génov *MMK2* a *MMK3*.
3. Príprava „multiplexných CRISPR-KO“ vektorov pozostávajúcich zo 4 gRNA.
4. Transformácia *Agrobacterium tumefaciens* CRISPR-KO vektormi a overenie ich funkčnosti.
5. Stabilná transformácia lucernej siatej „multiplexnými CRISPR-KO“ vektormi.
6. Optimalizácia kultivačných podmienok pre chemickú indukciu mutagenézy *MMK2* a *MMK3* génov v lucerne siatej.
7. Selekcia a analýza transgénnych línií lucernej siatej.

1 ÚVOD

Nakoľko dopad klimatických zmien či produkcie chemických prostriedkov a iných nežiaducich látok je na životné prostredie čoraz výraznejší, je nevyhnutné vyvíjať stratégie, ktoré umožnia zabezpečiť kvalitu a tiež stabilný výnos poľnohospodársky významných plodín. Jednou z týchto plodín je lucerna siata, ktorá si získala pozornosť aj v oblasti biotechnologického výskumu. Mitogénom aktivované proteín kinázy (MAPK) sú dôležitými molekulami pre signalizáciu v bunke, predovšetkým počas bunkových reakcií na mnohé stimuly alebo stresy z vonkajšieho alebo vnútorného prostredia (Komis et al., 2018; Zhang a Zhang, 2022).

Táto diplomová práca je zameraná na *Medicago* MAPK 2 (MMK2) a *Medicago* MAPK 3 (MMK3), ktoré u lucerny siatej majú signalizačné úlohy v prítomnosti elicitorov z kvasiniek a húb (Cardinale et al., 2000), a tiež pri vystavení ťažkým kovom, konkrétne zlúčeninám obsahujúcim kadmium alebo meď (Jonak et al., 2004). Okrem toho, MMK2 a MMK3 by mohli ovplyvňovať bunkové delenie u lucerny siatej. Jednou zo stratégií, pomocou ktorej sa dá prispieť k objasneniu funkcií týchto kináz, môže byť vyradenie *MMK2* a *MMK3* génov z funkcie (takzvaný „knock out“ alebo KO).

Zámerom tejto diplomovej práce bola mutagenéza génov *MMK2* a *MMK3* u lucerny siatej využitím „multiplexnej CRISPR/Cas9“ technológie. Táto vylepšená CRISPR/Cas9 technológia umožňuje zacielenie nukleázy Cas9 na niekoľko oblastí genómu súčasne, prostredníctvom viacerých navádzajúcich molekúl RNA („guide RNA“, gRNA; Xing et al., 2014).

V nadväznosti na bakalársku prácu, počas ktorej boli navrhnuté štyri gRNA pre mutagenézu *MMK2* a klonované destinačné CRISPR-KO vektory obsahujúce miesta pre kazety s gRNA, boli v rámci experimentálnej časti tejto diplomovej práce navrhnuté štyri gRNA pre mutagenézu *MMK3*. Ďalej boli pripravené „multiplexné CRISPR-KO“ vektory pre mutagenézu jednotlivých génov *MMK2* a *MMK3*. Expresia *Cas9* je vo vektoroch regulovaná prostredníctvom konštitutívneho alebo chemicky-inducibilného promótoru, závislého od prítomnosti glukokortikoidu dexametazón. Tento inducibilný systém expresie ešte nebol použitý u lucerny siatej, preto ďalším cieľom experimentu bola optimalizácia podmienok pre jeho praktické využitie. V tejto práci sa podarilo pripraviť transgénne línie lucerny siatej, ktoré bude možné využiť pre ďalšie analýzy s cieľom potvrdiť a charakterizovať mutagenézu génov *MMK2* a *MMK3*.

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 Mitogénom aktivované proteín kinázy

Mitogénom aktivované proteín kinázy (MAPK) sú fosforylačné enýmy, ktoré zohrávajú dôležité úlohy u kvasiniek, rastlín, živočíchov i človeka (Morrison, 2012). V rastlinách sa MAPK zúčastňujú ich reakcií na rozličné biotické a abiotické stresy. Môžu ovplyvňovať hormonálnu reguláciu, ale aj mnohé bunkové procesy ako je cytokinéza, rast alebo diferenciácia buniek (Komis et al., 2018). V súčasnosti je väčšina rastlinných MAPK charakterizovaná najmä v modelovom organizme *Arabidopsis thaliana* (Chen et al., 2017). Avšak, pre biotechnologický výskum zameraný na MAPK sú atraktívne i ďalšie rastlinné druhy (Šamajová et al., 2013), typickým príkladom je lucerna siata. V tejto poľnohospodársky významnej plodine bola dodnes preskúmaná podrobnejšie len funkcia stresom-indukovanej MAPK (SIMK) pri vývoji koreňových vláskov (Šamaj et al., 2002) a ich interakcii so *Sinorhizobium* (Hlaváčková et al., 2023), alebo pri abiotickom soľnom strese (Ovečka et al., 2014). K ďalším MAPK u lucerny patria aj *Medicago* MAPK 2 (MMK2) a *Medicago* MAPK 3 (MMK3).

2.1.1 *Medicago* MAPK 2 (MMK2)

MMK2 je enzým o molekulovej hmotnosti 43 kDa. V štúdií Jonak et al. (1995) sa zamerali na mitogénom aktivovanú proteín kinázu 1 (MPK1) v kvasinkách a pozorovali, že v prípade jej absencie došlo k poruchám vezikulárneho transportu i stavby bunkovej steny. To naznačuje, že MPK1 by sa mohla podieľať na regulácii cytoskeletu. Ďalej v tejto štúdií uviedli, že MMK2 špecificky nahradila funkciu mutovanej MPK1 v kvasinkách. Pri porovnávaní proteínových sekvencií týchto dvoch kináz zistili, že najkonzervovanejšie aminokyseliny ležia v oboch prípadoch v centrálnej oblasti, ktorá sa podieľa na katalýze prenosu fosfátovej skupiny.

MMK2 je najviac podobná enzýmu AtMPK4 z modelového rastlinného druhu *A. thaliana* (Tena et al., 2001). Aktivita AtMPK4 bola zaznamenaná v deliacich sa bunkách meristému koreňa a lokalizovaná bola v bunkovej prepážke (Kosetsu et al., 2010) a fragmoplaste (Beck et al., 2010). Zistilo sa, že *mpk4* mutant vykazoval signifikantné poruchy cytokinézy a mikrotubulov (Beck et al., 2010; Beck et al., 2011). Vychádzajúc z týchto poznatkov možno uvažovať, že by sa MMK2 tiež mohla podieľať na regulácii cytoskeletu a bunkového delenia u lucerny.

2.1.2 *Medicago* MAPK 3 (MMK3)

MMK3 je enzým s veľkosťou 44 kDa, ktorý do určitej miery vykazuje podobnosť s MMK2. Lokalizácia MMK3 bola v bunkách preukázaná počas všetkých štádií bunkového cyklu, ale zistilo sa, že k aktivácii tejto kinázy dochádza výhradne v priebehu mitózy. Bögre et al. (1999) dokázali, že MMK3 sa počas anafázy koncentruje medzi segregujúcimi sa chromozómami a neskôr je tento enzým lokalizovaný v stredovej rovine bunkového delenia.

Podľa Zhang et al. (2001) je MMK3 veľmi podobná s kinázou NtF6 v tabaku (*Nicotiana tabacum*). Túto skutočnosť potvrdili Calderini et al. (2001), nakoľko výsledky ich štúdie preukázali, že lokalizácia a tiež aktivácia kinázy NtF6 je rovnaká ako v prípade MMK3. Ortológom MMK3 v *A. thaliana* je pravdepodobne AtMPK13 (Ouaked et al., 2003; Jagodzic et al., 2018). Táto kináza bola lokalizovaná spolu s AtMKK6 v koreňovej špičke a v kvetných púčikoch (Melikant et al., 2004). Znížená expresia *AtMKK6* a *AtMPK13* viedla k zníženej tvorbe bočných koreňov, z čoho vyplýva, že ich expresia pravdepodobne súvisí s mitotickou aktivitou (Zeng et al., 2011). Preto možno uvažovať, že by MMK3 mohla ovplyvňovať proces bunkového delenia.

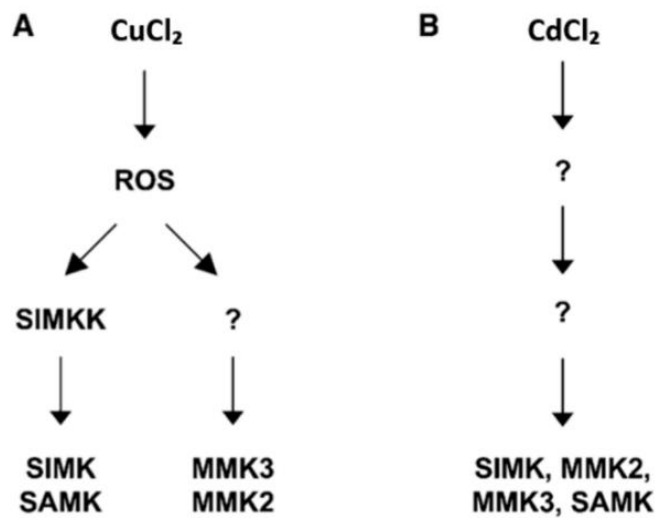
Ouaked et al. (2003) zistili, že MMK3 spoločne so SIMK môžu ovplyvňovať signalizačné dráhy etylénu. Tieto kinázy aktivuje aminocyklopropán-1-karboxylová kyselina (ACC), ktorá je prekursorom etylénu. SIMK a MMK3 potom ďalej aktivujú proteíny EIN2 a EIN3 („ETHYLEN-INSENSITIVE PROTEINS“), podieľajúce sa na indukcii expresie génov pod vplyvom etylénu.

K aktivácii MMK3 môže dochádzať aj počas oxidatívneho stresu. Nakagami et al. (2004) objasnili, ako peroxid vodíka aktivoval oxidatívnym stresom aktivovanú MAP3K (OMTK1) a tá potom špecificky aktivovala MMK3, čo viedlo k zvýšenému odumieraniu buniek u lucerny.

2.1.3 MMK2 a MMK3 v podmienkach abiotického stresu

MMK2 a MMK3 sa spoločne podieľajú na signalizácii u lucerny v podmienkach abiotického stresu, napríklad v prípade keď bunky reagujú na prítomnosť ťažkých kovov v pôde (Jonak et al., 2004). V uvedenej štúdiu bola popísaná zvýšená koncentrácia reaktívnych foriem kyslíka v prítomnosti iónov medi, na ktorú reagovala stresom-indukovaná MAPK kináza (SIMKK). Ako ukazuje Obrázok 1 (Obr. 1), táto nadradená kináza potom aktivovala SIMK spolu so stresom aktivovanou MAPK (SAMK), avšak priebeh aktivácie MMK2 a MMK3 v týchto podmienkach zatiaľ objasnený nebol.

Pre charakterizáciu týchto reakcií, ako aj identifikáciu komponentov aktivujúcich uvedené kinázy v prítomnosti iónov kadmia, sú potrebné ďalšie štúdie.



Obr. 1: Signalizačné kaskády u lucerny, ktoré vedú k aktivácii enzýmov MMK2, MMK3, SIMK a SAMK v prítomnosti ťažkých kovov. (A) Reaktívnymi formami kyslíka („reactive oxygen species, ROS“) sprostredkovaná aktivácia MMK2, MMK3, SIMK a SAMK v prítomnosti medi. (B) Aktivácia SIMK, SAMK, MMK2 a MMK3 v prítomnosti kadmia. Zdroj: Jonak et al. (2004), upravené.

2.2 MAPK v *Medicago* spp. počas interakcií s mikroorganizmami

O signálnych kaskádach sprostredkovaných MAPK, ktoré ovplyvňujú rast a vývoj bôbových rastlín rodu *Medicago* v rôznych podmienkach prostredia, sa dozvedáme len postupne (Purayannur et al., 2017; Komis et al., 2018). Pre štúdium zástupcov tohto rodu slúži predovšetkým modelový druh *Medicago truncatula*. Práve vďaka diploidnému genómu tohto druhu, ktorý bol už kompletne osekvenovaný (Tang et al., 2014), jeho krátkemu životnému cyklu a faktu, že je samoopelivý, možno napredovať vo výskume cudzoopelivých druhov s komplexným genómom, akým je *M. sativa* (Kaur et al., 2021). Okrem toho je *M. truncatula* vhodným organizmom pre štúdium nodulácie, teda tvorby hlúčok na koreňoch, ktoré poskytujú vhodné prostredie na fixáciu N₂ baktériami rodu *Sinorhizobium* (Oldroyd et al., 2011).

2.2.1 Úloha MAPK v *Medicago* spp. počas interakcie s baktériami rodu *Sinorhizobium*

Cieľom signalizačných kaskád v bôbových rastlinách môžu byť transkripčné faktory alebo proteíny, ktoré sú kľúčové pre symbiotické interakcie s prospešnými baktériami (Chen et al., 2017; Purayannur et al., 2017). V koreňoch *M. truncatula* boli fosfoproteomicou analýzou identifikované fosforylačné miesta na proteínoch, ktoré sa podieľajú na iniciácii symbiózy (Grimsrud et al., 2010). Jedným z nich je proteín IPD3 („INTERACTIG PROTEIN OF DMI3“), ktorý interaguje s proteín kinázou DMI3, ktorá je závislá na vápniku/kalmodulíne a je dôležitá pre samotný proces symbiózy (Messinese et al., 2007). Ďalej identifikovali fosforylačné miesta na proteíne SKL („SICKLE“), ortológom proteínu EIN2 v *A. thaliana*. Varma Penmetsa et al. (2008) zistili, že EIN2 je nevyhnutný pre etylénovú signalizáciu a negatívne ovplyvňuje tvorbu nodulov. Identifikovali tiež fosforylačné miesta na nukleoporíne NUP13, ktorý je nevyhnutný pre proces symbiózy, keďže sprostredkuje perinukleárnu osciláciu vápnika počas vývoja nodulov (Kanamori et al., 2006).

Ryu et al. (2017) neskôr uviedli, že stresom indukovaná signálna dráha MtMKK5-MtMPK3/6 negatívne ovplyvňuje interakcie medzi *M. truncatula* a *S. meliloti*. MtMPK3/6 negatívne regulujú transkripčné faktory *MtERN1* („ETHYLENE RESPONSE FACTOR REQUIRED FOR NODULATION 1“) a *MtNSP1* („NODULATION SIGNALING PATHWAY 1“), oba dôležité pre iniciáciu vytvárania nodulov. Zvýšená expresia MtMKK5 viedla okrem stimulácie stresových signálnych dráh tiež k zníženej

tvorbe nodulov. Naopak, inhibícia signálnej MAPK dráhy pomocou inhibítora U0126 mala za následok zvýšenú tvorbu nodulov.

Pre samotný proces nodulácie u lucerny je nevyhnutná prítomnosť koreňových vláskov. SIMK a jej aktivátor SIMKK (Kiegerl et al., 2000) majú dôležitú úlohu práve pri regulácii rastu koreňových vláskov (Šamaj et al., 2002). V tejto štúdii zistili, že SIMK sa po jej aktivácii presúva z jadra do špičky rastúcich koreňových vláskov. SIMK pravdepodobne fosforyluje niektorý z aktín-viažucich proteínov, ktoré ovplyvňujú reorganizáciu aktínového cytoskeletu počas rastu koreňových vláskov. Skutočnosť, že SIMK pozitívne ovplyvňuje rast koreňových vláskov potvrdili aj Hrbáčková et al. (2021), nakoľko konštitutívna nadexpresia SIMK viedla k lepšiemu rastu koreňových vláskov a k väčšej produkcii zelenej biomasy. Naopak, v SIMKK RNAi líniách, v ktorých dochádza k zníženej transkripcii *SIMKK* a *SIMK*, bol zaznamenaný znížený rast koreňových vláskov i menej biomasy (Hrbáčková et al., 2021).

2.2.2 MAPK lucerny aktivované elicitorami mikroorganizmov

Rastliny prirodzene prichádzajú do kontaktu s prospešnými a patogénnymi mikroorganizmami. Sú schopné rozpoznať rôzne elicitory charakteristické pre patogény, ktoré v rastlinách spúšťajú obranné mechanizmy (Montesano et al., 2003).

Podľa Cardinale et al. (2000) môžu niektoré elicitory mikroorganizmov, najmä kvasiniek a húb, aktivovať MMK2, MMK3, SIMK a SAMK. Jedným z týchto elicitorov je chitín, ktorý patrí medzi hlavné komponenty bunkovej steny húb (Khokhani et al., 2021). Konkrétne β -(1,3)-glukán, predstavujúci zložku chitínu (Gow et al., 2017), aktivoval všetky uvedené kinázy. Pritom SIMK a MMK2 dosahovali najvyššiu aktivitu už po 5 minútach od ošetrenia β -glukánom, zatiaľ čo MMK3 reagovala na prítomnosť β -glukánu o niekoľko minút neskôr.

Ďalším aktivátorom MAPK je ergosterol (Cardinale et al., 2000), najviac zastúpený sterol v bunkových membránach húb (Klemptner et al., 2014). Tento elicitor aktivoval SIMK, SAMK i MMK3, pričom MMK3 reagovala o niekoľko minút neskôr v porovnaní so SIMK a SAMK. Avšak, celková organizácia týchto signalizačných kaskád, vrátane aktivátorov a substrátov uvedených kináz, nebola doteraz objasnená.

2.3 Systém CRISPR/Cas9 a jeho modifikácie

V súčasnosti jedným z najviac využívaných nástrojov pre úpravu genetickej informácie je systém CRISPR/Cas9 (Janik et al., 2020; Tripathi et al., 2023). CRISPR („clustered regularly interspaced short palindromic repeats“) sú úseky prokaryotickej DNA objavené

v baktérii *Streptococcus pyogenes* (Ran et al., 2013), ktoré pozostávajú z krátkych palindromatických repetitívnych sekvencií pravidelne usporiadaných v klastroch. Spolu s CAS génmi („CRISPR-ASSOCIATED“) fungujú ako obranný mechanizmus na degradáciu cudzorodej DNA (Hryhorowicz et al., 2017). Pre účely génového inžinierstva sa používa upravený systém, skladajúci sa z dvoch kľúčových molekúl. Jednou je nukleáza Cas9, ktorá štiepi špecifickú sekvenciu DNA. Druhou je navádzajúca RNA („guide RNA, gRNA“) napodobňujúca prirodzený komplex tracrRNA:crRNA v baktériách, ktorého úlohou je nukleázu nasmerovať na cieľové miesto v genóme (Ran et al., 2013). Nevyhnutnou zložkou systému CRISPR/Cas je PAM sekvencia („protospacer adjacent motif“), ktorá je dôležitá práve pre rozpoznanie cieľovej DNA sekvencie nukleázou (Gleditsch et al., 2019). Postupne bolo objavených niekoľko ďalších typov tohto bakteriálneho imunitného systému (Makarova et al., 2020), ktoré sa líšia sekvenciami PAM (Mojica et al., 2009; Ran et al., 2013). Prítomnosť PAM sekvencie pozostávajúcej z nukleotidov NGG (N predstavuje akýkoľvek nukleotid) je typická pre systém CRISPR s nukleázou Cas9 (Ren et al., 2021).

Nevyhnutnosť špecifickej PAM sekvencie môže byť však v niektorých prípadoch limitáciou. Najmä v prípade, že je cieľová oblasť DNA určená pre editáciu bohatá na G/C alebo požadovanú PAM sekvenciu neobsahuje (Ren et al., 2021). Táto skutočnosť viedla k vývoju metódy CRISPR-SpRY (Obr. 2A) a spočívala v modifikácii nukleázy Cas9 cielenou mutáciou aminokyselín v doméne interagujúcej s PAM (Walton et al., 2020). Najprv bol pripravený variant nazvaný SpG, ktorý rozpoznával širšie spektrum PAM sekvencií. Ďalšou optimalizáciou vedci vyvinuli nukleázu SpRY, ktorá je schopná rozpoznať takmer všetky doposiaľ charakterizované PAM sekvencie (Walton et al., 2020; Riaz et al., 2022).

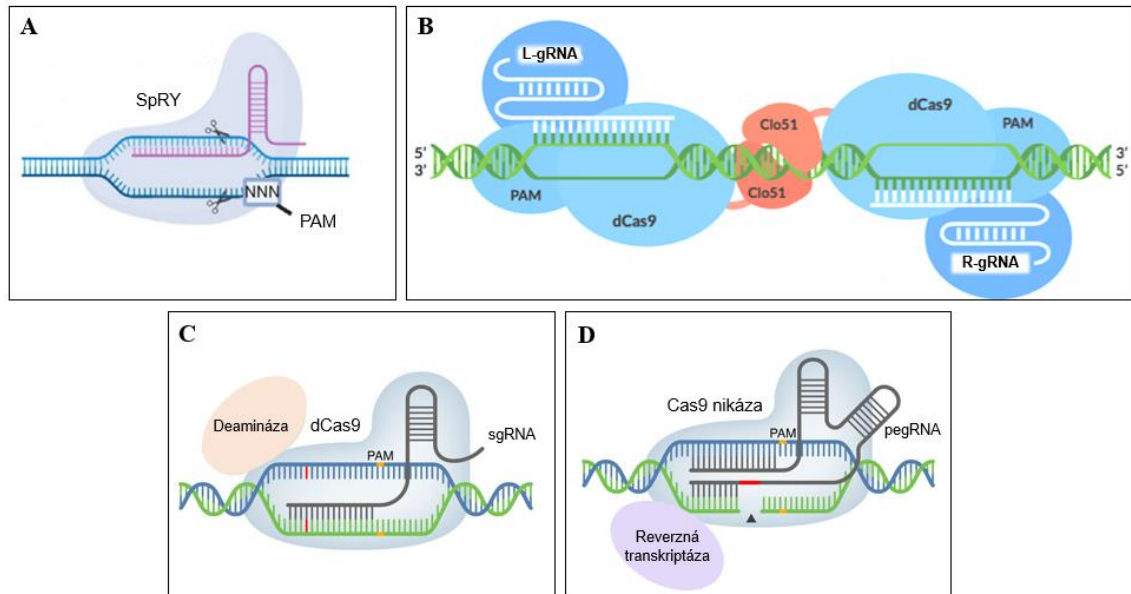
Novým vysoko špecifickým nástrojom pre úpravu genómu je Cas-Clover (Madison et al., 2022), ktorý je znázornený na Obr. 2B. Hlavným rozdielom oproti tradičnému systému CRISPR/Cas9 je skutočnosť, že táto technológia vyžaduje dve vodiace RNA pre nasmerovanie nukleázy Clo051. Clo051 je fúzny proteín zložený z inaktivovanej Cas9 nukleázy (dCas9) a Clo051 endonukleázy, ktorá štiepi cieľovú sekvenciu v genóme. Podmienkou pre tvorbu dvojitého zlomu vlákien DNA („double strand brake, DSB“) je dimerizácia podjednotiek tejto endonukleázy, nasmerovanej na vybrané miesto v genóme pomocou L-gRNA (ľavej gRNA) a R-gRNA (pravej gRNA). Pre správnu funkciu Cas-Clover musia byť však obidve gRNA navrhnuté a rozpoznané v špecifickej orientácii a tiež v určitej vzdialenosti od seba (Madison et al., 2022).

Nedávno bol vyvinutý systém CRISPR-Combo, pomocou ktorého je možná simultánna editácia genómu určitého organizmu a aktivácia vybraných génov. Aktiváciou kľúčových génov *WUS* („*WUSCHEL*“) či *WOX11* („*WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN11*“) pre morfogenezu u *A. thaliana* sa podarilo zrýchliť regeneráciu geneticky modifikovaných rastlín. Systém CRISPR-Combo bol zatiaľ otestovaný u ryže a javí sa ako perspektívny nástroj pre moderné šľachtenie plodín (Pan et al., 2022; Li et al., 2023).

Kombináciou procesu prirodzenej transformácie („natural transformation, NT“) a systému CRISPR/Cas9 bola vyvinutá metóda NT-CRISPR. Stukenberg et al. (2022) využili schopnosť morskej baktérie *Vibrio natriegens* inkorporovať DNA do svojho genómu pomocou homologickej rekombinácie. NT-CRISPR využili na tvorbu jednonukleotidových modifikácií, delécii a tiež na integráciu požadovanej sekvencie DNA. Následne zacieleni CRISPR/Cas9 na „wild-type“ sekvenciu génu, čo viedlo k odstráneniu buniek, ktoré transgén neobsahovali, s účinnosťou takmer 100 %. Okrem toho, že tento spôsob editácie a následnej selekcie nevyžaduje začlenené selekčných markerov, napr. génov rezistencie pre antibiotikum, táto metóda by mohla byť použitá aj na simultánne delécie viacerých chromozómových oblastí. Autori dokonca uviedli, že metóda je kompatibilná s modifikovanou Cas9 – SpG, čo by mohlo rozšíriť spektrum editovaných genómov (Stukenberg et al., 2022).

Mnohé genetické poruchy sú zapríčinené mutáciami iba jedného nukleotidu, respektíve báze páru v sekvencii DNA. Pre opravu takýchto defektov boli vyvinuté ďalšie metódy založené na technológii CRISPR, ktorými sú editácia báz („base editing“) a „prime editing“ (Kantor et al., 2020). Spoločným znakom týchto metód je, že v oboch prípadoch možno modifikovať cieľovú sekvenciu DNA bez tvorby DSB (Thuronyi et al., 2019; Kantor et al., 2020). Metóda „base editing“ (Obr. 2C) je špecifická úprava genómu spočívajúca v jednobodovej mutácii DNA. Využívajú sa tzv. „base editors“ (BE), čo sú molekuly zložené z inaktivovanej Cas nukleázy a deaminázy. Keď sa gRNA naviaže na cieľové miesto v genóme, rozštípe sa krátky úsek jedného vlákna DNA za tvorby tzv. "R-slučky" (Nishimasu et al., 2014). V rámci tejto slučky následne deamináza katalyzuje konverziu špecifického báze páru. Vyvinuté boli dva typy BE: cytidínový a adenínový. Cytidínový zamieňa C+G báze pár za T+A a funkcia adenínového editora spočíva v zámene A+T na G+C. Metóda „prime editing“ (Obr. 2D) spočíva zase v tvorbe inzercii, delécii či transverzií v špecifickej časti DNA, pomocou špeciálnej, dlhšej vodiacej RNA, označovanej pegRNA. Pre funkciu tohto editačného nástroja je potrebný

fúzny proteín zložený z Cas9 nikázy, štiepiacej len jedno vlákno DNA a špeciálne navrhnutej reverznej transkriptázy, ktorá sprostredkuje inkorporáciu danej sekvencie do genómu (Das et al., 2022).



Obr. 2: Modifikované CRISPR/Cas9 technológie. **(A)** Systém CRISPR s upravenou SpRY nukleázou, rozpoznávajúcou PAM sekvenciu pozostávajúcu z akýchkoľvek nukleotidov (NNN). Zdroj: Zhang a Zhang, (2020), upravené. **(B)** Systém Cas-Clover zložený z dimérneho proteínu Clo51 fúzovaného s inaktivovanou nukleázou dCas9, ktorá je na cieľové miesto navádzaná ľavou (L-gRNA) a pravou (R-gRNA) vodiacou RNA (gRNA). Zdroj: Crawford (2021), upravené. **(C)** Technológia „base editing“ pozostávajúca z inaktivovanej dCas9 nukleázy a deaminázy, ktorá katalyzuje výmenu špecifického bázeového páru v cieľovej sekvencii DNA. Zdroj: Nishiyama et al. (2021), upravené. **(D)** Technológia „prime editing“, v ktorej je Cas9 nikáza nasmerovaná spolu s reverznou transkriptázou na vybrané miesto v genóme pomocou špecifickej pegRNA. Zdroj: Nishiyama et al. (2021), upravené.

V diploidnom organizme je 50 % pravdepodobnosť, že sa určitý gén preniesie do potomstva. Technológiou „CRISPR gene drive“ túto pravdepodobnosť možno zvýšiť až na 100 %. Systém využíva nukleázu Cas9 spolu s gRNA, pričom chromozóm, do ktorého sa tento konštrukt začlení, sa stáva odolný voči štiepeniu nukleázou. Štiepenie určitej sekvcie DNA tak nastáva na „wild type“ alele. Tieto zlomy následne bunka opravuje buď procesom nehomologického spájania koncových častí DNA („non-homologous end joining, NHEJ“), alebo homologicky usmernenou opravou („homology-directed repair, HDR“; Hryhorowicz et al., 2017). V prípade opravy zlomov pomocou HDR, slúži ako templát chromozóm obsahujúci transgén.

V súčasnosti je možná špecifická editácia genómu vybraného organizmu aj pomocou „DNA-free“ technológie (Kanchiswamy, 2016; Metje-Sprink et al., 2019; Das et al., 2022). Tieto technológie využívajú ribonukleoproteíny TALEN („transcription activator-like effector nuclease“) alebo Cas9 nukleázu, pričom *in vitro* vytvorený komplex s vodiacou RNA sa vpravuje do protoplastu buď priamo, najmä pomocou PEG alebo sa tranzientne exprimuje mRNA kódujúca tieto molekuly. Editácia rastlinných buniek pomocou tejto technológie ale dosahuje nízku efektivitu v porovnaní s tradičnými technológiami založenými na DNA. Navyše, nevýhodou uvedenej technológie je, že pre selekciu editovaných rastlín je v každom prípade nevyhnutá sekvenačná analýza (Metje-Sprink et al., 2019).

Konštitutívna editácia génov v živote rastliny môže viesť k narušeniu kľúčových bunkových procesov, napríklad vývoja či reprodukcie, nakoľko editovaný gén môže byť pre život organizmu esenciálny alebo môže cielená editácia ovplyvniť i funkciu iných génov, ktoré regulujú dôležité mechanizmy v bunke (Das et al., 2022; Singha et al., 2022). V súčasnosti je možné regulovať expresiu študovaných génov len vo vybranej oblasti organizmu a tiež len v určitom čase alebo vývojovom štádiu, pričom rozhodujúci je výber vhodného promótoru (Singha et al., 2022). Pomocou pletivovo alebo orgánovo špecifickej editácie genómu je možné študovať vybrané gény len v určitých bunkách, pletivách alebo orgánoch (Decaestecker et al., 2019). Pre reguláciu expresie génu záujmu v čase, možno využiť napríklad inducibilný promótor, reagujúci na rôzne faktory v prostredí (Huang et al., 2021), následkom čoho dochádza k expresii tohto génu. Inducibilná CRISPR/Cas9 editácia genómu je podrobnejšie popísaná v kapitole 2.3.2.

Iná vylepšená CRISPR technológia, systém „multiplex CRISPR/Cas9“, je založená na expresii niekoľkých gRNA súčasne zacielených na viacero oblastí genómu (Xing et al., 2014). Touto stratégiou možno zvýšiť efektivitu mutagenézy predovšetkým v prípade

tetraploidného genómu u lucerny (Wolabu et al., 2023). Bližšie je tento systém popísaný v kapitole 2.4.

2.3.1 Využitie modifikovaných CRISPR/Cas9 technológií

Sofistikovaný CRISPR-SpRY systém otestovali u ryže Ren et al. (2021), pričom zacieleni tento systém na gén *OsPSD*, kódujúci fytoén desaturázu. Efektivita editácie pomocou SpRY bola mierne znížená (62,5 %) oproti tradičnému CRISPR/Cas9 systému (79,0 %). Avšak, sekvenačná analýza cieľových miest odhalila, že v prípade štiepenia DNA nukleázou SpRY, došlo k tvorbe väčších delécií ako v prípade štiepenia nukleázou Cas9. Navyše, pri dôkladnom návrhu experimentu možno očakávať naozaj vysoko účinnú a špecifickú editáciu vybraného génu (Ren et al., 2021). Tento úspech tak otvára možnosti pre ďalšie genetické editácie, ktoré doteraz nemohli byť uskutočnené.

Pomocou systému Cas-Clover sa zatiaľ podarilo editovať gén pre fytoén desaturázu (*PDS*) v banáne (Tripathi et al., 2023). Skutočnosť, že si tento systém vyžaduje návrh dvoch gRNA môže byť nevýhodou keď je cieľová oblasť genómu malá a návrh vodiacich RNA môže byť náročný. Naopak, vďaka tejto požiadavke sa môže výrazne zvýšiť špecifita editácie, nakoľko pravdepodobnosť nešpecifického účinku tohto systému bola zanedbateľná. Vo výsledkoch tejto štúdie tiež uviedli, že pri sekvenačnej analýze boli detekované väčšie delécie oproti editáciám s využitím Cas9.

Technológiami „base editing“ a „prime editing“ sa podarilo navodiť rezistenciu voči určitým herbicídum u ryže (Liu et al., 2021), pšenice (Li et al., 2018), repky olejnej (Cheng et al., 2021) a ďalších významných plodín (Das et al., 2022). Tieto editácie môžu mať podobnú či dokonca vyššiu účinnosť ako HDR a nesú so sebou oveľa menšie riziko nežiaducich mutácií mimo cieľového miesta (Anzalone et al., 2019). Avšak, s ohľadom na to, že bola táto metóda vyvinutá v ľudských bunkách pre terapeutické účely (Anzalone et al., 2020), editácia genómu niektorých dvojklíčnolistových rastlín si vyžaduje ďalšiu optimalizáciu (Das et al., 2022).

Využitím technológie „CRISPR gene drive“ by bolo možné stabilizovať určité žiadané vlastnosti organizmov ako aj znížiť počet generácií potrebných pre zisk homozygotných jedincov. Metóda bola úspešná v bunkách hmyzu (Das et al., 2022), a ešte predtým predbežne otestovaná v *A. thaliana* (Neve, 2018; Zhang et al., 2021). Avšak, rastlinné bunky opravujú zlomy v DNA primárne procesom NHEJ a HDR je len alternatívou (Ran et al., 2013). Aby bolo možné tento editačný nástroj využívať v šľachtiteľstve plodín,

bude ešte potrebné podrobne preskúmať mechanizmus HDR v rastlinných bunkách (Das et al., 2022).

2.3.2 Inducibilná CRISPR/Cas9 editácia genómu rastlín

Mutácie spôsobené konštitutívnou expresiou systému CRISPR/Cas9, ktoré zapríčiňujú vyradenie určitého génu z funkcie, môžu viesť k vývojovým defektom či dokonca k letalite (Omelina et al., 2022). Preto vývoj editačného nástroja, ktorý umožňuje inducibilné modifikácie len určitých typov buniek, má veľký význam pre komplexné štúdium funkcie génov počas špecifických vývojových alebo fyziologických procesov (Wang et al., 2020). Transkripcia konštruktu nesúceho transgén môže byť v rastlinách riadená chemicky indukovateľným promótorom alebo rôznymi abiotickými stresmi, akými sú teplo (Freeman et al., 2011), chlad (Kovalchuk et al., 2013) alebo sucho (Xue et al., 2011).

Chemicky indukovateľný systém sa skladá z dvoch podstatných elementov. Jedným je transkripčný faktor (aktivátor), ktorý môže byť vytvorený umelo (chimérický transkripčný faktor). Ten sa špecificky viaže na promótor druhého elementu, ktorým je reportérový gén alebo tiež efektor. Transkripčný faktor môže byť pod kontrolou konštitutívneho alebo pletivovo špecifického promótoru a samotná expresia tohto systému môže byť indukovaná napríklad tetracyklínmi, insekticídmi, meďou, etanolom či steroidmi (Omelina et al., 2022).

V tejto diplomovej práci boli pre mutagénzu *MMK2* a *MMK3* skonštruované 2 typy multiplexných CRISPR-KO vektorov, líšiac sa typom promótoru. V jednej verzii je expresia systému pod kontrolou konštitutívneho promótoru *UBQ10*. Druhá verzia obsahuje inducibilný systém *GR-Lh/pOp6*, založený na modifikovanom *lac*-repressorovom systéme z *Escherichia coli* (Moore et al., 1998). Tento inducibilný systém sa skladá zo syntetického operátora *pOp6*, ktorého väzobné miesto pre chimérický transkripčný faktor LhGR obsahuje 6 opakujúcich sa sekvencií *lac* operátora (*lacO*) (Craft et al., 2005). LhGR pozostáva z transkripčnej aktivačnej domény II z Gal4 zo *Sacharomyces cerevisiae* fúzovanej s mutantným *lac*-repressorom s vysokou afinitou pre väzbu k operátoru a z domény glukokortikoidového receptora (GR) z potkana. Samotná indukcia promótoru si vyžaduje prídavok glukokortikoidu dexametazón (Vlad et al., 2019). GR je za normálnych podmienok naviazaný na „HEAT SHOCK PROTEIN 90“ (HSP90) v cytoplazme. Prítomnosť dexametazónu spôsobuje relokalizáciu LhGR

z cytoplazmy do jadra, kde následne dochádza k aktivácii transkripcie expresných kaziet pod kontrolou *pOp6* (López-Salmerón et al., 2019).

Optimálna koncentrácia dexametazónu pre indukciu expresie transgénu v niektorých významných rastlinných druhoch ako aj spôsoby aplikácie dexametazónu ako induktora sú zhrnuté v Tabuľke 1 (Tab. 1) nižšie.

Tab. 1: Koncentrácia dexametazónu a spôsoby jeho aplikácie pre indukciu expresie transgénu vo vybraných rastlinných druhoch.

Rastlinný druh	Spôsoby aplikácie	Koncentrácia (μM)	Citácia
<i>O. sativa</i>	<i>in vitro</i> kultivácia v tekutom/tuhom kultivačnom médiu, sprejovanie roztokom, zalievanie roztokom, aplikácia roztoku pomocou štetca	10	(Samalova a Moore, 2021)
<i>A. thaliana</i>		2-25	(Craft et al., 2005; Tsuda et al., 2012; López-Salmerón et al., 2019; Samalova et al., 2019)
<i>N. tabacum</i>		10-30	(Samalova et al., 2005; Amirsadeghi et al., 2007)
<i>N. benthamiana</i>		30	(Gonzalez et al., 2015)
<i>M. truncatula</i>		1-100	(Liu a Yoder, 2016)

2.4 Multiplexná technológia CRISPR/Cas9

V súvislosti s CRISPR/Cas9 systémom, jedným z cieľov génového inžinierstva je zvýšiť efektívnosť mutagenézy. Jednou zo stratégií, ako ho dosiahnuť, je využitie „multiplex CRISPR/Cas9“, pomocou ktorej možno simultánne zacieliť viacero gRNA na niekoľko požadovaných miest záujmu (Hassan et al., 2021). Multiplexná CRISPR/Cas9 technológia tak umožňuje štúdium funkčne príbuzných génov, ktoré riadia komplexné znaky a tiež prepojenia určitých metabolických procesov (Ma et al., 2015). Tiež bolo dokázané, že je vhodné túto metódu použiť pri snahe o rýchlejšie a efektívnejšie vyradenie určitého génu z jeho funkcie („knock out, KO“) v polyploidnom organizme (Wolabu et al., 2020a), nakoľko mutagenéza pomocou jednej gRNA („single guide RNA, sgRNA“) nie je v tomto prípade dostatočne efektívna (Gao et al., 2018; Wolabu et al., 2020a).

Pre samotnú modifikáciu cieľových sekvencií sa pripravuje konštrukt pozostávajúci buď z jednej transkripčnej jednotky („single transcriptional unit, STU“) alebo systém môže byť zložený z dvoch transkripčných jednotiek („two transcriptional units, TTU“) (Hassan et al., 2021). V multiplexnom systéme STU je expresia *Cas9* aj gRNA riadená jedným promótorom a tiež ukončená jedným terminátorom. Multiplexný systém TTU je rozdelený do 3 kategórií, v ktorých je expresia *Cas9* a gRNA regulovaná kombináciou rôznych typov promótorov. Ide o promótor RNA polymerázy II, označovaný *Pol II*, ktorý v eukaryotických organizmoch kontroluje transkripciu mRNA. Ďalším typom je *Pol III*, kam zaradíme *U6/U3* promótor, ktorý sa zúčastňuje transkripcie 5S rRNA (časť veľkej podjednotky ribozómu), transferovej RNA (tRNA) a niektorých krátkych nekódujúcich RNA („small noncoding RNA, snRNA“). Pre prvú kategóriu TTU systému je charakteristické, že expresia *Cas9* je pod kontrolou promótoru *Pol II* a gRNA je pod kontrolou promótoru *Pol III*. Pre ďalšiu kategóriu platí, že expresia *Cas9* a gRNA sú pod kontrolou dvoch odlišných promótorov *Pol II*. V tretej kategórii sa *Cas9* aj gRNA súčasne exprimujú pod rovnakým promótorom *Pol II* (Hsieh-Feng a Yang, 2020; Hassan et al., 2021).

Pri multiplexnej editácii je dôležitým faktorom, ovplyvňujúcim účinnosť mutagenézy, spracovanie a uvoľnenie jednotlivých gRNA z polycistronickeho transkriptu (Hassan et al., 2021). Väčšina mechanizmov spracovania polycistronickej mRNA spočíva v enzymatickom štiepení transkriptu. Príkladom môže byť štiepenie duálnym ribozómom HH-HDV. Tento je zložený z ribozómu HH („hammerhead“), ohraničujúceho sekvencie

gRNA na 5' konci a z ribozýmu vírusu hepatitídy delta HDV („hepatitis delta virus“), ktorý ohraničuje gRNA na ich 3' konci. Vzhľadom na to, že uvedené ribozýmy sú samoštiepiace, predstavujú veľmi elegantný spôsob uvoľňovania jednotlivých gRNA z transkriptu (Gao a Zhao, 2014). Ďalším spôsobom môže byť mechanizmus využívajúci endoribonukleázu Csy4 z baktérie *Pseudomonas aeruginosa* (Ferreira et al., 2018). Systém tiež využíva ohraničenie gRNA špecifickými sekvenciami, ktoré v tomto prípade rozpoznáva Csy4. Avšak, na rozdiel od pôsobenia HH-HDV, po štiepení Csy4 sú rozpoznávané miesta odstránené. Vyštiepené gRNA preto neobsahujú žiadne zvyšky RNA sekvencií (Utomo et al., 2021). Iný sofistikovaný systém polycistronickej tRNA-gRNA (PTG), využíva endogénne RNázy P a Z. Tie štiepia primárny transkript, v ktorom sú sekvencie gRNA ohraničené tRNA prekurzormi (pre-tRNA). Týmto spôsobom sú uvoľňované jednotlivé gRNA z mRNA transkriptu, ktoré sú pripravené nasmerovať Cas9 nukleázu na cieľové miesta v genóme (Xie et al., 2015). Podľa Hassan et al. (2021), je pre spracovanie jednotlivých gRNA v multiplexnom systéme CRISPR s nukleázou Cas9 vhodnejšie využiť systémy Csy4 a PTG, pričom mechanizmus HH-HDV sa javí ako účinnejší pre systém CRISPR s nukleázou Cas12a.

V tejto práci je genóm lucerny editovaný pomocou multiplexného systému TTU, pričom expresia *Cas9* je pod kontrolou *Pol II* a expresia jednotlivých gRNA je riadená promótorom *U6*.

2.4.1 Zlepšovanie vlastností rastlín pomocou multiplexnej CRISPR/Cas9 technológie

Na meniace sa klimatické podmienky a zvyšujúci sa dopyt po potravinách a krmive reagujú génoví inžinieri snahou o vylepšenie poľnohospodársky významných plodín. Vytvárajú preto stratégie na zvyšovanie výnosu či modifikáciu dôležitých vlastností, akými sú napríklad tolerancia rastliny voči suchu, soľnému stresu alebo rezistencia voči herbicídum (Biswas et al., 2021; Das et al., 2022; Pixley et al., 2022). Za týmto účelom sa už podarilo úspešne vylepšiť vlastnosti viac ako 40 druhov plodín (Menz et al., 2020) a súčasne sa podarilo vyvinúť multiplexný CRISPR/Cas9 systém, ktorý by mohol celý proces ešte urýchliť.

Etylén je rastlinný hormón, ktorý reguluje dôležité fyziologické procesy ovplyvňujúce rast, vývin a stresové odpovede rastlín (Binder, 2020). Cheng et al. (2023) sa pomocou multiplexnej CRISPR/Cas9 technológie pokúsili editovať kľúčové gény regulujúce signálne dráhy etylénu v sóji. Pripravili na to vektor obsahujúci tri vodiace RNA,

zacielené na gény *EIN2L*, *EIL3* a *EIL4*. V tretej generácii sa im podarilo získať trojité mutanty, u ktorých bolo zaznamenané kvitnutie približne o 7 dní skôr, v porovnaní s kontrolnými rastlinami. Tento úspech znamenal zvýšenie výnosu geneticky editovaných rastlín až o 65 %, v porovnaní s kontrolou.

Izoflavonoidy sú sekundárne metabolity, ktoré v rastlinách hrajú dôležitú úlohu počas interakcie s mikroorganizmami ako aj počas obrany voči abiotickým stresom (Zhao et al., 2017). Navyše, tieto látky sú veľmi prospešné pre ľudský organizmus (McCue a Shetty, 2004). Izoflavon syntáza je esenciálnym enzýmom biosyntézy izoflavonoidov. Zistilo sa, že tento enzým súperi o substrát s enzýmami F3H (flavanon-3-hydroxyláza) a FNS II (flavon syntáza II). Zhang et al. (2020) sa preto rozhodli zacieliť tri multiplexné CRISPR/Cas9 vektory s tromi gRNA simultánne zacielenými na gény *F3H1*, *F3H2* a *FNSII-1* v sóji. Efektivita prípravy trojitého mutanta dosahovala 44 % v T0 generácii. Metabolickou analýzou bolo zistené, že tieto mutanty mali zvýšený obsah izoflavonoidov v listoch, približne dvojnásobok oproti kontrolným rastlinám. Navyše, po infekcii listov vírusom mozaiky sóje zaznamenali v trojitých mutantoch až o tretinu znížený obsah obalového proteínu tohto vírusu.

Dôkazom, že multiplexná CRISPR/Cas9 editácia génov môže výrazne urýchliť výskum v oblasti rastlinných biotechnológií, je tiež úspešná mutagenéza génu *CcPDS* („*Coffea canephora* PHYTOENE DESATURASE“) v kávovníku, známeho aj ako Robusta. Tento druh je známy veľkou genetickou diverzitou a ťažkým získaním nových kultivarov, na ktoré je potrebný dlhoročný proces kríženia a selekcie. Preto sa Casarin et al. (2022) pokúsili otestovať multiplexný CRISPR/Cas9 systém s dvomi sgRNA zacielenými na gén *PDS*, kódujúci fytoén desaturázu. Potvrdili, že mutagenéza bola úspešná, pretože viac ako 75 % analyzovaných semenáčikov malo mutáciu aspoň v jednej alele uvedeného génu. Záverom zhodnotili, že by táto technológia mohla mať veľký potenciál pre zrýchlenie šľachtenia nových odrôd kávovníku. Tieto by mohli byť odolnejšie voči aktuálnym klimatickým podmienkam a tiež viac prispôsobené stále narastajúcemu celosvetovému dopytu po káve.

Technológia multiplex CRISPR/Cas9 je perspektívnym nástrojom pre efektívne vylepšovanie vlastností dvojkľúčolistových aj jednokľúčolistových rastlín. Príkladom je cielená mutácia génu *OsFAD2* („*Oryza sativa* FATTY ACID DESATURASE 2“) v ryži. Tento gén kóduje enzým desaturáza, ktorý je esenciálny pre syntézu mastných kyselín (Zafar et al., 2020). Z výsledkov predošlých pokusov zmutovať tento gén pomocou sgRNA je zrejme, že homozygotné mutanty sa podarilo získať až v T2 generácii (Abe et

al., 2018). Pomocou multiplexného CRISPR/Cas9 systému s dvomi sgRNA zacielenými na *FAD2-1* bolo možné vyradiť tento gén z funkcie už v T0 generácii. Samotná mutagenéza viedla k zvýšenému obsahu olejovej kyseliny v zrnách ryže (Bahariah et al., 2021) a dosahovala viac ako 80 % efektívnosť. Navyše sa zistilo, že sekvencia genómu ryže je veľmi podobná genómovej sekvencii palmy olejovej (Nagappan et al., 2013; Kalyana Babu et al., 2019). Táto stratégia by tak mohla prispieť k výskumu aj tohto poľnohospodársky významného druhu.

Vzhľadom na to, že génová editácia tetraploidnej lucerny pomocou jednej gRNA („single gRNA, sgRNA“) dosahovala nízku efektívnosť (Gao et al., 2018), Wolabu et al. (2020a) sa pokúsili o vyradenie génu *MsSGR* („*Medicago sativa* *STAY-GREEN*“) z funkcie pomocou multiplexnej CRISPR/Cas9 technológie. Tento gén, kódujúci proteín SGR („*STAY-GREEN*“) v chloroplastoch, je v rastlinách úzko spojený so senescenciou a ovplyvňuje degradáciu chlorofylu (Park et al., 2007; Zhou et al., 2011). Rastliny s mutovaným *SGR* génom vykazujú zelený vzhľad v podmienkach tmy, v dôsledku indukovanej senescencie, čo vedie k inhibícii degradácie chlorofylu (Ren et al., 2007; Barry et al., 2008). Vektor pre editáciu obsahoval štyri gRNA zacielené na prvý, druhý a tretí exón uvedeného génu. Expresia *Cas9* bola v dvoch prípadoch pod kontrolou 35S promótoru a v tretej verzii bola regulovaná promótorom *UBQ10*. Po vyhodnotení mutácií zhodnotili, že efektívnosť mutagenézy bola značne zvýšená v prípade expresie *Cas9* pod kontrolou *UBQ10*. Celkovo sa efektívnosť mutagenézy v porovnaní so systémom CRISPR/Cas9 využívajúcim sgRNA zvýšila až 30 násobne. Nakoľko sa im podarilo pripraviť mutanty so všetkými štyrmi editovanými alelami, uviedli, že by táto technológia mohla byť vhodnou stratégiou pre editáciu genómu ďalších druhov strukovín a rastlín s polyploidnými genómami.

Nasledujúcim veľkým úspechom bola multiplexná CRISPR/Cas9 editácia kľúčového génu *MsFTAI* (*Medicago sativa* „*FLOWERING LOCUS Ta1*“), regulujúceho kvitnutie lucerny. Proteín florigén, produkt expresie génu *FT* (*FLOWERING LOCUS T*), pozitívne ovplyvňuje kvitnutie rastliny. Editácia uvedeného génu v bôbovitých rastlinách a v obilninách je predmetom záujmu mnohých štúdií zacielených na zvyšovanie výnosu plodín. Cheng et al. (2021) zistili, že mutácia *FTAI* v *M. truncatula* viedla k oneskorenému kvitnutiu a tiež uviedli, že tento gén je homologický s génom *MsFTAI*. Wolabu et al. (2023) sa rozhodli zacieliť vektor obsahujúci štyri gRNA do troch exónov *MsFTAI* s cieľom vyradiť tento gén z funkcie. Jednotlivé gRNA boli z transkriptu uvoľňované pomocou tRNA mechanizmu s takmer 50 % efektívnosťou mutagenézy.

Úspešne sa im podarilo pripraviť mutanty, ktoré mali editované všetky štyri alely génu *MsFTA1*. U týchto mutantov bola zaznamenaná značne zvýšená produkcia biomasy v porovnaní s kontrolou. Tiež obsahovali menšie množstvo lignínu, mali vyšší podiel bielkovín a minerálnych látok a rastliny mali byť lepšie stráviteľné.

2.5 Selekcia transgénnych rastlín

Proces genetickej transformácie spočíva v prenose pripraveného konštrukt, obsahujúceho požadovanú DNA sekvenciu, do buniek vybraného organizmu. Okrem sekvencie génu záujmu musí konštrukt obsahovať aj gén pre selekčný marker. Ten je neskôr dôležitý pre samotnú identifikáciu transgénov (Tuteja et al., 2012). Zvyčajne sa používajú gény rezistencie pre antibiotiká alebo herbicidy alebo gény kódujúce fluorescenčné proteíny (Jillette et al., 2019). Medzi veľmi často využívané fluorescenčné proteíny patrí zelený fluorescenčný proteín („GREEN FLUORESCENT PROTEIN, GFP“) izolovaný z medúzy *Aequorea victoria*. Postupne boli objavené a modifikované aj ďalšie fluorescenčné proteíny (Davidson a Campbell, 2009), napríklad mCherry, ktorý je súčasťou multiplexných CRISPR-KO vektorov v tejto diplomovej práci. Samotná selekcija transformantov môže prebiehať priamo na kultivačnom médiu (Jones a Sparks, 2009; Bahariah et al., 2021) alebo pomocou mikroskopických techník založených na detekcii fluorescenčného signálu (Jach et al., 2001; Yang et al., 2019). Pre potvrdenie začlenenia transgénneho konštrukt obsahujúceho systém CRISPR/Cas9 do genómu rastliny sa využíva tiež PCR s primermi špecificky ohraničujúcimi vybraný úsek transgénu, napríklad gén pre selekčný marker (Jones a Sparks, 2009) alebo *Cas9* (Casarin et al., 2022).

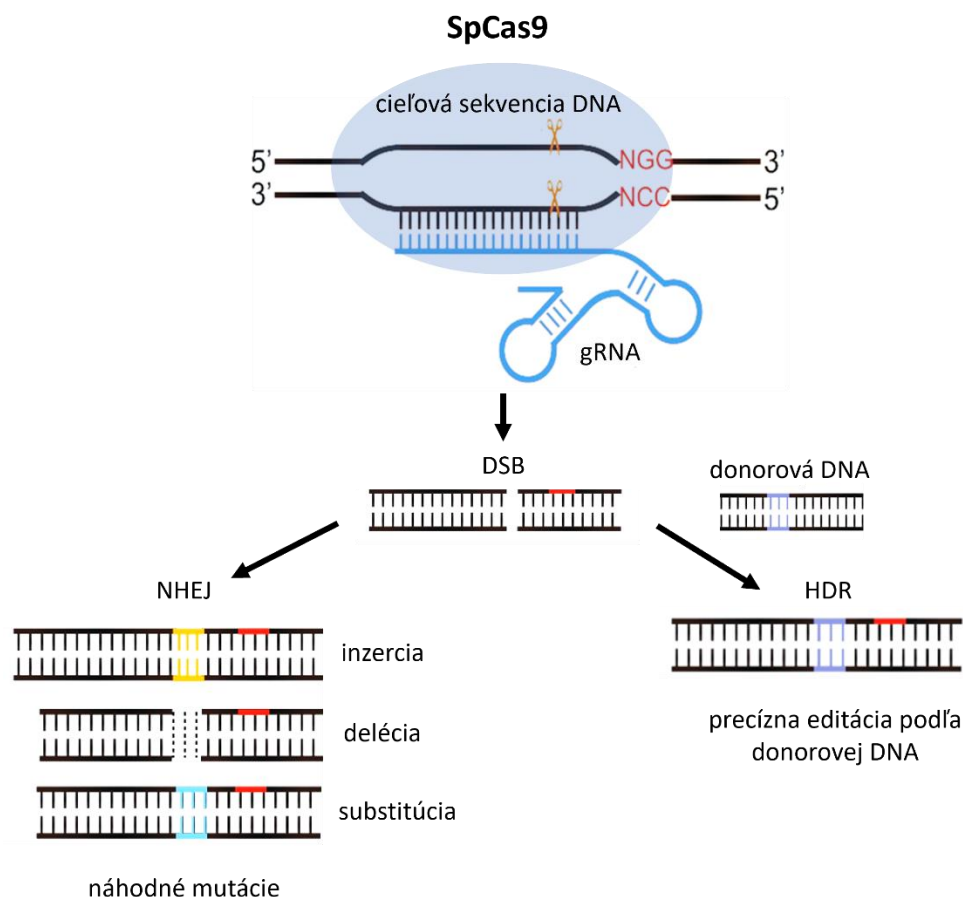
Problém však môže nastať ak má byť do bunky inkorporovaných viacero transgénov, čo si vyžaduje kombináciu selekčných markerov. Dobre charakterizovaných génov pre selekčné markery je obmedzený počet a navyše selekcija pomocou viacerých antibiotík má často negatívny vplyv na životaschopnosť buniek. To viedlo k vývoju „rozdelených“ selekčných markerov, pomocou ktorých je možné vyhnúť sa uvedeným obmedzeniam. V tomto prípade je sekvencia génu, kódujúceho vybraný selekčný marker, rozdelená na niekoľko segmentov, v závislosti od počtu transgénnych vektorov. Tieto segmenty sú fúzované s proteínovými spojovacími elementmi, nazvanými inteíny. Prostredníctvom nich dochádza k obnove kompletnej sekvencie génu pre selekčný marker, a preto prežijú iba bunky, ktoré prijali všetky transgénne vektory nesúce jednotlivé segmenty tohto génu (Jillette et al., 2019).

Existujú však ďalšie nevýhody spojené s využívaním selekčných markerov v rastlinných bunkách. Prítomnosť génov pre selekčné markery („selection marker genes, SMG“) v geneticky modifikovaných rastlinách a následne v potravinách, krmivách a v životnom prostredí, vyvoláva obavy, a preto v mnohých krajinách podlieha prísnej kontrole. Navyše, v niektorých prípadoch môžu SMG dokonca viesť k metabolickej záťaži hostiteľských rastlín (Yau et al., 2013). Tieto skutočnosti smerovali k vývoju nových metód odstraňujúcich tieto gény z geneticky modifikovaných organizmov (Tuteja et al., 2012; Yau et al., 2013). Jednou z možností je príprava transgénneho konštruktu, ktorý neobsahuje žiadny gén pre selekčný marker. Transgénne rastliny sa potom selektujú pomocou PCR. Avšak, pravdepodobnosť inkorporácie transgénu je v tomto prípade veľmi nízka (De Vetten et al., 2003; Li et al., 2009), a preto sa táto časovo náročná a neefektívna metóda často nevyužíva. Iným sofistikovaným spôsobom je transformácia génu záujmu spolu so SMG v rámci jedného konštruktu, pričom samotný SMG je možné následne odstrániť pomocou rôznych molekulárnych stratégií. Využívajú sa najmä rekombinázy špecifické pre určitú sekvenciu, napr. systém *Cre-lox* alebo meganukleázy či nukleázy so zinkovým prstom („zinc-finger nucleases, ZFN“). Ďalšou alternatívou je transformácia SMG a génu záujmu oddelene, teda prostredníctvom dvoch rôznych vektorov. Selekcia po transformácii je potom založená na pravdepodobnosti, že určité množstvo buniek, ktoré vďaka prijatému vektoru obsahujúceho SMG prežijú, budú pozitívne i pre vektor nesúci gén záujmu. V ďalšej generácii tak možno segregáciou získať len rastliny s požadovaným génom (Yau et al., 2013).

2.6 Analýza úspešnosti CRISPR/Cas9 editácie genómu rastlín

2.6.1 Analýza editovanej DNA

K štiepeniu cieľovej DNA pomocou nukleázy Cas9 dochádza tri nukleotidy od PAM sekvencie smerom od 3' konca k 5' koncu vlákna DNA (Gasiunas et al., 2012). Ako už bolo uvedené, Cas9 nukleáza špecificky štiepi obe vlákna DNA, pričom bunka tieto zlomy následne opravuje dvomi spôsobmi, znázornenými na Obr. 3. Primárne sú DSB opravované procesom NHEJ, pri ktorom dochádza často k chybám akými sú delécie, inzercie alebo substitúcie niekoľkých nukleotidov v sekvencii DNA. To často vedie až k vyradeniu zasiahnutého génu z funkcie (Hryhorowicz et al., 2017; Wang et al., 2019).



Obr. 3: Štiepenie DNA nukleázou Cas9, ktorá je na cieľové miesto navádzaná pomocou vodiacej RNA („guide RNA, gRNA“), špecificky rozpoznávajúcej PAM („protospacer adjacent motif“) sekvenciu, pozostávajúcu z nukleotidov NGG, pričom N predstavuje náhodný nukleotid. Vytvorené dvojvláknové zlomy DNA („double strand break, DSB“) následne bunka opravuje procesom homologickej rekombinácie (HDR) alebo mechanizmom nehomologického spájania koncových častí DNA (NHEJ). Opravy DSB pomocou NHEJ často vedú k tvorbe delécií, inzercii či substitúcií nukleotidov. Zdroj: Wang et al. (2019), upravené.

Samotná analýza DNA sekvencií pozostáva z niekoľkých krokov. Prvým krokom je extrakcia genómovej DNA z rastlinných buniek. Následne sa požadovaná časť sekvencie DNA amplifikuje pomocou PCR s využitím primerov, špecificky rozpoznávajúcich určitú sekvenciu v definovanej vzdialenosti od miesta modifikácie (Zhang et al., 2016; Tang et al., 2018; Wolabu et al., 2020a). Analýza sekvencií amplifikovaných úsekov DNA veľmi často prebieha Sangerovou metódou. Editované sekvencie DNA sa následne porovnávajú voči „wild-type“ sekvencii (Gao et al., 2015; Okuzaki et al., 2018; Zhang et al., 2019) manuálne alebo pomocou bioinformatických nástrojov, ktoré dokážu vyhodnotiť k akému typu mutácie došlo. Avšak, nevýhodou Sangerovho sekvenovania je najmä fakt, že je to pomerne časovo náročná metóda, vzhľadom na obmedzenú dĺžku fragmentov DNA. Navyše, v určitých oblastiach fragmentu môže niekedy nastať problém spojený so zlou čitateľnosťou DNA sekvencie (Totomoch-Serra et al., 2017).

Tieto obmedzenia vyriešili vylepšené technológie analýzy sekvencií, ktoré súborne nazývame sekvenovanie ďalšej generácie („next generation sequencing, NGS“). Tieto technológie umožňujú masívne sekvenovanie rôzne dlhých RNA alebo DNA sekvencií alebo dokonca až celého genómu v relatívne krátkom čase (Qin, 2019).

V prípade tvorby mutácii opravným mechanizmom NHEJ, je pravdepodobné, že niektoré sekvencie budú niest' pozmenené nukleotidy či rôzne „indely“ (niekoľkonukleotidové delécie či inzercie). Táto skutočnosť umožňuje vyhodnocovať úspešnosť CRISPR/Cas9 mutagenézy prostredníctvom endonukleázy T7 z bakteriofága infikujúceho *E. coli*. Princípom tejto metódy je PCR a následná tvorba heteroduplexnej DNA medzi amplikónmi s rozdielnou dĺžkou, napríklad editovaný amplikón s „wild-type“ amplikónom. T7 endonukleáza následne rozpoznáva a štiepi tieto rozdielne sekvencie heteroduplexnej DNA a frekvencia mutácii je vyhodnotená porovnávaním produktov štiepenia voči kontrole. Je to prakticky aj finančne nenáročná metóda, avšak jej účinnosť závisí od charakteru mutácie a od relatívneho výskytu mutovanej sekvencie (Sentmanat et al., 2018).

Ďalším spôsobom overovania úspešnej CRISPR/Cas9 editácie genómu je analýza polymorfizmu dĺžky reštrikčných fragmentov („restriction fragment length polymorphism, RFLP“). Je to jedna z najstarších, nenáročných a lacných metód, ktorá spočíva v špecifickom štiepení DNA sekvencie reštrikčnými endonukleázami (RE). Dôležitý je výber vhodnej RE rozpoznávajúcej určitú sekvenciu v oblasti, do ktorej bol zacielený CRISPR/Cas9. V prípade úspešnej mutácie sa očakáva, že došlo k modifikácii tejto špecifickej sekvencie. Pre danú RE už neexistuje jej rozpoznávacía sekvencia, a preto nedochádza k štiepeniu DNA, na rozdiel od kontroly. Táto metóda je však limitovaná dostupnosťou špecifických sekvencií rozpoznávaných RE (Kim et al., 2014).

Na vyhodnotenie úspešnosti editácie genómu možno skombinovať metódu PCR s analýzou krivky topenia amplikónov s vysokým rozlíšením („high-resolution melting analysis, HRMA“). Na rozdiel od štandardnej PCR, táto metóda si vyžaduje prídavok špecifickej fluorescenčnej farbičky, ktorá sa viaže na DNA. Detekcia editovanej DNA potom spočíva v monitorovaní krivky topenia fluorescenčne značených amplikónov, pričom zmena v sekvencii spôsobuje zmenu teploty topenia daného amplikónu. Vyhodnotenie následne spočíva v porovnávaní krivky topenia amplikónov voči kontrole (Wittwer et al., 2003; Herrmann et al., 2006; Zhou et al., 2008; Vossen et al., 2009).

Pre identifikáciu jednonukleotidových polymorfizmov („single nucleotid polymorphism, SNP“) sa využíva alelovo-špecifická PCR (AS PCR). Táto metóda si

vyžaduje návrh špecifického primeru, komplementárneho iba k sekvencii jednej alely. To je možné dosiahnuť zámernou zmenou niekoľkých nukleotidov na 3' konci primeru. Tým sa zabezpečí, že k amplifikácii dôjde len v prípade, že 3' koniec primeru dokonale nasadne na DNA požadovanej alely (Liu et al., 2012; Jiang et al., 2022).

2.6.2 Sledovanie miery expresie génov pomocou kvantitatívnej PCR v reálnom čase

Už v 90. rokoch popísali Higuchi et al. (1992) metódu simultánnej amplifikácie špecifickej DNA sekvencie a detekcie produktu amplifikácie. Dnes je táto metóda naozaj veľmi často využívaná na detekciu patogénu, analýzy jednonukleotidových polymorfizmov (SNP) a chromozómových aberácií a štúdium génovej expresie. Preto si našla uplatnenie najmä v molekulárnej biológii, medicíne a diagnostike (Kubista et al., 2006; Jozefczuk a Adjaye, 2011).

Princíp metódy spočíva v sledovaní akumulácie PCR amplikónov produkovaných v priebehu reakcie a meraním zmien v emisii fluorescencie farbív viažucich sa na DNA, napr. SYBR Green I, alebo cieľovo špecifických fluorescenčne označených primerov či sond, napr. TaqMan, pridaných do reakcie. Oproti štandardnej PCR je okrem možnosti kvantifikácie nukleovej kyseliny výhodou predovšetkým vyššia citlivosť a špecificita uvedenej metódy (Löfström et al., 2015). Hlavným rizikom tejto metódy môže byť kontaminácia špecifických amplikónov dimérmii primerov, na ktoré sa môže naviazať fluorescenčné farbivo. Preto sa posudzujú disociačné krivky získané postupným zvyšovaním teploty, vďaka ktorým dokážeme overiť, či k tejto dimerizácii došlo. Samotný proces je zložený z troch hlavných krokov: prvým je prepis mRNA do cDNA pomocou reverznej transkriptázy, druhým je amplifikácia cDNA pomocou PCR a tretím je detekcia a kvantifikácia produktov amplifikácie (Jozefczuk a Adjaye, 2011). Pokiaľ sa ako fluorescenčné farbivo používa SYBR Green I, fluorescencia je zaznamenaná až keď sa naviaže na špecifickú sekvenciu DNA. Na začiatku reakcie je preto fluorescenčný signál nízky, avšak s narastajúcim počtom cyklov a akumuláciou amplikónov pozorujeme exponenciálny nárast fluorescencie. Hodnota CT („cycle threshold“) je počet cyklov, potrebných na detekciu fluorescencie (Kubista et al., 2006).

Vzhľadom na možnosť sledovania množstva amplifikovanej DNA v čase, sa „quantitative real time PCR“ (qRT-PCR) veľmi často využíva na kvantifikáciu nukleovej kyseliny vo vzorke. Pritom rozlišujeme dva základné typy kvantifikácie: absolútna a relatívna. V prípade absolútnej kvantifikácie sa porovnáva CT hodnota so štandardnou

krivkou vychádzajúcou zo známych koncentrácií nukleovej kyseliny v organizme. Často je možné pomocou nej stanoviť napríklad presné množstvo mikroorganizmu vo vzorke (Löfström et al., 2015). Relatívnou kvantifikáciou je možné analyzovať zmeny v množstve mRNA určitého génu v skupine vzoriek a vyjadriť ich ako relatívny pomer k množstvu mRNA kontrolnej vzorky, ktorou môže byť „wild-type“ alebo vzorka bez ošetrovania (Wong a Medrano, 2005). Pred samotnou interpretáciou výsledkov je však v oboch prípadoch nevyhnutná normalizácia (Huggett et al., 2005). Na normalizáciu pri relatívnej kvantifikácii sa využívajú takzvané „housekeeping“ gény, ktorých úroveň expresie je za daných podmienok v každej bunke stabilná (Löfström et al., 2015).

Pre účely tejto diplomovej práce, môže byť prostredníctvom RT-qPCR metódy sledované, či dochádza k zmene v expresii génov s následnou kvantifikáciou *MMK2* a *MMK3* transkriptu.

2.6.3 Fenotypová analýza mutantných rastlín

Ďalším spôsobom, ktorým možno hodnotiť úspešnosť editácie genómu rastlín, je pozorovanie a meranie rôznych znakov či vlastností mutantov, v porovnaní s kontrolou. Veľmi často sa pozorujú a vyhodnocujú rozličné morfologické vlastnosti, napríklad výška rastliny, dĺžka koreňa (Hrbáčková et al., 2021) či tvar listov. Ďalej sa môžu analyzovať fyziologické vlastnosti, napríklad doba kvitnutia (Cheng et al., 2023; Wolabu et al., 2023) alebo účinnosť fotosyntézy (Zhou et al., 2011). Dôležitými parametrami sú tiež znaky súvisiace s výnosom (Cheng et al., 2023), napríklad veľkosť a hmotnosť plodov alebo rastlinných orgánov.

V prípade vývoja a testovania editačného nástroja sa systém často zacielfuje na gény, ktorých editácia spôsobuje výrazné zmeny vo fenotype. Príkladom je zacielenie multiplexného CRISPR-KO systému na *PDS* gén kódujúci fytoén desaturázu. Tento gén je nevyhnutný pre biosyntézu karotenoidov a jeho mutácia môže viesť k albinotickému fenotypu (Casarin et al., 2022).

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

3.1.1.1 Rastlinný materiál

- Rastliny *Nicotiana benthamiana* L.: na overenie pripravených multiplexných CRISPR-KO vektorov pomocou tranzientnej transformácie buniek listov suspenziou *Agrobacterium tumefaciens*.
- Kontrolné rastliny *M. sativa* RSY (kultivar Regen SY) na stabilnú transformáciu listových explantátov overenými multiplexnými CRISPR-KO vektormi.

Rastliny boli pestované v *ex vivo* podmienkach vo fytotrone, pri teplote 21°C, vlhkosti 71% a fotoperióde 16 h svetlo/8 h tma.

3.1.1.2 Baktérie

- *Escherichia coli* kmeň DH5 α : Univerzálny, často využívaný kmeň pre klonovanie. Bunky sú vhodné pre modro-bielu selekciu. Mutácie v génoch kódujúcich rekombinázy (*recA1*) a endonukleázy (*endA1*) zvyšujú stabilitu inzertu, kvalitu a výťažok plazmidovej DNA. Tieto bunky boli použité na množenie a izoláciu molekúl gRNA v príslušných akceptorových vektoroch a tiež na prípravu finálnych multiplexných CRISPR-KO vektorov obsahujúcich konštitutívny promótor.
- *E. coli* kmeň NEB[®] Stable: Špeciálne vyvinuté bunky na vysoko efektívnu transformáciu, pre izoláciu plazmidov obsahujúcich nestabilné a opakujúce sa sekvencie. Bunky nesú mutáciu *endA*, a preto plazmidy neobsahujú endonukleázu, ktorá by mohla degradovať izolovanú plazmidovú DNA (pDNA). Prítomný F plazmid zabezpečuje rezistenciu voči *ccdB* génu. Tento kmeň bol použitý pri konštrukcii finálnych multiplexných CRISPR-KO vektorov s indukibilným promótorom.
- *A. tumefaciens* kmeň GV3101: tento kmeň nesie pomocný plazmid pMP90 s génom rezistencie na antibiotikum gentamycín a v jeho genómovej DNA nesie gén rezistencie na antibiotikum rifampicín. Tento kmeň baktérií bol využitý na tranzientnú transformáciu listov *N. benthamiana* L. a tiež na stabilnú transformáciu *M. sativa* RSY.

3.1.1.3 Plazmidy

Všetky použité plazmidy spolu s ich popisom a rezistenciou na antibiotiká sú uvedené v Tab. 2 a v Tab. 3 sú zhrnuté antibiotiká spolu s koncentráciou použitou pre selekciu baktérií obsahujúcich požadovaný plazmid.

Tab. 2: Plazmidy použité pre konštrukciu finálnych multiplexných CRISPR-KO vektorov.

Názov	Popis	Rezistencia
pGG-A- <i>AtU6-26</i> -BbsI- <i>CcdB</i> -BbsI-B	akceptor pre gRNA 3/1	amp
pGG-B- <i>AtU6-26</i> -BbsI- <i>CcdB</i> -BbsI-C	akceptor pre gRNA 14/216	amp
pGG-C- <i>AtU6-26</i> -BbsI- <i>CcdB</i> -BbsI-D	akceptor pre gRNA 33/63	amp
pGG-D- <i>AtU6-26</i> -BbsI- <i>CcdB</i> -BbsI-E	akceptor pre gRNA 19/50	amp
pGG-E-linkerII-G	linker spájajúci poslednú kazetu s gRNA a destinačný vektor	gen
pGGH- <i>UBQ10::Cas9:mCherry:tG7-A-G</i>	destinačný vektor obsahujúci konštitutívny promótor, CDS, terminátor, gén rezistencie na hygromycín (rastliny) a oblasť pre klonovanie gRNA	spe
pGGH- <i>35S::GR-LhG4:tRbcS-pOp6::Cas9:mCherry:tG7-A-G</i>	destinačný vektor obsahujúci inducibilný promótor, CDS, terminátor, gén rezistencie na hygromycín (rastliny) a oblasť pre klonovanie gRNA	spe

Amp – ampicilín; *AtU6-26* – *U6-26* promótor RNA polymerázy III z *A. thaliana*; BbsI, rozpoznávacie miesta restriktívneho enzýmu; *CcdB* – gén kódujúci cytotoxický proteín CcdB; CDS – „coding sequence“, kódujúca sekvencia; gen – gentamicín; gRNA – „guide RNA, navádzajúca RNA; spe – spektinomycín; A-G – pomenovania pre 4 nukleotidové presahy.

Tab. 3: Zoznam použitých antibiotík pre selekciu baktérií obsahujúcich požadovaný plazmid.

Antibiotikum	Zásobná koncentrácia (mg·ml ⁻¹)	Požadovaná koncentrácia (µg·ml ⁻¹)
ampicilín	100	25*/100
gentamicín	50	25
rifampicín	25	25
spektinomycín	100	100

* selekcia baktérií *E. coli* NEB® Stable transformovaných vektorom obsahujúcim operátorové sekvencie pOp6

3.1.2 Chemikálie

Bioline: ImmoMix™

Duchefa Biochemie: spektinomycín (spe), tikarcilín (tic), rifampicín (rif), ampicilín (amp), gentamicín (gen), 1000x Gamborg vitamíny, 1000x „Nitsch & Nitsch“ vitamíny, 2,4-D (2,4-dichlor-fenoxyoctová kyselina), Gamborg B5 základná zmes solí, kinetín, „Murashige & Skoog“ základná zmes solí („MS salts“), myoinozitol

Lach-Ner: metanol

Molecular Research Center: BCP (1-bromo-3-chlorpropán)

New England BioLabs: dNTP (10 mmol·l⁻¹), „Phusion™ High-Fidelity (HF)“ DNA polymeráza, „Phusion HF“ pufor (5x), pufor pre T4 DNA ligázu (10x), „CutSmart®“ pufor (10x), T4 DNA ligáza, BsaI-HF@v2, BbsI-HF

Nippon Genetics: Midori Green

Penta: 70 % a 96 % etanol, izopropanol

Promega: DNáza I, 10x reakčný pufor s MgCl₂ pre DNázu I, 50mM EDTA, oligodtprimer, 5x pufor M-MLV, RNazin, M-MLV reverzná transkriptáza,

Sigma-Aldrich: agaróza, glycerol, 0,1 mol·l⁻¹ a 1 mol·l⁻¹ hydroxid draselný (KOH), 0,1 mol·l⁻¹ a 1 mol·l⁻¹ kyselina chlorovodíková (HCl), etyléndiamíntetraoctová kyselina (EDTA), kyselina octová, tris(hydroxymetyl)aminometán (Tris báza), Luria-Bertani (LB) broth médium, LB broth médium s agarom, „Gellan Gum“, 2- merkaptoethanol, dimethylsulfoxid (DMSO), dodecylsírán sodný (SDS), hydroxid draselný (KOH), hydroxid sodný (NaOH), hypochlorid sodný, L- prolín, methanol, sacharóza, Tris báza, Triton X-100, Tween 20, „Schenk & Hildebrant“ základná zmes solí, heptahydrát síranu horečnatého (MgSO₄·7H₂O), 1000X „Schenk & Hildebrant“ vitamíny, fluorid sodný (NaF), chlorid horečnatý (MgCl₂), 2-(N-morfolín) etansulfonová kyselina (MES), roztok „TRI reagent“

Thermo Scientific: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galaktopyranozid (X-Gal), 6x „TriTrack DNA loading dye“, ATP (10 mmol·l⁻¹), „GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder“, izopropyl β-D-1-tiogalaktopyranozid (IPTG), „Phire Hot Start II“ DNA polymeráza, 5x Phire Hot Start II DNA pufor, 10x Tango pufor, „CellROX™ Deep Red Reagent“, „SYBR™ Green I“ farbička pre nukleové kyseliny, PCR voda, „Coomassie brilliant blue G-250“.

3.1.3 Kultivačné médiá

LB tekuté médium

25 g·l⁻¹ LB broth médium

milliQ H₂O

pH 7,2 (upravené pomocou KOH); sterilizácia autoklávaním

LB tuhé médium

40 g·l⁻¹ LB broth médium s agarom

milliQ H₂O, sterilizácia autoklávaním

Kokultivačné médium

10 mM MES (pH 5,6)

150 μM acetosyringon

10 mM MgCl₂

sterilizácia roztoku cez bakteriálny filter

SH médium

3,2 g·l⁻¹ Schenk & Hildebrant základná zmes solí

1 ml·l⁻¹ 1000x Schenk & Hildebrant vitamíny (pridáva sa po autoklávaní)

30 g·l⁻¹ sacharóza

0,5 g·l⁻¹ 2(N-morfolino)etánsulfónová kyselina (MES)

milliQ voda

pH 5,7; sterilizácia autoklávaním

Médium B5H

3,1 g·l⁻¹ Gamborg základná zmes solí

0,5 g·l⁻¹ KNO₃

0,25 g·l⁻¹ MgSO₄·7H₂O

0,5 g·l⁻¹ prolín

30 g·l⁻¹ sacharóza

4,5 g·l⁻¹ Gellan Gum

1 ml·l⁻¹ 1000x Gamborg vitamíny (pridáva sa po autoklávaní)

30 ml·l⁻¹ roztok aminokyselin (pridáva sa po autoklávaní)

1 ml·l⁻¹ 2,4-D (pridáva sa po autoklávaní)

1 ml·l⁻¹ kinetín (pridáva sa po autoklávovaní)
1000 ml miliQ voda
pH 5,7; sterilizácia autoklávovaním

Médium B50

3,1 g·l⁻¹ Gamborg B5 základná zmes solí
0,5 g·l⁻¹ KNO₃
0,25 g·l⁻¹ MgSO₄·7H₂O
0,5 g·l⁻¹ prolín
30 g·l⁻¹ sacharóza
4,5 g·l⁻¹ Gellan Gum
1 ml·l⁻¹ 1000x Gamborg vitamíny (pridáva sa po autoklávovaní)
30 ml·l⁻¹ roztok aminokyselin (pridáva sa po autoklávovaní)
1000 ml miliQ voda
pH 5,7; sterilizácia autoklávovaním

MMS médium

4,3 g·l⁻¹ Murashige & Skoog základná zmes solí (MS salts)
0,1 g·l⁻¹ myoinozitol
30 g·l⁻¹ sacharóza
4,5 g·l⁻¹ Gellan Gum
1 ml·l⁻¹ Nitsch & Nitsch vitamíny (pridáva sa po autoklávovaní)
1000 ml miliQ voda
pH 5,7; sterilizácia autoklávovaním

MS médium

4,3 g·l⁻¹ Murashige & Skoog základná zmes solí (MS salts)
30 g·l⁻¹ sacharóza
4,5 g·l⁻¹ Gellan Gum
1000 ml miliQ voda
pH 5,7; sterilizácia autoklávovaním

3.1.4 Roztoky a pufry

Roztok spektinomycínu

0,5 g spektinomycín

5 ml milliQ voda

sterilizácia roztoku cez bakteriálny filter, uchovávané v mrazničke pri teplote -20 °C

Roztok ampicilínu

0,25 g ampicilín

5 ml milliQ voda

sterilizácia roztoku cez bakteriálny filter, uchovávané v mrazničke pri teplote -20 °C

Roztok gentamicínu

0,1 g gentamcín

2 ml milliQ voda

sterilizácia roztoku cez bakteriálny filter, uchovávané v mrazničke pri teplote -20 °C

Roztok rifampicínu

0,25 g rifampicín

5 ml metanol

sterilizácia roztoku cez bakteriálny filter, uchovávané v mrazničke pri teplote -20 °C

Roztok tikarcilínu

2,5 g tikarcilín

5 ml milliQ voda

sterilizácia roztoku cez bakteriálny filter, uchovávané v mrazničke pri teplote -20 °C

Roztok dexametazónu

39, 2 mg dexametazón

500 µl DMSO

sterilizácia roztoku cez bakteriálny filter, uchovávané v tme v mrazničke pri teplote -20°C

Roztok aminokyselín

6,65 g glutamín

0,83 g serín

0,004 g adenín
0,083 g L-glutatión
250 ml miliQ voda

sterilizácia roztoku cez bakteriálny filter, uchovávané v chladničke pri teplote 4 °C

Roztok 2,4-D

10 mg 2,4-D
50 µl etanol
150 µl 1M NaOH
10 ml miliQ voda

sterilizácia roztoku cez bakteriálny filter, uchovávané v mrazničke pri teplote -20 °C

Roztok kinetínu

1 mg kinetín
20 µl 1M NaOH
10 ml miliQ voda

sterilizácia roztoku cez bakteriálny filter, uchovávané v mrazničke pri teplote -20 °C

50x Tris-acetátový pufor (TAE)

121 g Tris báza
28,55 ml kyselina octová
50 ml EDTA
421,45 ml milliQ H₂O
pH 7,8

1x TAE

20 ml 50x TAE
1980 ml milliQ H₂O

1 % (w/v) agarózový gél

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

3.1.5 Kity

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG: „NucleoSpin® Plant II kit“ na izoláciu genómovej DNA z transgénnych rastlín.

Omega Bio-tek: E.Z.N.A.® „Plasmid DNA Mini Kit I“ na izoláciu plazmidovej DNA z vyselektovaných bakteriálnych kolónií.

Thermo Scientific: „GeneJET Gel Extraction Kit“ na purifikáciu DNA fragmentov z agarózového gélu, „Phire Plant Direct PCR Kit“ na PCR genotypizáciu.

3.1.6 Použité restriktčné endonukleázy

Thermo Scientific: NheI

New England BioLabs: BsaI, BbsI

3.1.7 Použité primery

Všetky použité primery spolu s cieľom a sekvenciou sú uvedené v Tab. 4 – 6.

Tab. 4: Použité primery pre amplifikáciu požadovaných úsekov DNA.

Názov primeru	Cieľ	5'-3' sekvencia
tG7_149_F	colony PCR	TGCTTGGACTATAATACCTGACTTGT
pNOS_115_R		CTCAGTGGCTCCTTCAACGT
Hyg_Res_FW	overenie prítomnosti	CTCGGAGGGCGAAGAATCTC
Hyg_Res_Rev	transgénu v rastlinách	ATTTGTGTACGCCCCGACAGT
qUBQ_fw	amplifikácia <i>UBQ10</i>	CATGACCCACCTGCAGGAAT
qUBQ_rev	počas qRT-PCR	GTGGGTGGCTTGTTCGGATA
qGAPDH_fw1	amplifikácia <i>GAPDH</i>	GTGTGCCAACACCAAACGTC
qGAPDH_rev1	počas qRT-PCR	CTCCTTGGCTGCACTGTCTC
qACT2m_F2	amplifikácia <i>ACT2</i> počas	GGATAAGAGGTGAGATCGGAGGG
qACT2m_R2	qRT-PCR	GCAACCAACCTACAGACATCCAG
MMK2_Ex5_F	amplifikácia 5. exónu	ACCTGATGATGCCAGCCTTG
MMK2_Ex5_R	<i>MMK2</i> počas qRT-PCR	CACCTGGAGACATGTTGGGA
MMK3_Ex6_F	amplifikácia 6. exónu	TGAGGAAGCACTGAATCACCC
MMK3_Ex6_R	<i>MMK3</i> počas qRT-PCR	ACTCCCTCCATATGAGCTCCT
MMK3_5'UTR_FW	amplifikácia 1. exónu	TGTGGACATAGATTCTTGACCGA
MMK3_Ex2_REV	<i>MMK3</i>	GCACGCAACTATTTACCTGGC

ACT2 – gén kódujúci aktín 2; F/FW: forward primer; *GAPDH* – gén kódujúci glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenázu; R/REV: reverse primer; *UBQ10* – gén kódujúci ubikvitín

Tab.5: Použité primery na sekvenáciu požadovaných DNA úsekov.

Názov primeru	Cieľ	5'-3' sekvencia
	sekvenácia gRNA	
oligo 62	naklonovaných do vstupných vektorov	CGACGGCCAGGTAATACGACT
MMK3_5'UTR_FW	sekvenácia 1. exónu <i>MMK3</i>	TGTGGACATAGATTCTTGACCGA

FW – forward; gRNA – „guide RNA“, navádzajúca RNA

Tab. 6: Primery použité na oligo klonovanie molekúl gRNA pre mutagenézu *MMK3*.

gRNA	Názov primeru	5'-3' sekvencia
gRNA 1	MsMMK3_gRNA1Ex1F1	ATTGGATTCTCTCTTCAACCCGT
	MsMMK3_gRNA1Ex1R1	AAACACGGGTTGAAGAGGAGGAATC
gRNA 216	MsMMK3_gRNA216Ex1F1	ATTGGAGTTTGCTTTCAGATTC
	MsMMK3_gRNA216Ex1R1	AAACGAATCTGAGAAAGCAAATC
gRNA 63	MsMMK3_gRNA63Ex2F1	ATTGGACGAACTCAGATACGAATGA
	MsMMK3_gRNA63Ex2R1	AAACTCATTCGTATCTGAGTTCGTC
gRNA 50	MsMMK3_gRNA50Ex4F1	ATTGGTGCATGAAGTCTGTCTCAG
	MsMMK3_gRNA50Ex4R1	AAACCTGAGACAGACTTCATGACAC

F– forward primer; gRNA – „guide RNA“, navádzajúca RNA; R – reverse primer. Modrou farbou sú vyznačené 4-nukleotidové presahy kompatibilné s akceptorovými vektormi. Zvýraznené písmená označujú pridaný nukleotid.

3.2 Prístroje

Analytické váhy XA 110/2X (Radwag)

Autokláv Sterivap HP IL (MMM Group)

Centrifuga ROTANTA 460R (Schoeller Instruments)

Centrifuga Scan Speed 1730 MR (Scala Scientific)

Elektromagnetická miešačka MSH-420 (Boeco)

Elektroporátor ECM399 (BTX)

Epifluorescenčný mikroskop Axio Imager.M 2 (Zeiss)

Fytotronová komora (Weiss Gallenkamp)

Inkubátor s nastaviteľnou teplotou (Mettler)

Konfokálny laserový skenovací mikroskop LSM 710 (Zeiss)

Laboratórne váhy S1502 (BEL-Engineering)

Mikrocentrifuga Microfuge16 (Beckman Coulter)

Mikroskop AXIO Zoom V.16 (Zeiss)
NanoDrop Lite (Thermo Scientific)
PCR cycler T100 Thermal Cycler (BioRad)
pH meter stolný PC 2700 (Eutech instruments)
Real-time qPCR systém QuantStudio™5 (Termo Fisher Scientific)
Simplicity Water Purification System (Merck)
Skener (Image Scanner III)
Sterilný laminárny box (Merci)
Termoblok ThermoStat C (Eppendorf)
Trepáčka s nastaviteľnou teplotou ES-20 (Biosan)
UV transiluminátor Gel Doc™ EZ Imager (program Image Lab 4.0.1., Bio-Rad)
Vortex Microspin FV2400 (Biosan)

3.3 Software

Image Lab 4.0.1., 6.0.1., Microsoft Office 365, Geneious Prime 2023, Zeiss Zen 3.5, QuantStudio™ Design and Analysis, DataAssist 3.01, i-control™ Microplate Reader Software (Tecan)

3.4 Metódy

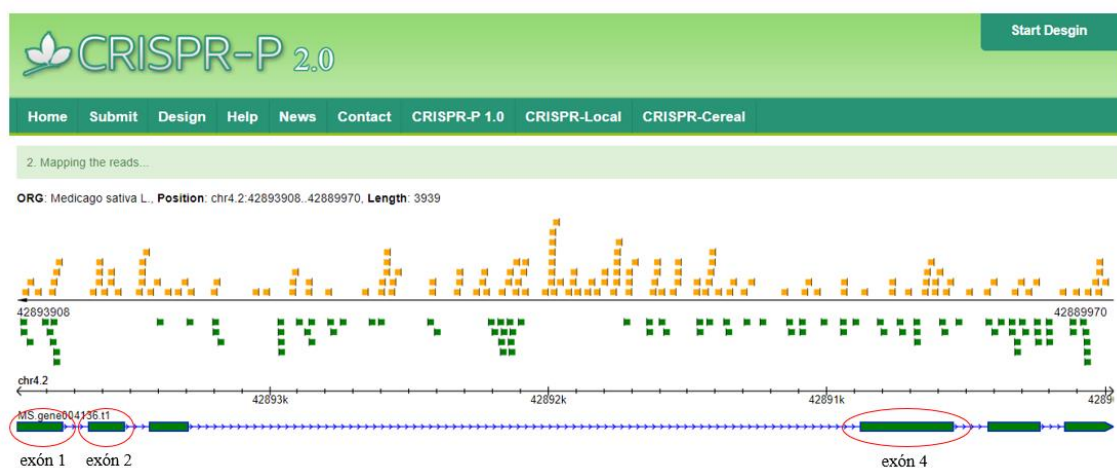
3.4.1 Návrh gRNA pre mutagenézu *MMK3*

Gén *MMK3* pre jeho editáciu u lucerny siatej bol identifikovaný ako medsa.XinJiangDaYe.gnm1.ann1.MS.gene004136.t1 s lokusom chr4.2:42893908:42889970. Sekvencia bola získaná z referenčného genómu kultivaru XinJiangDaYe použitím databázy

https://legacy.legumeinfo.org/gb2/gbrowse/medsa.XinJiangDaYe.gnm1/?label=medsa_xinjiangdaye_gnm1_gene_models. Príslušný fragment genómovej DNA obsahujúci *MMK3* bol amplifikovaný pomocou PCR a následne podrobený sekvenáčnej analýze.

Po zverejnení sekvencií genómu kultivaru RSY, získanej z databázy https://data.legumeinfo.org/Medicago/sativa/genomes/RegenSY27x.gnm0_9.2VSM, boli sekvencie génu *MMK3* porovnané.

Návrh vodiacich RNA prebiehal podľa Brazelton et al. (2015); Meng et al. (2017); Gerashchenkov et al. (2020), podobne ako prebiehal návrh štyroch gRNA (nazvané gRNA3, 14, 33, 19) pre mutagenézu *MMK2* počas bakalárskej práce, na ktorú táto diplomová práca nadväzuje. Pomocou internetového nástroja CRISPR-P 2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>) boli vygenerované gRNA, z ktorých boli vybrané štyri. Na Obr. 4 je znázornený návrh gRNA v CRISPR-P 2.0. Samotné gRNA ako aj kritériá ich výberu sú uvedené v kapitole 5.



Obr. 4: Návrh gRNA pre vyradenie funkcie génu *MMK3* u lucerny pomocou online nástroja CRISPR-P 2.0. Štvorčeky označujú jednotlivé gRNA, z ktorých boli vybrané gRNA zacielené na 1., 2. a 4. exón (označené červenými elipsami).

3.4.2 Príprava dvojvláknových oligonukleotidov obsahujúcich gRNA

Pred samotným klonovaním molekúl gRNA do príslušných akceptorových vektorov boli pomocou oligo klonovania s využitím navrhnutých primerov, zhrnutých v Tab. 6, vytvorené dvojvláknové oligonukleotidy obsahujúce gRNA so 4-nukleotidovými presahmi na ich 5' koncoch. Tento proces ako aj samotná príprava multiplexných CRISPR-KO vektorov prebiehali podľa Decaestecker et al. (2019).

Zloženie reakcie je uvedené v Tab. 7 a teplotný program termocykléru počas prípravy dvojvláknových oligonukleotidov je zhrnutý v Tab. 8.

Tab. 7: Zloženie reakcie pre tvorbu dvojvláknových oligonukleotidov obsahujúcich gRNA.

Zložka reakčnej zmesi	Objem (μl)
forward primer ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	1
reverse primer ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	1
milliQ H ₂ O	48
celkový objem	50

Tab. 8: Teplotný program termocykléru počas tvorby molekúl gRNA.

Krok cyklu	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas	Počet cyklov
nasadenie primerov	95	5 min	1
inkubácia	95 (-2 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$)	1 s	5
inkubácia	85 (-0,1 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$)	10 s	60

3.4.3 „Golden Gate“ klonovanie gRNA do príslušných akceptorových vektorov

Klonovanie metódou „Golden Gate“ umožňuje inkorporáciu niekoľkých inzertov do akceptora naraz, prostredníctvom jednej reakcie. Využívajú sa enzýmy BpiI a BsaI, patriace do typu II S, ktoré štiepia DNA mimo svojej rozpoznávacej sekvencie za tvorby nepalindromických 4-nukleotidových presahov. Následne sú požadované konštrukty spájané na základe komplementarity vytvorených presahov. Pomocou „Golden Gate“ klonovania boli vytvorené molekuly gRNA so 4-nukleotidovými presahmi, klonované na základe komplementarity báz do príslušných akceptorových vektorov uvedených v Tab. 2. Úspešnosť klonovania bola overená restričným štiepením a Sangerovým sekvenovaním izolovanej plazmidovej DNA (pDNA) z transformovaných bakteriálnych kolónií *E. coli* (DH5 α).

Zloženie Golden Gate klonovacej reakcie je uvedené v Tab. 9 a teplotný program termocykléru pre Golden Gate klonovanie molekúl gRNA do akceptorových vektorov je uvedený v Tab. 10.

Tab.9: Zloženie „Golden Gate“ reakcie pre klonovanie gRNA do akceptorových vektorov.

Zložka reakčnej zmesi	Množstvo	Objem (μ l)
oligonukleotid obsahujúci gRNA		1
akceptorový vektor	100 ng	1
10x CutSmart pufor	1x	1,5
ATP (10 mmol \cdot l $^{-1}$)	1 mmol \cdot l $^{-1}$	1,5
BsaI	5 U	0,5
T4 DNA ligáza	200 U	0,5
milliQ H $_2$ O		9
celkový objem		15

Tab.10: Teplotný program „Golden Gate“ klonovacej reakcie.

Krok cyklu	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas	Počet cyklov
štiepenie	37	3 min	30
ligácia	16	3 min	
inaktivácia BsaI	50	5 min	1
inaktivácia ligázy	80	5 min	1

3.4.4 Príprava finálnych multiplexných CRISPR-KO vektorov

3.4.4.1 Dizajn klonovania

Najprv prebehlo klonovanie *in silico* pomocou programu „Geneious Prime“. Na 5' konce navrhovaných primerov boli vložené rozpoznávacie sekvencie restriktčných enzýmov a 4 - nukleotidové presahy vzhľadom na typ klonovania a modul. Príslušný akceptorový vektor a *in silico* amplifikovaný inzert boli najprv štiepené príslušným restriktčným enzýmom a následne boli ligované na základe komplementarity báz prostredníctvom funkcie „Klonovanie“ a „Ligovať sekvencie“, pričom v prípade „Green Gate“ klonovania bola zvolená možnosť „Klonovanie“ a následne „Typ II S klonovanie“. Výsledné produkty klonovacích reakcií boli následne vizualizované, čím bola skontrolovaná správnosť ich dizajnu. Takto pripravené konštrukty boli použité pri návrhu restriktčného štiepenia plazmidovej DNA na overenie úspešnosti reálneho klonovania. Výsledky sekvenovania boli porovnávané s overovanou sekvenciou pomocou nástroja „Zarovnať/zostaviť“ („Align/assemble“) a následne „Mapovať k referencii“ („Map to reference“).

3.4.4.2 „Green Gate“ klonovanie multiplexných CRISPR-KO vektorov pre mutagenézu *MMK2* a *MMK3*.

„Green Gate“ metóda klonovania sa od „Golden Gate“ metódy líši tým, že počet klonovacích modulov je v tomto prípade redukovaný na 6. Avšak hlavným rozdielom je, že sa používa len enzým *BsaI*. Ďalším rozdielom je, že vytvorené 4-nukleotidové presahy nie sú kompatibilné s „Golden Gate“ metódou. V tejto práci boli tieto presahy pre zjednodušenie nazvané písmenami A – G.

Pripravené destinačné CRISPR vektory pozostávali z promótoru (konštitutívneho alebo indukčného), *Cas9*, fluorescenčnej značky a terminátora, za ktorým nasledoval fragment *BsaI-CcdB-Cm^R-BsaI*, obsahujúci klonovacie miesta A a G. Tento fragment bol po klonovaní gRNA do príslušných akceptorových vektorov nahradený kazetami obsahujúcimi gRNA. Prostredníctvom „Green Gate“ klonovania bol zároveň inkorporovaný linker z konštruktu pGG-E-linkerII-G, ktorý spája poslednú kazetu s gRNA končiacu miestom E s miestom G v CRISPR destinačných vektoroch. Týmto spôsobom boli skonštruované multiplexné CRISPR-KO vektory nesúce štyri gRNA pre cielenú mutagenézu *MMK2* a *MMK3*. Úspešnosť klonovania vektorov bola overená restriktčným štiepením pDNA transformovaných bakteriálnych kolónií *E. coli*

(DH5 α /NEB® Stable). Zloženie „Green Gate“ klonovacej reakcie je zhrnuté v Tab 11. a teplotný program termocykléru pre „Green Gate“ reakciu je uvedený v Tab. 12.

Tab.11: Zloženie „Green Gate“ klonovacej reakcie za účelom prípravy multiplexných CRISPR-KO vektorov pre mutagenézu *MMK2* a *MMK3*.

Zložka reakčnej zmesi	Špecifikácia	Množstvo	Objem (μ l)
ozbrojený vektor A – B	vektor nesúci gRNA 3/1	100 ng	1
ozbrojený vektor B – C	vektor nesúci gRNA 14/216	100 ng	1
ozbrojený vektor C – D	vektor nesúci gRNA 33/63	100 ng	1
ozbrojený vektor D – E	vektor nesúci gRNA 19/50	100 ng	1
E-linkerII-G	linker spájajúci poslednú kazetu s gRNA a destinačný vektor	100 ng	1
destinačný vektor		100 ng	1
10x CutSmart pufor		1x	1,5
ATP (10 mmol \cdot l $^{-1}$)		1 mmol \cdot l $^{-1}$	1,5
BsaI		10 U	0,5
T4 DNA ligáza		200 U	0,5
milliQ H $_2$ O			5
celkový objem			15

Tab. 12: Teplotný program „Green Gate“ klonovacej reakcie.

Krok cyklu	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
štiepenie	37	3 min	30
ligácia	16	3 min	
inaktivácia BsaI	50	5 min	1
inaktivácia ligázy	80	5 min	1

3.4.6 Transformácia chemokompetentných buniek *E. coli*

Chemokompetentné bunky *E. coli* (50 µl) boli rozmrazené na ľade. Následne bola pridaná klonovacia reakcia o objeme 2 µl. Zmes bola jemne premiešaná a ponechaná 30 min na ľade. Po 30. minútach boli mikroskúmavky s bunkami umiestnené do termobloku nastaveného na 42 °C po dobu 30 s (kmeň NEB® Stable) alebo 45 s (kmeň DH5α). Po tejto inkubácii boli vzorky ihneď umiestnené naspäť na ľad na 2 min. Potom bolo k bunkám pridaných 300 µl tekutého LB média (DH5α) alebo 400 µl NEB® Stable média (NEB® Stable). Následne bola transformačná zmes inkubovaná 1 h pri 37 °C (DH5α) alebo 30 °C (NEB® Stable), pri 200 RPM.

3.4.7 Kultivácia baktérii *E. coli*, selekcia kolónii obsahujúcich požadovaný konštrukt a izolácia plazmidovej DNA

Na tuhé LB médium v Petriho miskách s prídavkom selekčného antibiotika (Tab. 3), 40 µl IPTG a 120 µl X-Gal, bola pomocou sterilnej plastovej hokejky rozotretá transformačná zmes. Baktérie boli ponechané v inkubátore cez noc pri teplote 37 °C (DH5α) alebo 30 °C (NEB® Stable). Na druhý deň boli jednotlivé bakteriálne kolónie prenesené pomocou sterilného špáradla do 10 ml tekutého LB média s prídavkom príslušného antibiotika. Inokulované médium bolo inkubované cez noc na trepačke pri 37 °C (DH5α) alebo 30 °C (NEB® Stable) a 200 RPM. Po uplynutí doby inkubácie bola pDNA izolovaná podľa protokolu, ktorý bol súčasťou kitu E.Z.N.A.® Plasmid DNA Mini Kit I. Koncentrácia izolovanej pDNA bola potom meraná pomocou NanoDropu a vzorky boli umiestnené do mrazničky a uchovávané pri teplote -20 °C.

3.4.8 Overovanie konštruktov restriktčným štiepením

Produkty klonovania boli vždy overené pomocou restriktčného štiepenia. Samotné štiepenie bolo najprv vykonané *in silico* v programe „Geneious Prime“. Zvolený bol restriktčný enzým s 2 až 4 rozpoznávacími miestami v pripravenom konštrukte a vždy bol zaznamenaný očakávaný výsledok (podľa dĺžky jednotlivých fragmentov DNA). Zložky reakčnej zmesi (Tab. 13) boli zmiešané v mikroskúmavke a ponechané v inkubátore 1 h pri 37 °C (DH5α) alebo 30 °C (NEB® Stable).

Tab. 13: Zloženie reakcie restriktčného štiepenia DNA.

Zložka	Objem (μl)
10x pufor	2
restikčný enzým	0,5
PCR H ₂ O	16,5
DNA	1
celkový objem	20 μl

3.4.9 Gélová elektroforéza a izolácia DNA z agarového gélu

Separácia fragmentov DNA prebehla pomocou elektroforézy v 1 % agarózovom géli, ktorý bol pripravený zahrievaním adekvátneho množstva agarózy v 1x TAE pufri. Následne bolo do rozpustenej agarózy pridané farbivo „Midori Green“ (1 μl/100 ml) a zmes bola premiešaná. Agaróza bola naliata do pripravenej formy obsahujúcej hrebeň a ponechaná stuhnúť v digestore približne 30 min. Po stuhnutí bola forma s gélom prenesená do elektroforetickej vaničky a zaliata 1x TAE pufrom. Následne bol opatrne odstránený hrebeň z gélu a do prvej jamky bol pridaný marker GeneRuler™ 1 kb Plus. Jednotlivé vzorky boli po pridaní nanášacej farbičky pipetované do ďalších jamiek (10 μl vzorky/2 μl farbiva 6x TrickTrack DNA loading dye). Nasledovala separácia fragmentov pod elektrickým napätím 100 V približne 20 – 40 minút. Fragmenty DNA boli potom vizualizované pomocou UV transiluminátoru Gel Doc™ EZ Imager a analyzované v programe „Image Lab“. Získané výsledky boli porovnávané *in silico* predpokladanými, a na tomto základe bola vyhodnotená úspešnosť predošlých krokov. Vzorky úspešne overené restriktčným štiepením boli pripravené spolu so špecifickými primermi (Tab. 5) podľa voľne dostupného manuálu a odoslané na sekvenovanie do firmy SeqMe (Dobříš, Česká republika). V prípade PCR amplifikácie alebo restriktčného štiepenia, boli produkty reakcie na základe predikovanej veľkosti vyrezané z agarózového gélu a pomocou skalpelu vložené do 2 ml mikroskúmaviiek. DNA bola následne extrahovaná pomocou kitu „GeneJET Gel Extraction Kit“ podľa priloženého manuálu. Koncentrácia izolovanej DNA bola nameraná pomocou NanoDropu a vzorky boli uchovávané v mrazničke pri teplote - 20 °C.

3.4.10 Transformácia chemokompetentných buniek *A. tumefaciens* (kmeň GV3101)

Bunky *A. tumefaciens* (100 μl) boli rozmrazené na ľade. Následne bolo pridaných 5 – 10 μl konštruktú. Zmes bola jemne premiešaná a ponechaná na ľade 30 - 40 min. Po uplynutí tejto doby boli mikroskúmavky s bunkami vložené do tekutého dusíka na 5 min.

Následne boli bunky ponechané 15 min. na izbovej teplote a potom k nim bolo sterilne pridaných 400 μl SOC média. Transformačná zmes bola inkubovaná v tme 2 h pri 28 °C a 180 RPM.

3.4.11 Metóda colony PCR

Pomocou metódy „colony PCR“ bola overená úspešnosť transformácie pripravených multiplexných CRISPR/Cas9 vektorov do *A. tumefaciens*. „Colony PCR“ slúžila na potvrdenie, či bol požadovaný inzert naozaj inkorporovaný do vyselektovaných kolónií odobraných z tuhého LB média s prídavkom selekčného antibiotika. Požadovaný úsek DNA bol amplifikovaný pomocou primerov uvedených v Tab. 4, ktoré špecificky ohraničovali daný úsek DNA. Všetky zložky reakcie (Tab. 14) boli zmiešané v mikroskúmavke. Do reakčnej zmesi bolo pomocou sterilnej špičky prenesené malé množstvo baktérii z viacerých kolónií pre každý variant klonovaného konštruktu. Pre negatívnu kontrolu bola sterilná špička jemne pichnutá do média vedľa bakteriálnej kolónie. Reakcia bola následne umiestnená do termocykléru nastaveného na program uvedený v Tab. 15. Predpokladaná dĺžka produktu bola následne overená pomocou 1 % agarózovej elektroforézy.

Tab. 14: Zloženie reakčnej zmesi pre „DreamTaq“ polymerázu.

Zložka reakčnej zmesi	Objem (μl)
dNTP ($10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$),	0,4
templátová DNA ($100 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	2
primer ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	1
primer ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	1
DreamTaq polymeráza	0,1
10x DreamTaq pufor	2
PCR H ₂ O	13,5
celkový objem	20

Tab. 15: Teplotný program „colony PCR“ s použitím „DreamTaq“ polymerázy.

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
počiatočná denaturácia	95	3 min	1x
denaturácia	95	30 s	
nasadenie primerov	64,7	30 s	35x
elongácia	72	1 min 45 s	
finálna elongácia	72	10 min	1x

3.4.12 Príprava nočnej kultúry *A. tumefaciens*

Do 10 ml LB média vo Falcon skúmavke boli pridané selekčné antibiotiká spektinomycín a rifampicín. Časť média (2 ml), bola odobraná a kultivovaná zvlášť, pričom neskôr, pri meraní optickej hustoty bakteriálnej kultúry, slúžila ako „blank“. 10 ml LB média s antibiotikami bolo inokulovaných bakteriálnou kultúrou *A. tumefaciens* (15 μ l), obsahujúcou požadovaný konštrukt. Falcon skúmavky boli kultivované cez noc v tme, pri 28 °C a 180 RPM.

3.4.13 Tranzientná transformácia listov *N. benthamiana*

Z overených bakteriálnych kolónií obsahujúcich multiplexné CRISPR-KO vektory boli pripravené nočné kultúry. Na druhý deň ráno boli rastliny *N. benthamiana* zaliate vodou, aby došlo k otvoreniu prieduchov. Následne bola pomocou spektrofotometra meraná optická hustota („optical density“) bakteriálnej kultúry, ktorej požadovaná hodnota absorbancie pri vlnovej dĺžke 600 nm (OD_{600}) mala dosahovať 0,5-1. Po dosiahnutí optimálnej hodnoty boli bakteriálne kultúry centrifugované 10 min. pri 4 °C a 4000 RPM. Po centrifugácii bol odstránený supernatant a vzniknutý pelet bol rozsuspendovaný v 2 ml kokultivačného média, pričom tento krok bol zopakovaný ešte raz, aby došlo k vymytiu zvyšku antibiotík. Ďalej bola zmeraná OD_{600} tejto bakteriálnej suspenzie a ako „blank“ bolo použité čisté kokultivačné médium. Následne bola kultúra nariadená tak, aby bolo výsledné OD_{600} 0,7 a konečný objem 2 ml, a potom inkubovaná 2 h v tme pri izbovej teplote. Po inkubácii bola bakteriálna suspenzia infiltrovaná do spodnej strany listov *N. benthamiana* pomocou infiltračnej striekačky. Zároveň bolo do ďalších listov infiltrované čisté kokultivačné médium, slúžiace ako negatívna kontrola. Tieto rastliny boli označené a premiestnené do fytotronu. Na tretí deň po transformácii bola pozorovaná abaxiálna strana listov pomocou konfokálneho laserového skenovacieho mikroskopu („confocal laser scanning microscope“, CLSM). Transformované listy obsahujúce konštrukty s inducibilným systémom CRISPR-KO, boli ošetrené 20 μ mol \cdot l⁻¹ roztokom dexametazónu vo vode. Roztok induktora expresie bol rozotrený po listoch pomocou štetca a dané oblasti boli označené. Zároveň bola pripravená aj kontrola, pri ktorej boli listy ošetrené len rozpúšťadlom (DMSO) vo vode bez prídavku dexametazónu. Listy boli pozorované pomocou CLSM po 2 h od prídavku chemického induktora.

3.4.14 Konfokálna laserová skenovacia mikroskopia

Na položené sklíčko s kvapkou vody bol premiestnený kúsok transformovaného lista *N. benthamiana*. Na list bolo jemne umiestnené krycie sklíčko a na hrany bol upevnený

parafilm, z dôvodu eliminácie odparovania tekutiny. Takto pripravený preparát bol pozorovaný pomocou konfokálneho laserového skenovacieho mikroskopu LSM 710 (Carl Zeiss), s využitím objektívu Plan-Apochromat 20x/0,8 NA a pomocou programu Zeiss Zen 2012 (čierna edícia). Použité lasery pre snímanie boli: GFP 488 nm, mCherry 561 nm.

3.4.15 Príprava bakteriálnych konzerv

Overené bakteriálne kolónie transformovaných buniek boli kultivované v 4 ml tekutého LB média s prídavkom selekčného antibiotika (uvedeného spolu s koncentráciou v Tab. 3) cez noc pri teplote 28 °C a v tme v prípade *A. tumefaciens* alebo 37 °C a otáčkach 200 RPM v prípade *E. coli*. Následne bolo sterilne odobraných 500 µl z narastených bakteriálnych kultúr a pridaných 500 µl 50 % glycerolu. Takto pripravené vzorky boli dôkladne premiešané, zamrazené pomocou tekutého dusíka a uchovávané v mrazničke pri teplote -80 °C.

3.4.16 Príprava kultivačných médií

Všetky chemikálie, ktoré boli potrebné na prípravu príslušného média, boli navážené pomocou laboratórnych váh a postupne boli rozpúšťané pomocou elektromagnetickej miešačky v približne 3/4 konečného objemu milliQ vody. Následne bolo upravené pH pomocou kyseliny alebo zásady na požadovanú hodnotu. Objem média bol doplnený vodou na potrebnú hodnotu, pH bolo opäť zmerané a v prípade potreby upravené. Napokon bolo pripravené médium rozliate do sklenených fliaš a sterilizované v autokláve. Chemikálie, ktoré nebolo vhodné pridať do média pred sterilizovaním z dôvodu možnej degradácie, boli do média pridané až po jeho vychladnutí na teplotu približne 60 °C. Sterilné kultivačné médiá boli potom v laminárom boxe rozlievané do sterilných Petriho misiek.

3.4.17 Stabilná transformácia lucerny siatej a regenerácia rastlín pomocou somatickej embryogenézy

S využitím baktérie *A. tumefaciens* boli overené multiplexné CRISPR-KO vektory stabilne transformované do listového pletiva lucerny siatej. Na túto stabilnú transformáciu sa využili listy 2. až 5. stonkového uzlu nekvitnúcej rastliny RSY. Celý proces prebiehal podľa protokolu Samac a Austin-Phillips (2006). Samotná transformácia lucerny ako aj výmena kultivačných médií nevyhnutných pre úspešnú regeneráciu rastlín prebiehali v laminárnom boxe za aseptických podmienok. Nástroje pre prácu boli

sterilizované v autokláve alebo 96 % etanolom a následne teplotným sterilizátorom v laminárnom boxe. Rastlinný materiál bol kultivovaný na pripravených kultivačných médiách s antibiotikami, ktoré sú uvedené v Tab.16. Petriho misky s rastlinným materiálom boli kultivované vo fytokomore s konštantnou teplotou 21 °C, vlhkosťou 71 % a fotoperiódou 16 h svetlo/8 h tma.

Tab. 16: Selekčné antibiotiká pridávané do kultivačných médií počas somatickej embryogenézy lucerny siatej.

Selekčné antibiotikum	Zásobná koncentrácia (mg·ml⁻¹)	Požadovaná koncentrácia (mg·ml⁻¹)
tikarcilín	500	500
hygromycín	50	7,5

3.4.17.1 Sterilizácia listov lucerny siatej

Z kontrolnej rastliny *M. sativa* RSY v *ex vivo* podmienkach boli odstrihnuté zdravé listy a ihneď vložené do Falcon skúmavky naplnenej 40 ml vody z vodovodu. Ďalej sa už pracovalo v laminárnom boxe so sterilnými roztokmi. Prvým krokom bola sterilizácia listov v 30 ml 70 % ethanolu po dobu 5-10 s. Následne boli listy pomocou pinzety prenesené do Falcon skúmavky obsahujúcej 40 ml roztoku milliQ vody s prídavkom 40 μ l Tween-20 a boli viackrát premiešané po dobu 2 min. Potom boli listy prenesené do roztoku milliQ vody (36 ml), hypochloridu sodného (4 ml) a Tween-20 (40 μ l). V tejto Falcon skúmavke boli listy pretrepávané max. 1,5 min. Následne boli listy 3x premyté v sterilnej destilovanej vode v Petriho miskách.

3.4.17.2 Stabilná transformácia listových explantátov lucerny siatej

Deň pred stabilnou transformáciou bola sterilne pripravená nočná kultúra *A. tumefaciens* obsahujúca multiplexné CRISPR-KO vektory. Na druhý deň ráno bola pomocou spektrofotometra meraná optická hustota bakteriálnej kultúry, pričom optimálna OD₆₀₀ mala dosahovať hodnoty 0,6 - 0,8. Po jej dosiahnutí bola bakteriálna kultúra centrifugovaná 5 min. pri otáčkach 3 000 RPM. Supernatant bol odstránený a pelet bol rozsuspendovaný v čistom LB médiu bez prídavku antibiotík.

Vysterilizované listy boli pomocou skalpelu prerezané na polovicu a jemným pritláčaním skalpelu na povrch listu boli vytvorené drobné rany pre lepšiu infiltráciu baktérií. Takto pripravené explantáty boli premiestnené do Falcon skúmavky s 12 ml SH média, ku ktorým boli pridané 3 ml pripravenej kultúry *A. tumefaciens*. Následne boli listové explantáty s bakteriálnou suspenziou v SH médiu ponechané vo Falcon skúmavkách 30 min. v tme za jemného miešania na trepačke. Po uplynutí doby inkubácie boli explantáty osušené na filtračnom papieri a prenesené na čisté B5H médium.

3.4.17.3 Kultivácia lucerny siatej na B5H médiu

Ihneď po transformácii listových explantátov lucerny suspenziou *A. tumefaciens* boli explantáty umiestnené na B5H médium bez prídavku antibiotík, ktoré obsahovalo rastové regulátory kinetín a 2,4-D, indukujúce tvorbu kalusov. Po šiestich dňoch od transformácie bol na povrchu explantátov pozorovaný biely povlak kolónií *A. tumefaciens*. Listové explantáty boli viackrát premyté v sterilnej vode, čím boli zbavené bakteriálnej kultúry a následne boli osušené na filtračnom papieri a prenesené na B5H médium s prídavkom selekčných antibiotík tikarcilín (500 mg·ml⁻¹) a hygromycín (7,5 mg·ml⁻¹).

3.4.17.4 Kultivácia lucerny siatej na B50 médiu

Asi po 3 týždňoch od transformácie boli pozorované dobre vyvinuté kalusy. Tie boli prenesené na B50 médium s prídavkom selekčných antibiotík tikarcilín ($500 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) a hygromycín ($7,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), ktoré ale už neobsahovalo rastové regulátory, následkom čoho dochádzalo k tvorbe somatických embryí.

3.4.17.5 Kultivácia lucerny siatej na MMS médiu

Prvé somatické embryá boli pozorované asi po 5 týždňoch od transformácie. Vyvinuté embryá boli potom prenesené na MMS médium s prídavkom selekčných antibiotík tikarcilín ($500 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) a hygromycín ($7,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), ktoré indukovalo vývoj koreňovej sústavy.

3.4.17.6 Kultivácia lucerny siatej na MS médiu

Somatické embryá s vyvinutým koreňom boli opatrne prenesené na MS médium, ktoré už neobsahovalo antibiotiká. Toto médium obsahovalo všetky esenciálne živiny pre rast a vývoj celej rastliny.

3.4.18 Selekcia transgéennej lucerny siatej obsahujúcej multiplexné CRISPR-KO vektory

Ako už bolo uvedené, multiplexné CRISPR-KO vektory obsahujú gén rezistencie voči antibiotiku hygromycín. Počas regenerácie rastlín lucerny prebiehala selekcia rastlín obsahujúcich transgén na kultivačných médiách s prídavkom tohto selekčného antibiotika. Následne, somatické embryá, transformované multiplexnými vektormi CRISPR-KO s konštitutívnou nadexpresiou *Cas9*, boli približne pätnásty týždeň od transformácie pozorované pomocou ZOOM mikroskopu a následne boli mladé rastliny s vyvinutým prvým koreňom pozorované pomocou epifluorescenčného mikroskopu. Selekcia transgénnych rastlín prebiehala na základe červeného fluorescenčného signálu v jadrách buniek, ktorý pochádzal z jadrovo-lokalizovaného proteínu mCherry fúzovaného s *Cas9*. U rastlín, transformovaných multiplexnými CRISPR-KO vektormi s indukovateľným systémom expresie, bola najprv overená prítomnosť transgénu pomocou PCR. Pred selekciou boli rastliny obsahujúce transgén podrobené ošetrovaniu chemickým induktorom expresie, dexametazónom ($10/20 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

3.4.19 Genotypizácia transgéennej lucerny siatej pomocou PCR

Pre potvrdenie úspešnej stabilnej transformácie lucerny mutiplexnými CRISPR-KO vektormi s indukovateľným systémom expresie, bola pomocou PCR amplifikovaná

požadovaná sekvencia genómovej DNA transgénnych rastlín. Pre genotypizáciu bol použitý „Phire Plant Direct PCR Kit“. Najprv bol za sterilných podmienok odobraný mladý list z transgénej rastliny, ktorý bol ihneď prenesený do 20 μl dilučného pufru. Pomocou sterilnej špičky bol list rozdrvený v tlmivom roztoku a ponechaný 1 h na ľade. Následne boli vzorky centrifugované na stolnej centrifuge a supernatant bol prenesený do novej mikroskúmavky.

Pre PCR boli využité špecifické primery ohraničujúce gén rezistencie (*Hyg^R*), uvedené v Tab.4. Zloženie PCR reakcie je uvedené v Tab. 17. Reakcia prebiehala v termocykléri, pri cyklickom striedaní teplôt optimálnych pre jednotlivé kroky metódy (Tab. 18).

Tab. 17: Zloženie PCR reakčnej zmesi pre „Phire“ polymerázu.

Zložka reakčnej zmesi	Objem (μl)
dNTP ($10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$),	0,2
templátová DNA ($100 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	0,5
primer ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,2
primer ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,2
Phire Hot Start II DNA polymeráza	0,2
5x Phire Plant Tissue PCR pufoer	2
PCR H ₂ O	6,7
celkový objem	10

Tab. 18: Teplotný program termocykléru pre PCR s použitím „Phire“ polymerázy.

Krok	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas	Počet cyklov
počiatočná denaturácia	98	30 s	1x
denaturácia	98	30 s	
nasadenie primerov	64,9	30 s	35x
elongácia	72	45 s	
finálna elongácia	72	5 min	1x

3.4.20 Optimalizácia kultivačných podmienok pre indukciu expresie systému CRISPR-KO regulovaného chemicky-indukovateľným promótorom

Rastliny transformované multiplexnými CRISPR-KO vektormi s indukovateľným systémom expresie boli podrobené ošetrovaniu glukokortikoidom dexametazón. Pripravený bol 200 mmol·l⁻¹ roztok dexametazónu, z ktorého bol vždy odobraný potrebný objem pre samotnú indukciu. Vykonané boli ošetrenia s rôznou dĺžkou pôsobenia a tiež rôznou koncentráciou induktora, a preto boli rastliny rozdelené do troch kategórií. Do prvej kategórie patrili rastliny kultivované *in vitro* na tuhom MS médiu, ktoré boli ošetrené roztokom dexametazónu (20 µmol·l⁻¹) v tekutom MS médiu. Inkubácia prebiehala 24 h na trepačke pri 10 RPM. Na druhý deň boli rastliny premiestnené na čisté tuhé MS médium a pozorované pod epifluorescenčným mikroskopom o 7 a 14 dní. Do druhej kategórie patrili rastliny kultivované *in vitro* na tuhom MS médiu s prídavkom dexametazónu 10 µmol·l⁻¹. Korene rastlín boli pozorované pomocou epifluorescenčného mikroskopu po 24 h, 7 a 14 dňoch. Kultivácia týchto rastlín na médiu s dexametazónom trvala 1 - 30 dní. Treťou kategóriou boli rastliny, ktoré boli z *in vitro* podmienok prenesené do *ex vivo* podmienok. Po adaptácii na nové prostredie boli ich listy ošetrené 10 alebo 20 µmol·l⁻¹ roztokom dexametazónu vo vode pomocou štetca. Mikroskopické snímanie listov bolo vykonané pomocou CLSM o 24 h, 7 a 14 dní.

3.4.21 Izolácia mRNA

Na izoláciu mRNA boli z transgénnych rastlín odobrané približne 2-3 trojlístky (približne 300 mg), ktoré boli ihneď zmrazené v tekutom dusíku a homogenizované. Takto pripravený rastlinný materiál bol prenesený do čistých mikroskúmaviiek a v digestori bolo k nemu pridaných 800 µl TRI roztoku. Vzorky boli premiešané až do dôkladného rozpustenia a inkubované 5 min pri izbovej teplote. Následne boli vzorky centrifugované 10 min pri 4 °C a 12 000 RPM. Zo vzoriek bol potom odobraný supernatant, ku ktorému bolo pridaných 80 µl BCP. Vzorky boli opäť dôkladne premiešané a inkubované 10 min pri izbovej teplote. Nasledovala centrifugácia vzoriek 15 min pri 4 °C a 12 000 RPM. Potom bola odobraná vodná fáza, pričom k 70 % z jej objemu bol pridaný 100 % izopropanol (napr. k 250 µl vodnej fázy bolo pridaného 175 µl izopropanolu). Pomocou pipety boli vzorky premiešané a inkubované 5 min pri izbovej teplote. Vzorky boli potom centrifugované 8 min pri 4 °C a 12 000 RPM. Supernatant bol po centrifugácii odstránený a pelet bol rozsuspendovaný v 1 ml 75 % etanolu. Vzorky boli ponechané 1 h pri izbovej teplote. Po inkubácii boli vzorky centrifugované 5 min pri

7 500 RPM. Etanol bol následne odstránený a pelet RNA bol rozsuspendovaný v 30 μ l milliQ vody (bez RNAzy). Koncentrácia RNA bola zmeraná pomocou Nanodropu a vzorky boli nariadené na konečnú koncentráciu 200 ng/ μ l. Následne boli vzorky RNA prečistené od DNA, pričom zloženie reakcie spolu s podmienkami inkubácie v termocykléri sú uvedené v Tab. 19.

Z každej vzorky boli potom odobrané 4 μ l a pridaný k nim bol 1 μ l farbičky Midori Green. Tieto vzorky boli použité na analýzu integrity izolovanej RNA pomocou 1 % agarózovej elektroforézy.

Tab. 19: Zloženie reakcie na prečistenie izolovanej RNA od DNA.

Zložka reakcie	Objem (μ l)	Inkubácia
10x pufor s MgCl ₂ pre DNázu I	2	37 °C, 40 min.
DNáza I	2	
RNA	adekvátny objem pre 2 μ g	
milliQ voda	doplnená do 20 μ l	
50 mM EDTA	2	70 °C, 10 min.

3.4.22 Prepis RNA do komplementárnej DNA (cDNA)

RNA prečistená od DNA bola po overení integrity prepísaná do komplementárnej DNA (cDNA). V prvom kroku bola na polyadenylovaný koniec mRNA pridaná sekvencia tymínov (T). Zloženie reakcie spolu s podmienkami inkubácie sú zhrnuté v Tab. 20.

Po tejto reakcii boli vzorky prenesené na ľad. Nasledovala samotná syntéza cDNA. Zloženie reakcie a podmienky inkubácie sú uvedené v Tab. 21. Vzorky boli potom 4x zriedené v milliQ vode.

Tab. 20: Zloženie reakcie pre prídavok tymínov na polyA koniec mRNA.

Zložka reakcie	Objem (μl)	Inkubácia
oligodtprimer	0,5	
RNA	4,5	70 °C, 10 min.
milliQ voda	5	
celkový objem	10	

Tab. 21: Zloženie reakcie pre syntézu cDNA.

Zložka reakcie	Objem (μl)	Inkubácia
5x pufor M-MLV	4	
RNazin	0,4	
M-MLV reverzná transkriptáza	0,4	42 °C, 3 h; následne
dNTP (10 μmol·l ⁻¹)	1	70 °C, 10 min.
mRNA s pridanými T na polyA konci	10	
milliQ voda	4,2	
celkový objem	20	

3.4.23 PCR pre overenie navrhnutých primerov

Pre amplifikáciu vybraných exónov bolo navrhnutých niekoľko sád primerov a pre samotný experiment boli zvolené len niektoré z nich (Tab. 4), na základe výsledkov testovacej PCR s overenou cDNA. Pripravená cDNA bola tiež overená pomocou otestovaných primerov pre *UBQ10*. Zloženie reakcie pre overenie primerov je zhrnuté v Tab. 22 a teplotný program tejto reakcie je uvedený v Tab. 23.

Tab. 22: Zloženie reakcie pre semi-kvantitatívnu PCR.

Zložka reakcie	Objem (μl)
10x pufor Dream Taq	1,5
dNTP ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,3
primer forward ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,75
primer reverse ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	0,75
Dream Taq polymeráza	0,25
milliQ voda	8,45
cDNA	3
celkový objem	15

Tab. 23: Teplotný program PCR reakcie s polymerázou „DreamTaq“.

Krok	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas	Počet cyklov
počiatočná denaturácia	95	3 min	1x
denaturácia	95	30 s	
nasadenie primerov	58	30 s	40 x
elongácia	72	1 min	
finálna elongácia	72	15 min	1x

3.4.24 Kvantitatívna PCR v reálnom čase („real-time quantitative PCR“, RT-qPCR)

Po overení navrhnutých primerov prebehla najskôr testovacia RT-qPCR s vybranými primermi. Po overení efektivity vybraných primerov bol vykonaný samotný experiment, počas ktorého boli amplifikované úseky s dĺžkou cca 150 bp v rámci piateho exónu *MMK2* a šiesteho exónu *MMK3*. Ako referenčné gény slúžili gény kódujúce ubikvitín (*UBQ10*), glycerinaldehyd 3-fosfát dehydrogenázu (*GAPDH*) a aktín 2 (*ACT2*). Jednotlivé vzorky boli v triplikátoch nanosené na 96 jamkovú doštičku, ktorá bola na záver prelepená fóliou a umiestená do centrifugy na 1 min pri 1000 RPM. Doštička bola následne umiestnená do termocykléru Real-time qPCR QuantStudio™5. Pred experimentom bol vždy dopredu pripravený čerstvý roztok chemikálií (SYBR roztok) potrebný na 2 doštičky (zloženie je uvedené v Tab. 24). Zloženie RT-qPCR reakcie je uvedené v Tab. 25, teplotný a časový program je uvedený v Tab. 26.

Samotný experiment sa uskutočnil v troch opakovaníach. Ako referenčný gén slúžil *UBQ10* celkovo pre tri opakovania, pričom počas tretieho opakovania boli využité ako referenčné gény aj *GAPH* a *ACT2*. Získané dáta boli analyzované pomocou programov DataAssist a Excel.

Tab. 24: Zloženie SYBR roztoku pridávaného do reakcie pre RT-qPCR.

Zložka SYBR roztoku	Objem (μl)
2x ImmoMix™	1000,2
100x SYBR™ Green I	19,8
CellROX™ Deep Red Reagent (20 μmol·l ⁻¹)	40,2
PCR H ₂ O	139,8

Tab. 25: Zloženie reakcie pre RT-qPCR.

Zložka reakcie	Objem (μl)
SYBR roztok	6
primer forward (10 μmol·l ⁻¹)	0,5
primer reverse (10 μmol·l ⁻¹)	0,5
PCR H ₂ O	1
cDNA (20x zriedená)	2
celkový objem	10

Tab. 26: Teplotný a časový program RT-qPCR reakcie.

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
iniciácia reakcie	50	2 min.	
počiatočná denaturácia	95	10 min.	
denaturácia	95	15 s	40 x
nasadenie primerov	60	1 min.	
meranie teplotnej krivky	95	15 s	
meranie teplotnej krivky	60	1 min.	
disociácia	95	1 s	

3.4.25 Izolácia genómovej DNA a amplifikácia požadovaných úsekov

Na analýzu cieľových sekvencií DNA, do ktorých bol pomocou štyroch gRNA navádzaný systém CRISPR-KO, bola izolovaná genómová DNA (gDNA) z listov transgénnych rastlín. Odobraných bolo cca 300 mg listového pletiva, ktoré bolo ihneď zmrazené v tekutom dusíku. Následne bol rastlinný materiál homogenizovaný a samotná izolácia gDNA prebehla pomocou kitu NucleoSpin® Plant II a priloženého manuálu. Po izolácii bola zmeraná koncentrácia gDNA a vzorky boli uchovávané v mrazničke pri teplote -20 °C.

Na amplifikáciu požadovaných úsekov boli využité navrhnuté primery uvedené v Tab. 4. Pomocou PCR boli amplifikované prvé exóny génu *MMK3* vo vybraných transgénnych rastlinách a u kontrolnej rastliny (*RSY*). PCR produkty boli nanosené na 1 % agarózový gél a vizualizované pomocou UV transiluminátoru Gel Doc™ EZ Imager. Na základe zhodnej veľkosti fragmentov *in silico* predpokladanou veľkosťou v programe „Geneious Prime“, boli tieto fragmenty purifikované z gélu pomocou kitu „GeneJET Gel Extraction Kit“. Následne bola zmeraná koncentrácia purifikovanej DNA na Nano-Drope a s pomocou voľne dostupného manuálu boli pripravené vzorky neskôr odoslané na Sangerovo sekvenovanie. Zloženie reakčnej zmesi pri PCR amplifikácii je zhrnuté v Tab. 27 a teplotný a časový program termocykléru je uvedený v Tab. 28.

Tab. 27: Zloženie PCR reakčnej zmesi pre iProof HF polymerázu.

Zložka reakčnej zmesi	Objem (μl)
dNTP ($10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), templátová DNA ($100 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	0,5
primer ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	1,25
primer ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	1,25
iProof HF polymeráza	0,25
5x iProof HF pufor	5
PCR H ₂ O	16,3
celkový objem	25

Tab. 28: Teplotný a časový program termocykléru pre PCR s použitím iProof HF polymerázy.

Krok	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Čas	Počet cyklov
počiatočná denaturácia	98	30 s	1x
denaturácia	98	30 s	
nasadenie primerov	64	30 s	35x
elongácia	72	30 s	
finálna elongácia	72	5 min	1x

4 VÝSLEDKY

Táto diplomová práca nadväzuje na bakalársku prácu, počas ktorej boli pripravené destinačné CRISPR-KO vektory s miestom pre klonovanie kaziet obsahujúcich gRNA pre mutagenézu *MMK2*. Výsledky predkloženej diplomovej práce sú rozdelené do šiestich častí.

Experimentálna časť tejto práce začala návrhom gRNA pre mutagenézu génu *MMK3*, ktorá je spolu s postupom prípravy molekúl gRNA a ich následným klonovaním do vstupných vektorov popísaná v prvej časti výsledkov. V ďalšej časti je rozoberaná konštrukcia finálnych multiplexných CRISPR-KO vektorov pre mutagenézu *MMK2* a *MMK3* a tiež overenie ich funkčnosti. Tretia časť výsledkov je venovaná priebehu regenerácie lucernej sietej po stabilnej transformácii pripravenými vektormi. V štvrtej časti sú výsledky optimalizácie ošetrovania induktorom expresie v transgénnych rastlinách obsahujúcich inducibilný systém pre reguláciu expresie *Cas9* a v nasledujúcej časti sú výsledky selekcie úspešne transformovaných rastlín. Analýza transgénnych rastlín je popísaná v poslednej časti.

4.1 Príprava gRNA pre mutagenézu génu *MMK3*

4.1.1 Návrh gRNA

Vhodné gRNA boli vybrané na základe hodnoty „on-skóre“. Tú považujeme za vyjadrenie zhody sekvencie gRNA s cieľovou sekvenciou DNA a platí, že čím je „on-skóre“ bližšie k 1, tým je gRNA vhodnejšia. Preto boli vybrané gRNA, ktorých „on skóre sa približovalo“ k hodnote 1. Nakoľko sa v tetraploidnej lucerne *MMK3* gén vyskytuje v štyroch kópiách, 3 sekvencie gRNA mali vždy skóre zhodujúce sa s vybranou sekvenciou (Príloha 1 – 4).

Vygenerované sekvencie sa líšili v počte a taktiež vo vzdialenosti možnej nezhody nukleotidu („mismatch“) medzi cieľovou sekvenciou a gRNA. Čím bližšie boli odhadované nezhody nukleotidov k PAM sekvencii, tým menej bola gRNA vhodná. Pre správny proces tvorby zlomov DNA je rozhodujúca práve zhoda nukleotidov v blízkosti PAM sekvencie, pretože v tejto oblasti dochádza k štiepeniu nukleázou *Cas9*. Ďalej bolo potrebné prihliadať na počet miest mimo cieľovej sekvencie („off-target“), keďže pre efektívnu mutagenézu je potrebné čo najviac eliminovať pravdepodobnosť zacielenia gRNA do miest, kde je editácia nežiadúca. Preto boli vybrané gRNA s čo najnižším počtom predpokladaných „off-targetov“. Ďalšou podmienkou bol podiel G/C párov v sekvencii gRNA, ktorý by mal byť pri efektívnej mutagenéze približne 40 – 60 %.

Sekvence vybraných gRNA obsahovali približne 50 % G/C párov. Pri výbere gRNA bolo potrebné tiež analyzovať prítomnosť BpI a BsaI restričných miest v rámci ich interných sekvencií, aby bolo možné predísť ich štiepeniu počas klonovania.

Nástroj „CRISPR-P“ poskytuje informácie aj o oblastiach „off-targetov“ (nežiadúcich editácií) v analyzovanom genóme. Po zadaní potrebných parametrov pre generovanie možných gRNA (druh organizmu, typ PAM sekvencie, požadovaná dĺžka gRNA, označenie cieľového génu), online nástroj zobrazil všetky potencionálne gRNA zacielené na gén *MMK2*.

Spomedzi všetkých vygenerovaných gRNA boli následne vybrané štyri gRNA, z ktorých dve boli zacielené na exón 1 (gRNA 3 a gRNA 14). Vzdialenosť medzi týmito sekvenciami bola 93 nukleotidov, čo je podľa Oh et al. (2020) optimálne, keďže môže dôjsť k vyštiepeniu celého úseku génu. Ďalšia gRNA (gRNA 33) bola zacielená na exón 2 a štvrtá gRNA (gRNA 19) bola zacielená na exón 4. Pre exón 3 nebola zvolená žiadna gRNA, pretože vlastnosti žiadnej z vygenerovaných gRNA nevyhovovali požiadavkám. Tak isto pre exóny 5 a 6 neboli vybrané žiadne gRNA, pretože na efektívnu mutagenézu sa odporúča gRNA zacieliť najmä na prvé exóny (Gerashchenkov et al., 2020). Zvolené gRNA mali dĺžku 20 nukleotidov a spolu s ich vlastnosťami sú zhrnuté v Tab.29. Pri navrhovaní primerov pre klonovanie (Tab. 6), bol na 5' koniec každej gRNA pridaný guanín, ktorý je nevyhnutný pre iniciáciu transkripcie prostredníctvom promotóru *U6* (Ranganathan et al., 2014). Schéma pozície navrhnutých gRNA je na Obr. 5.

Tab. 29: Zoznam navrhnutých gRNA pre mutagenézu génu *MMK3* u lucerny. Číslo jednotlivých gRNA sa zhodujú s číslami vygenerovaných pomocou „CRISPR-P 2.0“.

Názov	Sekvencia	Cieľ	On-skóre	Off targety	Podiel G/C (%)
gRNA 1	ATTCCTCCTCTTCAACCCGTCGG	exón 1	0,8253	61	50
gRNA 216	GAGTTTGCTTTCTCAGATTCAGG	exón 1	0,0241	176	40
gRNA 63	ACGAACTCAGATACGAATGAAGG	exón 2	0,2850	74	40
gRNA 50	TGTCATGAAGTCTGTCTCAGAGG	exón 4	0,3317	112	45

Podčiarknuté nukleotidy označujú PAM („protospacer-adjacent motif“, protospaceru priľahlý motív).



Obr. 5: Schématické zobrazenie pozície navrhnutých gRNA pre vyradenie génu *MMK3*.

4.1.2 Klonovanie molekúl gRNA pre mutagenézu génu *MMK3*

Prostredníctvom oligo klonovania boli vytvorené dvojvláknové oligonukleotidy obsahujúce gRNA so štvor-nukleotidovými presahmi na ich 5' koncoch (Obr. 6), kompatibilné s presahmi v príslušných akceptorových vektoroch. Súčasťou týchto vektorov je *U6-26* promótor III pre expresiu gRNA a kostrová sekvencia nevyhnutná pre väzbu s Cas9. Rovnakým spôsobom boli pripravené molekuly gRNA pre mutagenézu génu *MMK2* počas predchádzajúcej bakalárskej práce.

Oligonukleotidy obsahujúce gRNA pre mutagenézu génu *MMK2* a rovnako oligonukleotidy obsahujúce gRNA pre mutagenézu génu *MMK3* boli následne prostredníctvom „Golden Gate“ klonovania inkorporované do akceptorových vektorov (Tab. 2). Správnosť klonovania týchto vektorov, nesúcich gRNA, bola overená restriktčným štiepením a následne sekvenačnou analýzou so špecifickým primerom (Tab. 5).

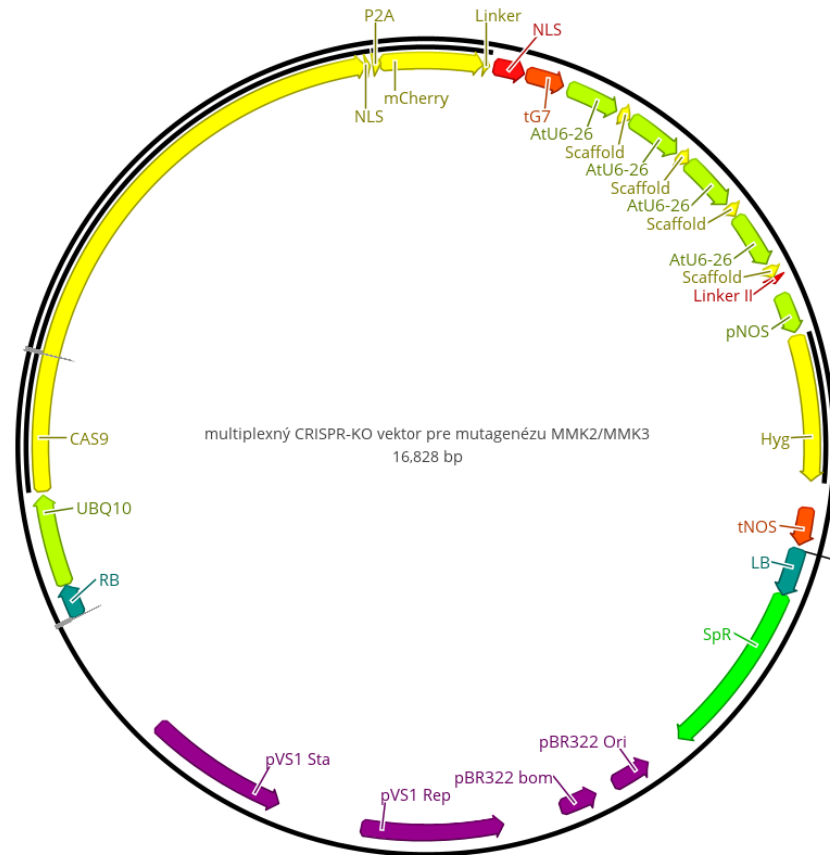


Obr. 6: Výsledky klonovania zobrazujúce vzájomne nasadené oligonukleotidy pozostávajúce z gRNA a komplementárneho oligonukleotidu so štvor-nukleotidovými presahmi na 5' koncoch, ktoré boli kompatibilné s presahmi v akceptorových vektoroch určených na klonovanie gRNA (Tab. 6). Dodatočne pridaný guanín je podčiarknutý, sekvencie hrubým písmom označujú gRNA bez PAM.

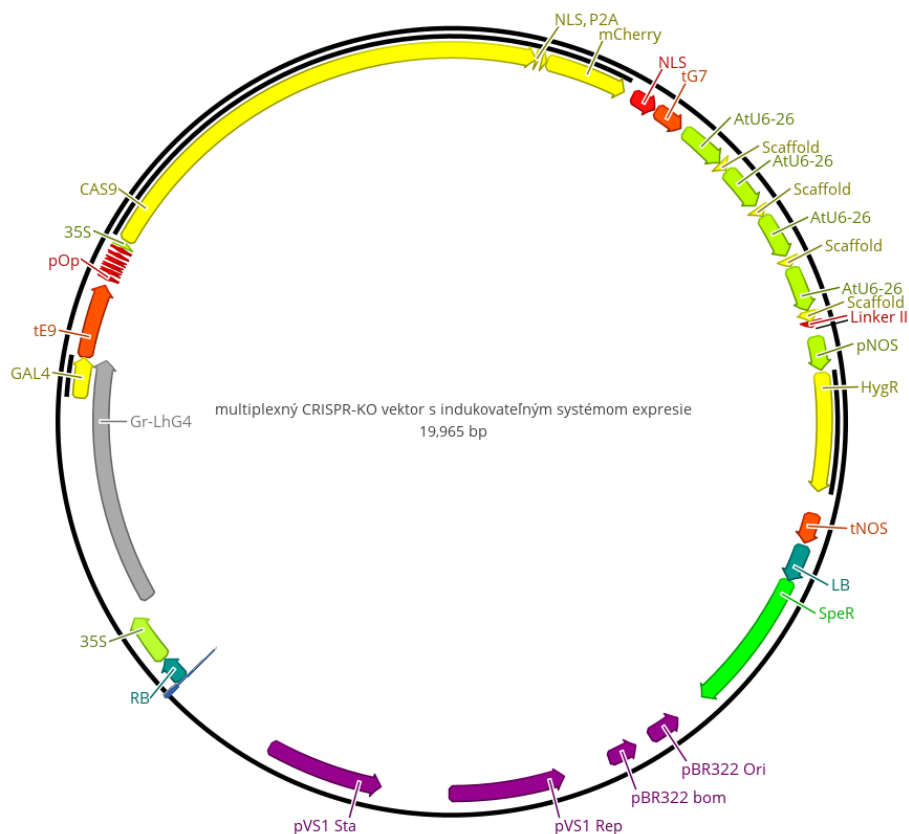
4.2 Finalizácia multiplexných CRISPR-KO vektorov pre mutagenézu génov *MMK2* a *MMK3*

Pred samotným klonovaním finálnych multiplexných CRISPR-KO vektorov boli *in silico* skonštruované multiplexné CRISPR-KO vektory, kompatibilné so štyrmi gRNA, zacielenými zvlášť na gény *MMK2* a *MMK3*. Tieto vektory obsahujú dva odlišné typy promótoru pre expresiu *Cas9*, a preto rozlišujeme dve verzie. Prvá verzia multiplexných CRISPR-KO vektorov (Obr. 7) obsahuje konštitutívny promótor *UBQ10*, ktorý by mal zabezpečiť expresiu *Cas9* vo všetkých pletivách rastliny. Druhá verzia vektorov (Obr. 8) zahrňuje inducibilný promótor pozostávajúci z konštruktu *35S::GR-LhG4:tRbcS* so syntetickým operátorom *pOp6* a minimálnym *35S* promótorom. Funkcia tohto chemicky-inducibilného systému *GR-LhG4/pOp* závisí od prítomnosti glukokortikoidu dexametazón.

Overené akceptorové vektory s gRNA boli vložené prostredníctvom Green Gate klonovania spolu s linkerom do pripravených destinačných CRISPR-KO vektorov. Vytvorené boli tak celkovo štyri vektory, z ktorých dva obsahovali štyri gRNA pre nasmerovanie *Cas9* nukleázy na gén *MMK2* a ďalšie dva niesli gRNA navádzajúce nukleázu *Cas9* na gén *MMK3*.



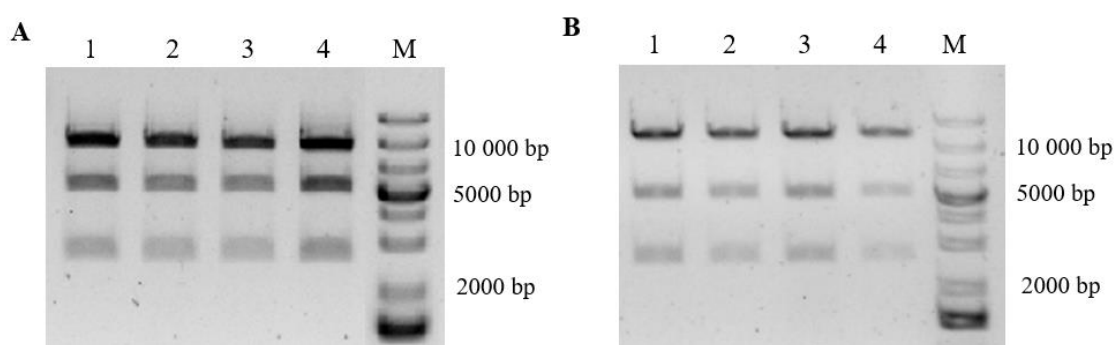
Obr. 7: Finálny multiplexný CRISPR-KO vektor s expresiou *Cas9* a génom *mCherry* kódujúcim červený fluorescenčný proteín pod kontrolou konštitutívneho promótoru *UBQ10*. Za terminátorom *tG7* nasleduje oblasť obsahujúca jednotlivé gRNA spolu s kostrovou sekvenciou („scaffold“) pod kontrolou *AtU6* promótoru. Linker II spája poslednú kazetu obsahujúcu gRNA s destinačným vektorom, nesúcim gén rezistencie na hygromycín (*Hyg^R*) pre selekciu transformovaných rastlín. *G7* – sekvencia polyadenylačného signálu z génu 7 v *A. tumefaciens*; LB – ľavá hranica T-DNA; NLS – „nuclear localization sequence“, jadrový lokalizačný signál; *NOS* – gén kódujúci nopalín syntázu; p – promótor; P2A – ribozóm preskakujúci peptid prasačieho teschovírusu; *pBR322 bom* („basis of mobility“) – sekvencia umožňujúca prenos plazmidu počas bakteriálnej konjugácie; *pBR322 Ori* („origin“) – replikačný počiatok *E. coli*; *pVS1 Rep* – replikačný počiatok *A. tumefaciens*; *pVS1 Sta* – proteín stability pre stabilnú segregáciu plazmidov v *A. tumefaciens*; RB – pravá hranica T-DNA; *Spe^R* – rezistencia na spektinomycín; t – terminátor.



Obr. 8: Finálny multiplexný CRISPR-KO vektor s expresiou *Cas9* a génom *mCherry* kódujúcim červený fluorescenčný proteín pod kontrolou inducibilného systému *35S::GR-LhG4:tRbcS* so syntetickým operátorom *pOp6*. Za terminátorom *tG7* nasleduje oblasť obsahujúca jednotlivé gRNA spolu s kostrovou sekvenciou (scaffold) pod kontrolou *AtU6* promótoru. Linker II spája poslednú kazetu obsahujúcu gRNA s destinačným vektorom, nesúcim gén rezistencie na hygromycín (*Hyg^R*) pre selekciu transformovaných rastlín. *GAL4* – transkripčná aktivačná doména zo *S. cerevisiae*; *GR-LhG4* – časť inducibilného systému pozostávajúca z glukokortikoidového receptora (GR) a transkripčného aktivátora (LhG4); *pOp* – operátor; *G7* – sekvencia polyadenylačného signálu z génu 7 v *A. tumefaciens*; LB – ľavá hranica T-DNA; NLS – „nuclear localization sequence“, jadrový lokalizačný signál; *NOS* – gén kódujúci nopalín syntázu; p – promótor; P2A – ribozóm preskakujúci peptid prasačieho teschovírusu; *pBR322* bom („basis of mobility“) – sekvencia umožňujúca prenos plazmidu počas bakteriálnej konjugácie; *pBR322* Ori („origin“) – replikačný počiatok *E. coli*; *pVS1* Rep – replikačný počiatok *A. tumefaciens*; *pVS1* Sta – proteín stability pre stabilnú segregáciu plazmidov v *A. tumefaciens*; RB – pravá hranica T-DNA; *Spe^R* – rezistencia na spektinomycín; t – terminátor.

4.2.1 Overenie správnosti prípravy multiplexných CRISPR-KO vektorov prostredníctvom restriktčného štiepenia

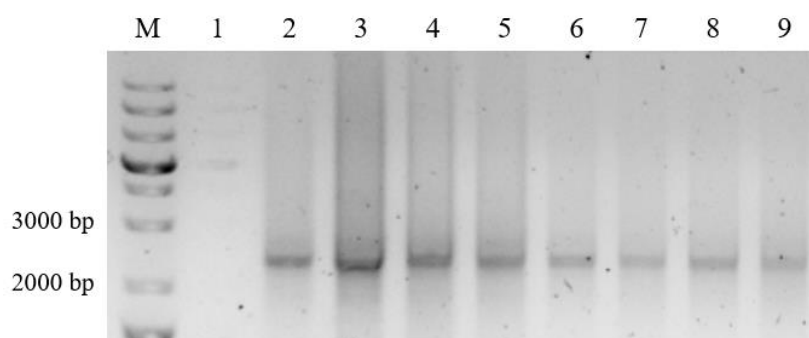
Po transformácii buniek *E. coli* pripravenými multiplexnými CRISPR-KO vektormi pre mutagenézu génov *MMK2* a *MMK3* a izolácií pDNA z transformovaných bakteriálnych kolónií bola pomocou restriktčného štiepenia pDNA overená správnosť ich klonovania. Na túto reakciu bol zvolený restriktčný enzým *NheI*, pričom predpokladaná dĺžka fragmentov bola v prípade vektorov s konštitutívnym promótorom (*UBQ10*) 9121 bp, 5102 bp a 2605 bp (Obr. 9A) a v prípade vektorov s inducibilným promótorom (*35S::GR-LhG4:tRbcS - pOp6*) 12 258 bp, 5102 bp a 2605 bp (Obr. 9B).



Obr. 9: Elektroforetogram reprezentujúci výsledok overenia úspešnosti „Green Gate“ klonovania finálnych multiplexných CRISPR-KO vektorov. Restriktčné štiepenie bolo vykonané pomocou enzýmu *NheI*. (A) Restriktčné štiepenie multiplexných CRISPR-KO vektorov s konštitutívnym promótorom (*UBQ10*) s výslednými dĺžkami fragmentov: 9121 bp, 5102 bp a 2605 bp. 1 a 2: vektor pre mutagenézu génu *MMK2*, 3 a 4: vektor pre mutagenézu génu *MMK3*. (B) Restriktčné štiepenie multiplexných CRISPR-KO vektorov s inducibilným promótorom (*35S::GR-LhG4:tRbcS-pOp6*) s výslednými dĺžkami fragmentov: 12 258 bp, 5102 bp a 2605 bp. 1 a 2: vektor pre mutagenézu génu *MMK2*, 3 a 4: vektor pre mutagenézu génu *MMK3*. M – DNA marker

4.3 Potvrdenie úspešnej transformácie multiplexných CRISPR-KO vektorov do *A. tumefaciens* prostredníctvom „colony PCR“

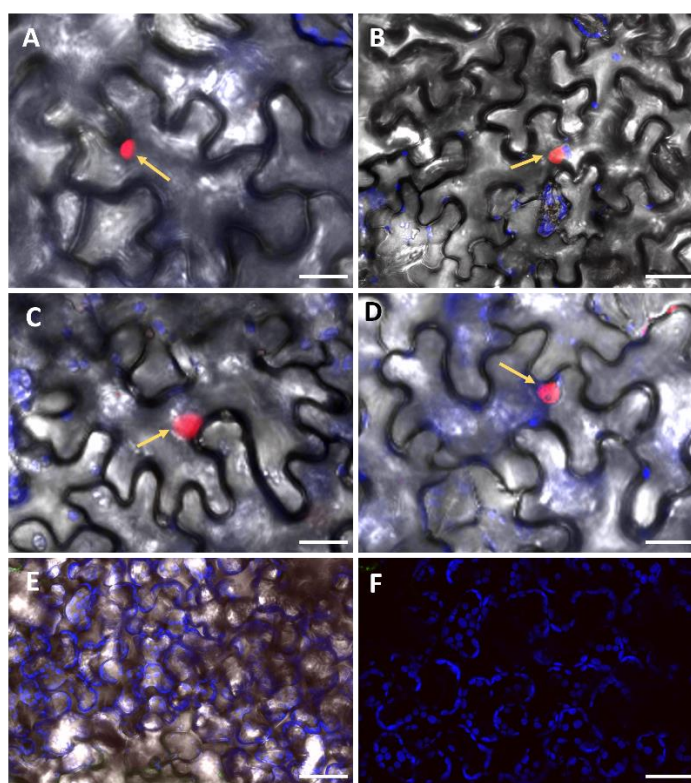
Vektory overené restriktčným štiepením boli transformované do buniek *A. tumefaciens*. Začlenenie pripravených vektorov pre mutagenézu génov *MMK2* a *MMK3* do bakteriálnych kolónií bolo overené pomocou „colony PCR“. Boli pri tom využité primery ohraničujúce úseky vektorov s kazetami nesúcimi gRNA (Tab. 4). Predpokladaná dĺžka PCR amplikónov (Obr. 10) bola 2388 bp.



Obr. 10: Elektroforetogram zobrazujúci výsledok „colony PCR“ analýzy. Predpokladaná dĺžka DNA fragmentu 2388 bp. 1: negatívna kontrola (bez bakteriálnej kolónie); 2 a 3: DNA fragment multiplexného CRISPR-KO vektora s konštitutívnym promótorom (*UBQ10*), Cas9 zacielená na *MMK2*; 4 a 5: DNA fragment multiplexného CRISPR-KO vektora s indukibilným promótorom (*35S::GR-LhG4:tRbcS - pOp6*), Cas9 zacielená na gén *MMK2*; 6 a 7: DNA fragment multiplexného CRISPR-KO vektora s konštitutívnym promótorom (*UBQ10*), Cas9 zacielená na gén *MMK3*; 8 a 9: DNA fragment multiplexného CRISPR-KO vektora s indukibilným promótorom (*35S::GR-LhG4:tRbcS-pOp6*), Cas9 zacielená na gén *MMK3*. M – DNA marker.

4.4 Overenie funkčnosti multiplexných CRISPR-KO vektorov

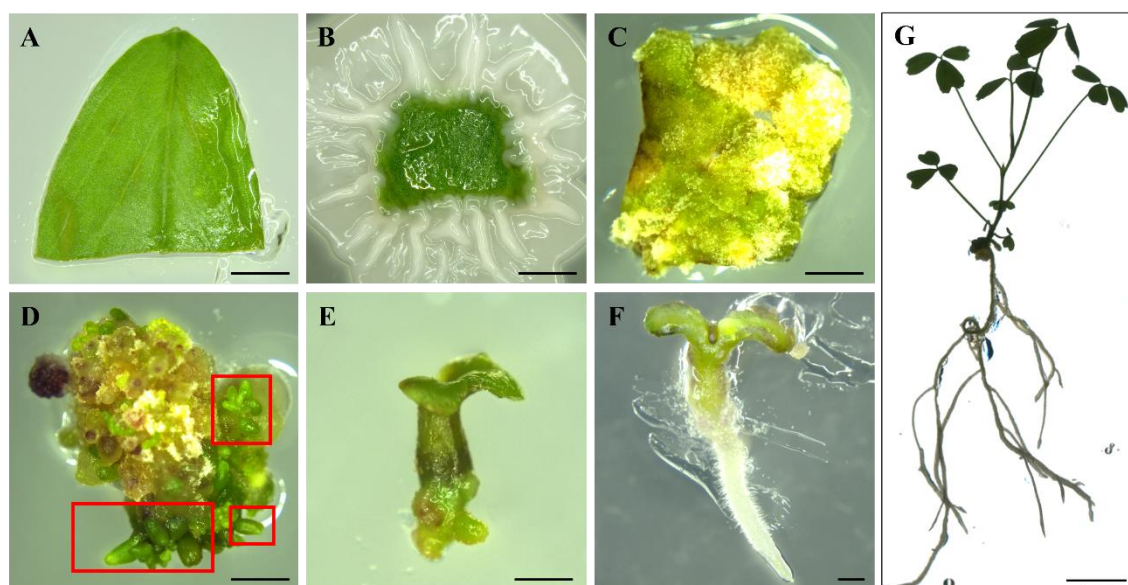
Po „colony PCR“ bola prostredníctvom tranzientnej transformácie listov *N. benthamiana* overená funkčnosť pripravených multiplexných CRISPR-KO vektorov. Listy *N. benthamiana* (Obr. 11) boli pozorované po 3 dňoch od infiltrácie bakteriálnej suspenzie *A. tumefaciens* obsahujúcej multiplexné CRISPR-KO vektory s konštitutívnou nadexpresiou *Cas9* (Obr. 11 A,B), pričom v prípade infiltrácie vektorov s indukibilným systémom pre reguláciu expresie *Cas9* (Obr. 11 C,D), boli listy pred pozorovaním pomocou CLSM ošetrené induktorom expresie, dexametazónom ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Červený fluorescenčný signál jadrovo-lokalizovaného proteínu mCherry fúzovaného s *Cas9* bol v tomto prípade pozorovaný už 2 h po aplikácii dexametazónu.



Obr. 11: Listy *N. benthamiana* pozorované 3 dni po tranzientnej transformácii suspenziou *A. tumefaciens* nesúcou multiplexné CRISPR-KO vektory. (A) Bunka abaxiálnej strany listu *N. benthamiana* obsahujúceho CRISPR-KO vektor pre mutagenézu génu *MMK2* s konštitutívnou nadexpresiou *Cas9*. (B) Bunka abaxiálnej strany listu *N. benthamiana* so začleneným CRISPR-KO vektorom pre mutagenézu génu *MMK2* s indukibilným promótorom (*35S::GR-LhG4:tRbcS-pOp6*) pre reguláciu expresie *Cas9*, indukovaná roztokom dexametazónu ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) v tekutom MS médiu. (C) Bunka abaxiálnej strany listu *N. benthamiana* obsahujúceho CRISPR-KO vektor pre mutagenézu génu *MMK3* s konštitutívnou nadexpresiou *Cas9*. (D) Bunka abaxiálnej strany listu *N. benthamiana* po transformácii suspenziou *A. tumefaciens*, nesúcou CRISPR-KO vektor pre mutagenézu génu *MMK3* s indukibilným promótorom (*35S::GR-LhG4:tRbcS-pOp6*) pre reguláciu expresie *Cas9*, indukovaná roztokom dexametazónu ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) v tekutom MS médiu. (E,F) „Mock“ kontrola s rozpúšťadlom ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DMSO). Žlté šípky smerujú na jadro bunky. A-E: pozorované pomocou CLSM v kanáloch pre mCherry, chlorofyl a a prechádzajúce svetlo. F: pozorované len v kanáli pre mCherry a chlorofyl a; objektív Plan-Apochromat 20x/0.8 M27. Mierka: $20 \mu\text{m}$ (A-D); $50 \mu\text{m}$ (E,F) .

4.5 Regenerácia lucerny siatej po stabilnej transformácii multiplexnými CRISPR-KO vektormi

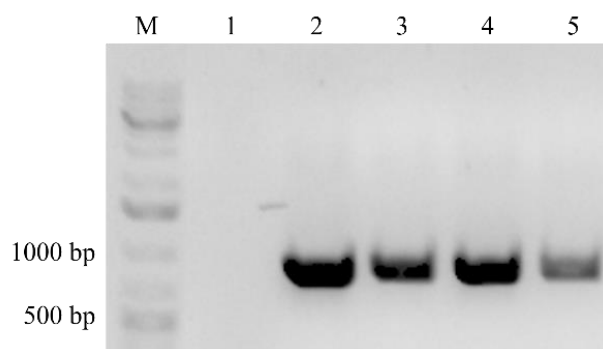
Po overení fluorescence multiplexných CRISPR-KO vektorov pre mutagenézu génov *MMK2* a *MMK3* pomocou tranzientnej transformácie listov *N. benthamiana*, boli tieto vektory inkorporované prostredníctvom baktérií *A. tumefaciens* do listových explantátov lucerny siatej (RSY). Jednotlivé štádiá regenerácie lucerny siatej zo somatických embryí pochádzajúcich z kalusu indukovaného na listových explantátoch sú znázornené na Obr. 12.



Obr. 12: Regenerácia lucerny siatej procesom somatickej embryogenézy. (A) Transformovaná časť odrezaného listu lucerny siatej (RSY) umiestnená na B5H médiu ihneď po inkubácii so suspenziou *A. tumefaciens*. (B) Listový explantát lucerny siatej obrastený kolóniami *A. tumefaciens* 6 dní po transformácii. (C) Kalus vytvorený z listového explantátu, kultivovaný na B5H médiu bez antibiotík, tri týždne po transformácii. (D) Kalus s vyvinutými somatickými embryami, kultivovaný na B50 médiu, osem týždňov po transformácii. (E) Somatické embryo v kotyledonárnom štádiu, kultivované na B50 médiu, 9 týždňov po transformácii. (F) Mladá rastlina s vyvinutým primárnym koreňom, kultivovaná na MMS médiu, 10 týždňov po transformácii. (G) Rastlina s vyvinutým koreňovým systémom a nadzemnou časťou, kultivovaná na MS médiu, 15 týždňov po transformácii. Červený rámik označuje somatické embryá. Obrázky A-F boli zhotovené pomocou ZOOM mikroskopu; objektív PlanNeoFluar Z 1.0x. Obrázok G bol zhotovený pomocou skeneru. Mierka: 2 mm (A-D), 1 mm (E,F), 1 cm (G).

4.5.1 Potvrdenie prítomnosti transgénneho konštrukt u lucerny pomocou PCR

Rastliny transformované multiplexnými CRISPR-KO vektormi s inducibilným systémom expície *Cas9* boli podrobené PCR analýze pre potvrdenie prítomnosti transgénneho konštrukt v genómovej DNA lucerny. Pre túto selekciu boli využité primery špecificky ohraničujúce *Hyg^R* (Tab. 4). Predpokladaná dĺžka amplifikovaného DNA fragmentu bola 843 bp (Obr.13).



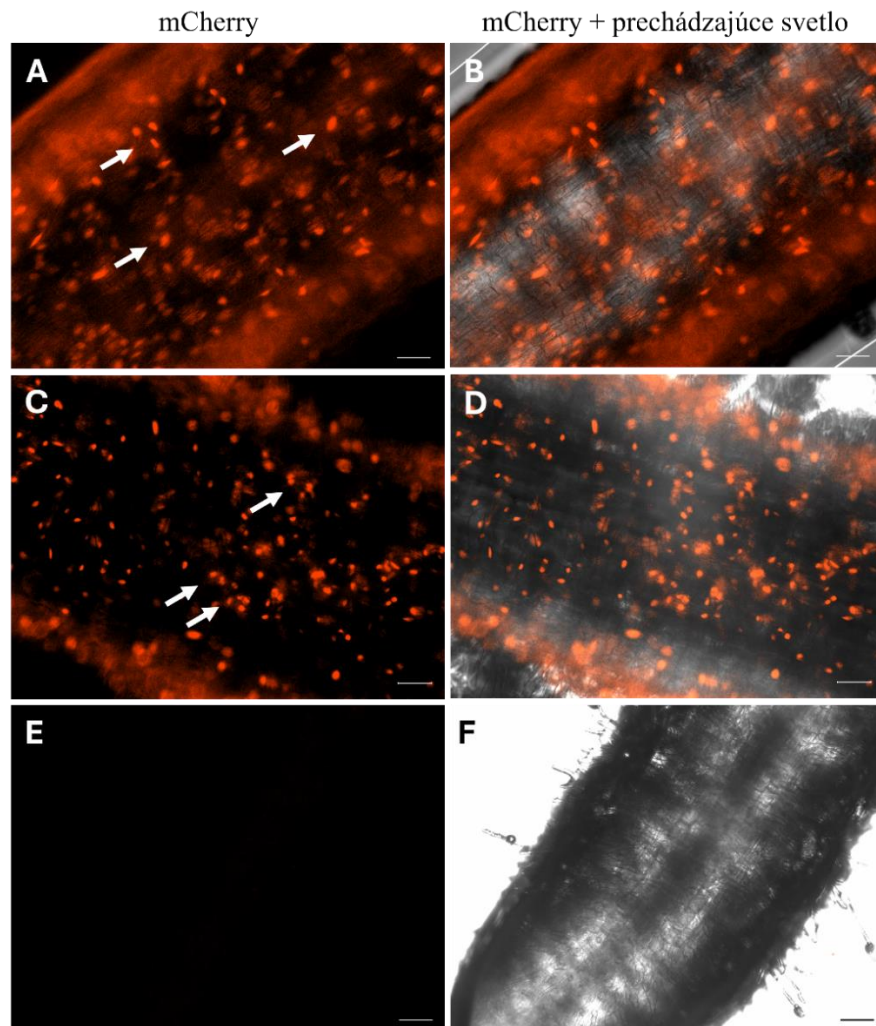
Obr. 13: Elektroforetogram zobrazujúci výsledok PCR selekcie rastlín transformovaných multiplexnými vektormi s inducibilným promótorom pre reguláciu expície *Cas9*. Očakávaná dĺžka fragmentov: 843 bp. 1: RSY; 2 a 3: transgénna rastlina s inkorporovaným CRISPR-KO vektorom obsahujúcim inducibilný promótor pre reguláciu expície *Cas9* zacielenej na gén *MMK2*. 4 a 5: transgénna rastlina s inkorporovaným CRISPR-KO vektorom obsahujúcim inducibilný promótor pre reguláciu expície *Cas9* zacielenj na gén *MMK3*. M – DNA marker.

4.6 Indukcia expresie chemicky-indukovateľného CRISPR-KO konštruktú v transgénej lucerne

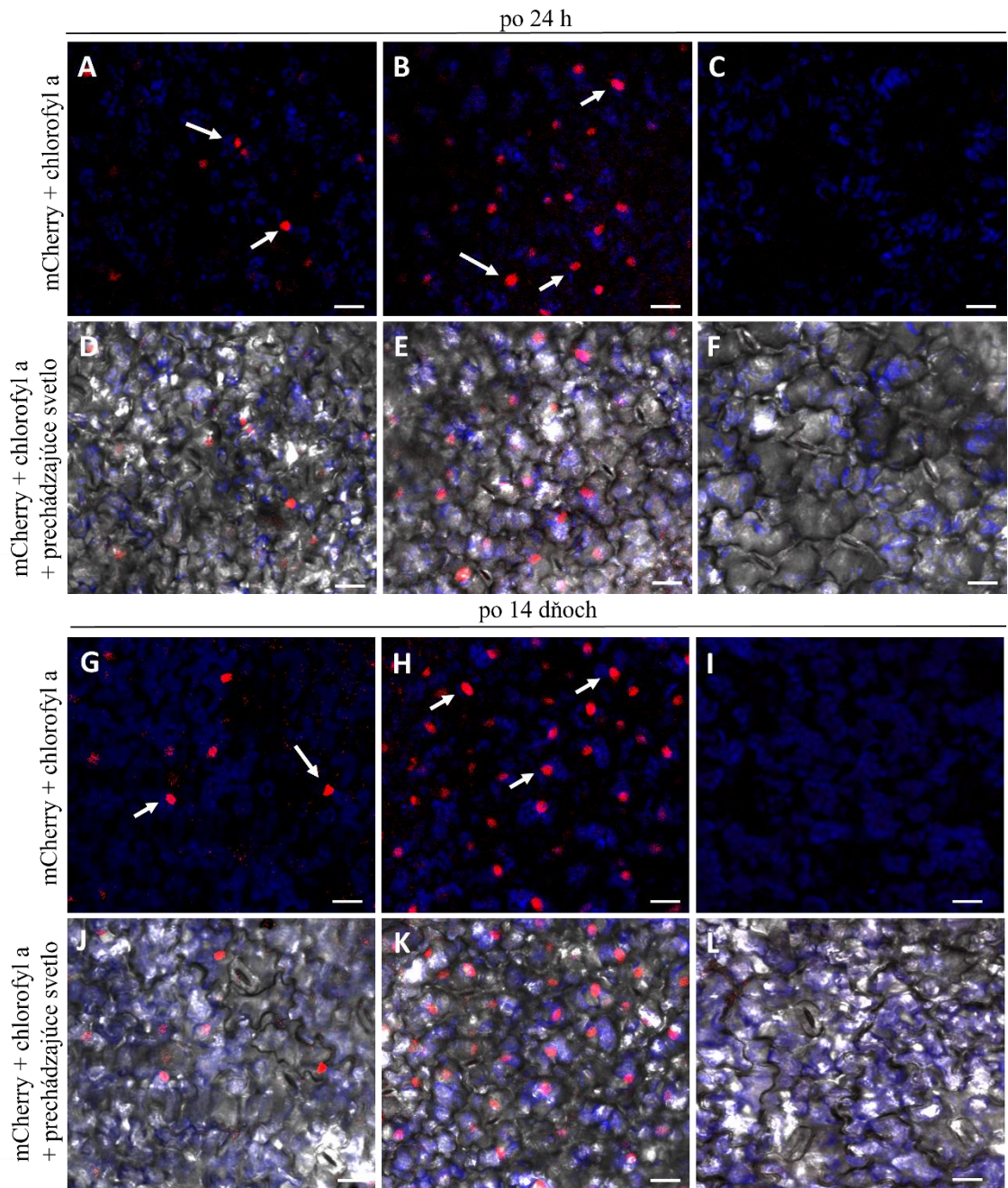
Rastliny obsahujúce transgénny konštrukt boli rozdelené do dvoch kategórií a na základe toho ošetrené dexametazónom. Pre indukciu expresie multiplexných CRISPR-KO vektorov v rastlinách v *in vitro* podmienkach, boli najprv rastliny prvej kategórie ošetrené tekutým MS médiom s prídavkom dexametazónu ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Pre šetrnejší spôsob indukcie, boli rastliny z druhej kategórie umiestnené na tuhé MS médium v Petriho miske s prídavkom dexametazónu v koncentrácii $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Vybrané rastliny boli na tomto médiu kultivované 1 - 30 dní, avšak už po viac ako piatich dňoch od indukcie začali rastliny prejavovať symptómy nekrózy.

Korene rastlín boli po aplikácii dexametazónu pozorované pomocou epifluorescenčného mikroskopu, pričom výrazný červený fluorescenčný signál jadrovlokalizovaného proteínu mCherry bol zaznamenaný v mnohých bunkách ešte po štrnástich dňoch od indukcie pomocou $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dexametazónu (Obr. 14). Na základe toho boli stanovené optimálne podmienky pre indukciu expresie multiplexných CRISPR-KO vektorov v transgénnych rastlinách lucerny, ktorými sú prídavok $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dexametazónu pridaného do tuhého kultivačného MS média a doba indukcie maximálne tri dni.

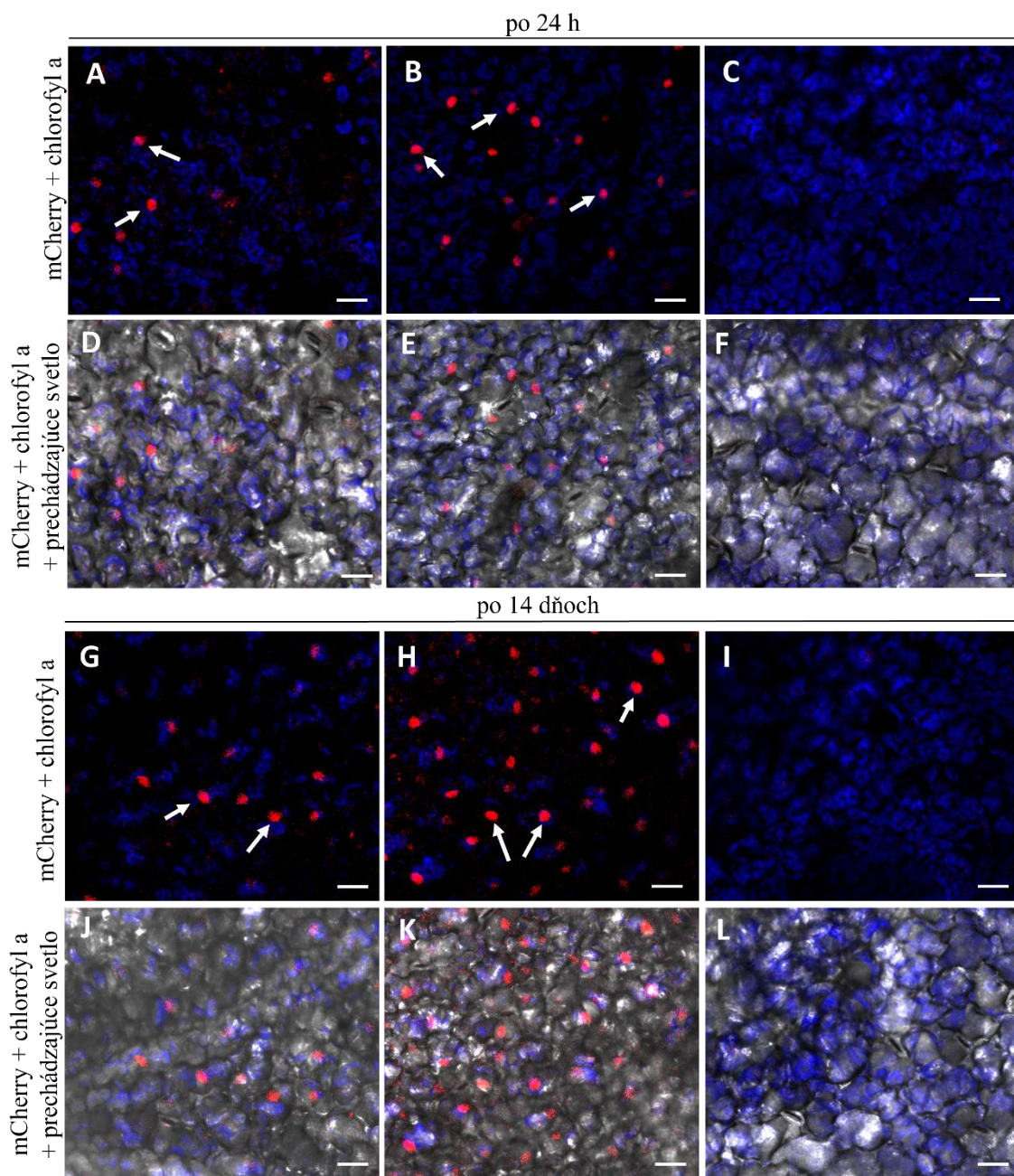
Ďalšie transgénne rastliny prenesené do *ex vivo* podmienok boli využité na stanovenie optimálnych podmienok pre indukciu expresie CRISPR-KO vektorov v listoch transgénej lucerny. Keďže pre indukciu expresie CRISPR-KO vektorov v koreňoch boli dve koncentrácie dexametazónu (10 alebo $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) dostatočné, boli následne listy transgénnych rastlín ošetrené vodnými roztokmi dexametazónu v rovnakých koncentráciách. Listy boli po ošetrení dexametazónom pozorované pomocou CLSM (Obr. 15 a 16). Na základe výrazného červeného fluorescenčného signálu proteínu mCherry v jadrách buniek aj po 14 dňoch od aplikácie $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku dexametazónu vo vode, bola táto koncentrácia induktora stanovená ako optimálna pre chemickú indukciu expresie multiplexných CRISPR-KO vektorov v listoch transgénej lucerny siatej.



Obr. 14: Červený fluorescenčný signál fúzneho proteínu mCherry-Cas9 v jadrách koreňových buniek lucerny po 24 hodinovej kultivácii rastlín na tuhom MS médiu s prídavkom dexametazónu ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), pozorovaný po 14 dňoch od aplikácie induktora. **(A,B)** Koreň transgénnej rastliny obsahujúcej CRISPR-KO vektor zacielený na gén *MMK2*. **(C,D)** Koreň transgénnej rastliny obsahujúcej CRISPR-KO vektor zacielený na gén *MMK3*. **(E,F)** „Mock“ kontrola z rozpúšťadlom (DMSO; $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Biele šípky označujú jadrá buniek. Korene boli pozorované pomocou epifluorescenčného mikroskopu v dvoch kanáloch pre mCherry a prechádzajúce svetlo; objektív EC Plan-Neofluar 10x/0.30 M27. Mierka: $100 \mu\text{m}$ (A-F).



Obr. 15: Červený fluorescenčný signál chimérneho proteínu mCherry-Cas9 v jadrách buniek transgénnych listov lucerny po ošetrení dexametazónom; vektor zacielený na gén *MMK2*. **(A,D)** List po ošetrení roztokom dexametazónu ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) vo vode, pozorovaný po 24 h. **(B,E)** List transgénnej rastliny lucerny po ošetrení roztokom dexametazónu ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) vo vode, pozorovaný po 24 h. **(C,F)** „Mock“ kontrola s rozpúšťadlom DMSO: list transgénnej rastliny lucerny po ošetrení roztokom DMSO ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) vo vode, pozorovaný po 24 h. **(G,J)** List transgénnej rastliny lucerny po ošetrení roztokom dexametazónu ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) vo vode, pozorovaný po 14 dňoch. **(H,K)** List transgénnej rastliny lucerny po ošetrení roztokom dexametazónu ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) vo vode, pozorovaný po 14 dňoch. **(I,L)** „Mock“ kontrola s rozpúšťadlom DMSO: list transgénnej rastliny lucerny po ošetrení roztokom DMSO ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) vo vode, pozorovaný po 14 dňoch. Listy boli pozorované pomocou CLSM v troch kanáloch pre mCherry, chlorofyl a prechádzajúce svetlo; objektív EC Plan-Neofluar 10x/0.30 M27. Mierka: $50 \mu\text{m}$ (A-L).



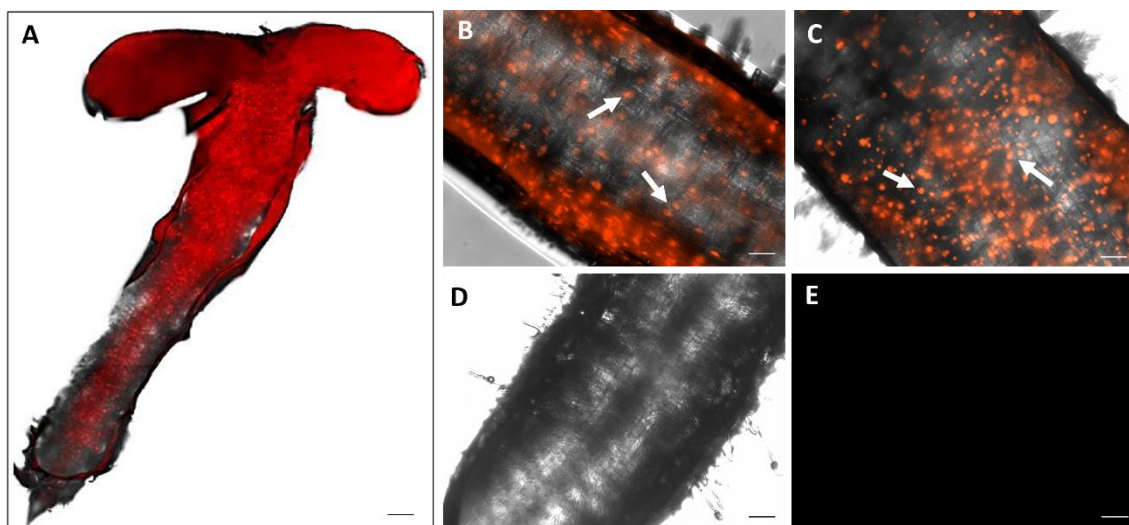
Obr. 16: Červený fluorescenčný signál chimérneho proteínu mCherry-Cas9 v jadrách buniek transgénnych listov lucerny po ošetrení dexametazónom; vektor zacielený na gén *MMK3*. **(A,D)** List po ošetrení roztokom dexametazónu ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) vo vode, pozorovaný po 24 h. **(B,E)** List transgénnej rastliny lucerny po ošetrení roztokom dexametazónu ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) vo vode, pozorovaný po 24 h. **(C,F)** „Mock“ kontrola s rozpúšťadlom DMSO: list transgénnej rastliny lucerny po ošetrení roztokom DMSO ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) vo vode, pozorovaný po 24 h. **(G,J)** List transgénnej rastliny lucerny po ošetrení roztokom dexametazónu ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) vo vode, pozorovaný po 14 dňoch. **(H,K)** List transgénnej rastliny lucerny po ošetrení roztokom dexametazónu ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) vo vode, pozorovaný po 14 dňoch. **(I,L)** „Mock“ kontrola s rozpúšťadlom DMSO: list transgénnej rastliny lucerny po ošetrení roztokom DMSO ($20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) vo vode, pozorovaný po 14 dňoch. Listy boli pozorované pomocou CLSM v troch kanáloch pre mCherry, chlorofyl a prechádzajúce svetlo; objektív EC Plan-Neofluar 10x/0.30 M27. Mierka: $50 \mu\text{m}$ (A-L).

4.7 Selekcia transgénnych rastlín

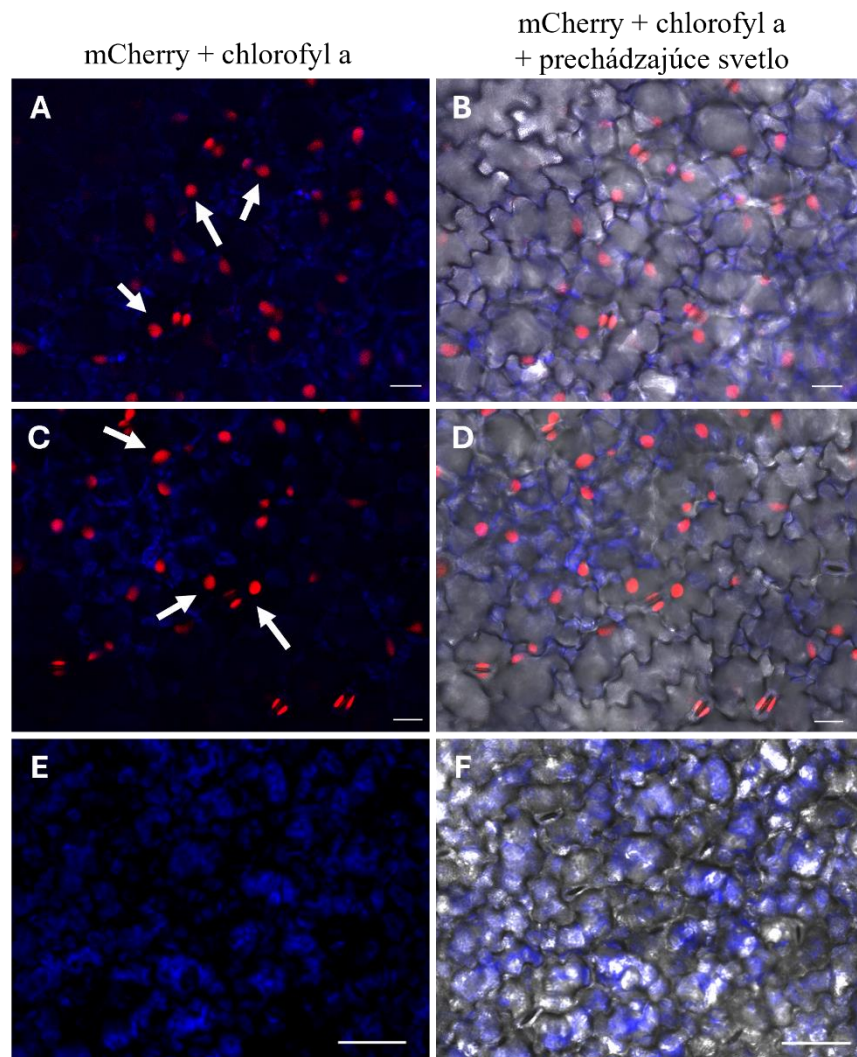
Najprv prebiehala selekcia transgénnych rastlín na kultivačných médiách s prídavkom selekčného antibiotika hygromycín, pretože pripravené vektory obsahujú gén rezistencie voči tomuto antibiotiku. Podmienky pre indukciu expresie *Cas9* v rastlinách obsahujúcich CRISPR-KO vektory s chemicky-indukovateľným promótorom a následná selekcia transgénnych rastlín bola uvedená v predchádzajúcej časti výsledkov.

Selekcia rastlín transformovaných CRISPR-KO vektormi s konštitutívnou nadexpresiou *Cas9* prebiehala tiež na základe červeného fluorescenčného signálu odpovedajúceho jadrovo-lokalizovanému fúznemu proteínu mCherry-Cas9.

Pomocou ZOOM mikroskopu bola pozorovaná distribúcia červenej fluorescencie pochádzajúcej z chimérneho proteínu mCherry-Cas9 v celom somatickom embryu (Obr. 17 A). S využitím epifluorescenčného mikroskopu boli potom pozorované korene mladých rastlín (Obr. 17 B-E) a neskôr bol fluorescenčný signál mCherry-Cas9 pozorovaný aj pomocou CLSM v listoch transgéennej lucerny (Obr. 18).



Obr. 17: Červený fluorescenčný signál fúzneho proteínu mCherry-Cas9 pozorovaný v transgénnych embryách a koreňoch lucerny obsahujúcich CRISPR-KO vektory s konštitutívnym promótorom *UBQ10* regulujúcim expresiu *Cas9*. (A) Somatické embryo pozorované pomocou ZOOM mikroskopu; objektív PlanNeoFluar Z 1.0x. (B) Koreň obsahujúci CRISPR-KO vektor s *Cas9* zacielenou na gén *MMK2*. (C) Koreň obsahujúci CRISPR-KO vektor s *Cas9* zacielenou na gén *MMK3*. (D,E) Koreň kontrolnej rastliny (RSY). Biele šípky označujú jadrá buniek. A-D: Embryá a korene boli pozorované v kanáloch pre mCherry a prechádzajúce svetlo. E: Koreň bol pozorovaný len v kanáli pre mCherry. B-E: Pozorovanie pomocou epifluorescenčného mikroskopu; objektív EC Plan-Neofluar 10x/0.30 M27. Mierka: 1 mm (A); 100 μ m (B-E).

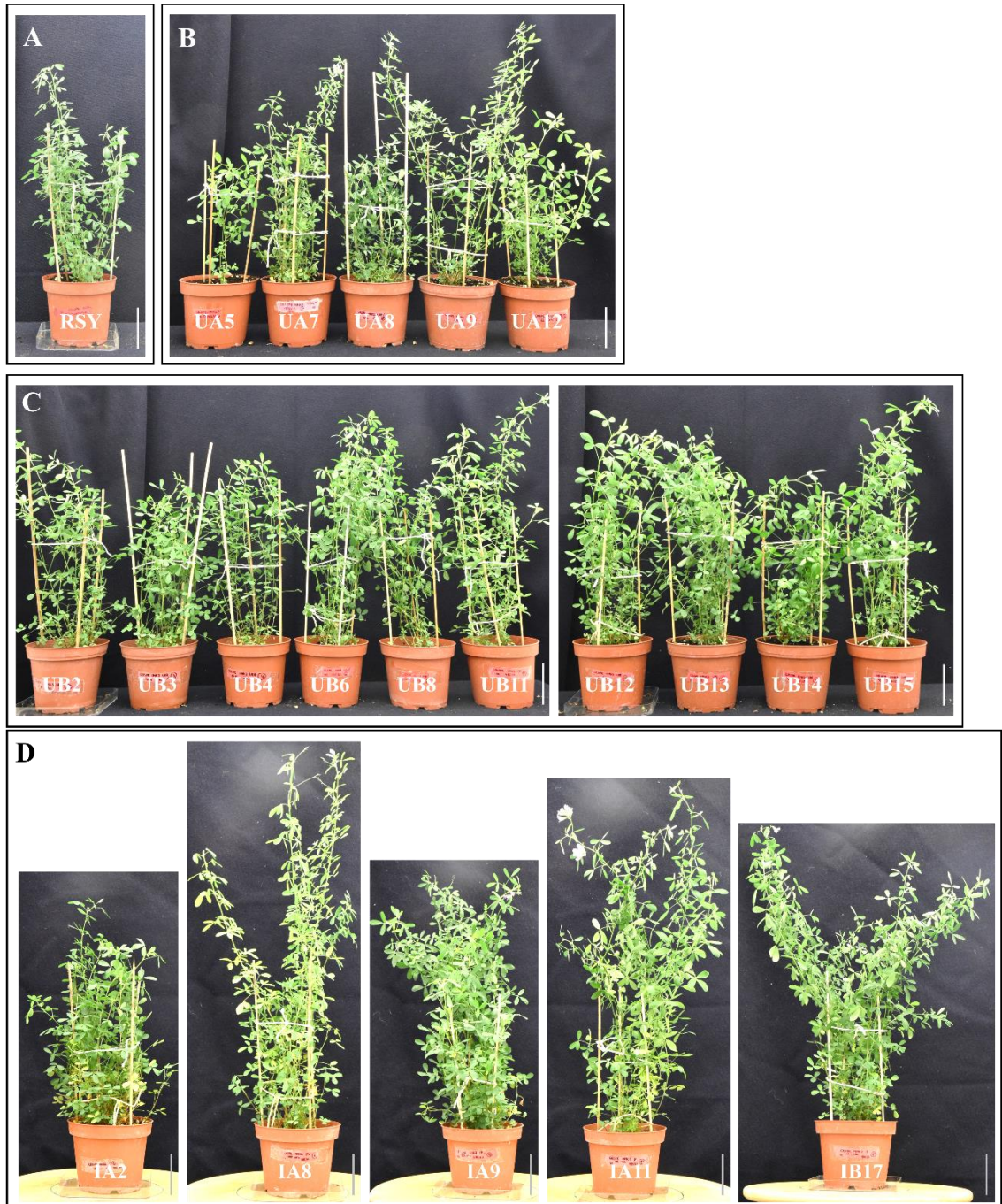


Obr. 18: Červený fluorescenčný signál fúzneho proteínu mCherry-Cas9 v jadrách listov transgénnych rastlín lucerny obsahujúcich CRISPR-KO vektory s konštitutívnym promótorom *UBQ10* regulujúcim expresiu *Cas9*. (**A,B**) List obsahujúci CRISPR-KO vektor zacielený na gén *MMK2*. (**C,D**) List obsahujúci CRISPR-KO vektor zacielený na gén *MMK3*. (**E,F**) List kontrolnej rastliny (RSY). Biele šípky označujú jadrá buniek. Listy boli pozorované pomocou CLSM v troch kanáloch pre mCherry, chlorofyl a prechádzajúce svetlo; objektív EC Plan-Neofluar 10x/0.30 M27. Mierka: 50 μm .

Všetky vyselektované rastliny boli označené (Tab. 30) a neskôr prenesené do *ex vivo* podmienok. Následne bol pozorovaný fenotyp transgénnych rastlín a bol porovnaný s fenotypom kontrolnej rastliny RSY (Obr. 19).

Tab. 30: Prehľad transgénnych línií lucerny obsahujúcich vektory pre multiplexnú editáciu génov *MMK2* a *MMK3*.

transgénna línia	označenie rastliny
konštitutívna nadexpresia (<i>UBQ10</i>) CRISPR/Cas9 zacielený na gén <i>MMK2</i>	UA5, UA7, UA8, UA9, UA12
inducibilná nadexpresia (<i>35S::GR-LhG4:tRbcS</i> - <i>pOp6</i>) CRISPR/Cas9 zacielený na gén <i>MMK2</i>	IA2, IA8, IA9, IA11
konštitutívna nadexpresia (<i>UBQ10</i>) CRISPR/Cas9 zacielený na gén <i>MMK3</i>	UB2, UB3, UB4, UB6, UB8, UB11, UB12, UB13, UB14, UB15
inducibilná nadexpresia (<i>35S::GR-LhG4:tRbcS</i> - <i>pOp6</i>) CRISPR/Cas9 zacielený na gén <i>MMK3</i>	IB17



Obr. 19: Fenotypy nadzemných častí transgénnych línií lucerny. **(A)** Kontrolná rastlina (RSY). **(B)** Transgénne rastliny s CRISPR-KO vektorom obsahujúcim konštitutívny promótor pre expresiu *Cas9*, zacielený na gén *MMK2*. **(C)** Transgénne rastliny s CRISPR-KO vektorom obsahujúcim konštitutívny promótor pre expresiu *Cas9*, zacielený na gén *MMK3*. **(D)** Transgénne rastliny s CRISPR-KO vektorom obsahujúcim chemicky-inducibilný systém pre expresiu *Cas9*, zacielené na gény *MMK2* (línie označené IA) a *MMK3* (línie označené IB). Fotografie boli zhotovené pomocou fotoaparátu Nikon D5600. Mierka: 7 cm.

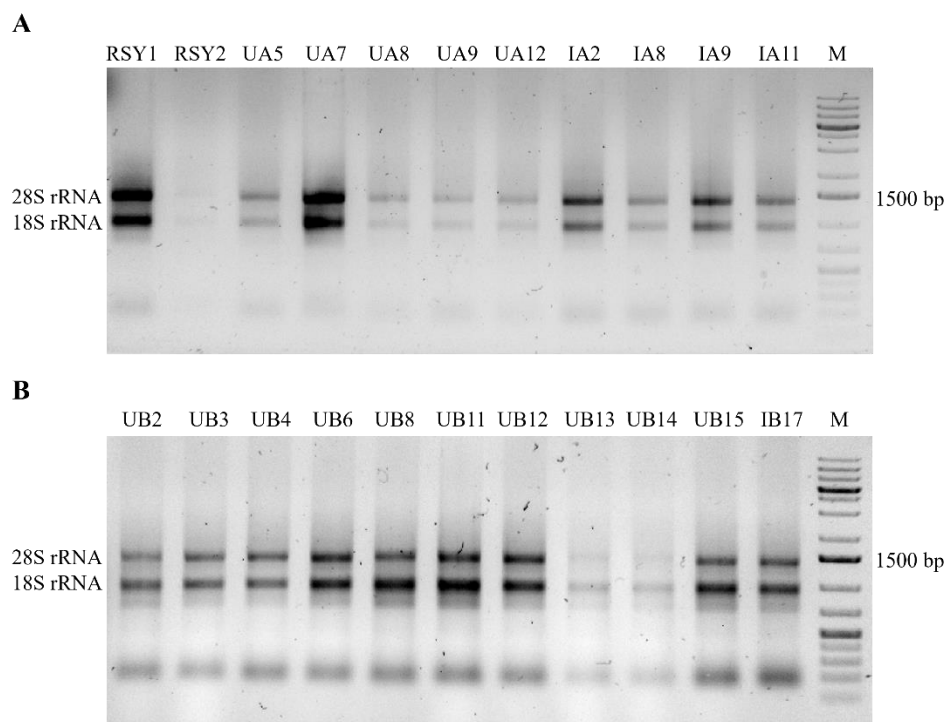
4.8 Sledovanie expresie *MMK2* a *MMK3* génov v transgénnych rastlinách

Po izolácii RNA zo všetkých transgénnych rastlín (uvedených v Tab. 30) a dvoch kontrolných rastlín (RSY1 a RSY2), bola meraná koncentrácia RNA v každej vzorke. Namerané hodnoty sú uvedené v Tab. 31.

Kvalita izolovanej RNA bola potom overená separáciou vzoriek prostredníctvom 1 % agarózovej elektroforézy a následnej vizualizácie fragmentov, ktorej výsledok je na Obr. 20. Overená RNA bola použitá na syntézu cDNA pre RT-qPCR.

Tab.31: Výťažok izolovanej RNA z transgénnych a kontrolných rastlín.

rastlina	koncentrácia RNA (ng/μl)	rastlina	koncentrácia RNA (ng/μl)
RSY1	1463,2	UB2	673,4
RSY2	423,7	UB3	656,9
UA5	550,2	UB4	443,5
UA7	1077,5	UB6	558,7
UA8	530,4	UB8	845,5
UA9	631,2	UB11	767,5
UA12	735,1	UB12	745,5
IA2	693,6	UB13	547,1
IA8	668,4	UB14	525,1
IA9	678,3	UB15	674,4
IA11	780,6	IB17	659,4

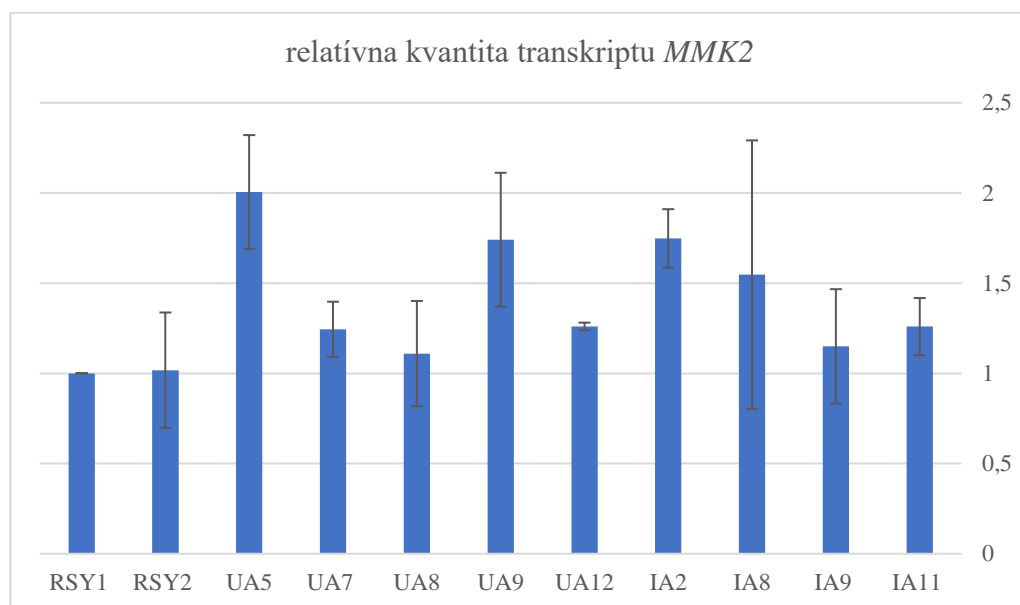


Obr.20: Elektroforetogram znázorňujúci integritu izolovanej RNA. (A) Vzorky RNA izolované z kontrolných rastlín (RSY) a z transgénnych rastlín s CRISPR-KO vektormi zacielenými na gén *MMK2*. (B) Vzorky RNA izolované z transgénnych rastlín s CRISPR-KO vektormi zacielenými na gén *MMK3*. 28S rRNA – štruktúrna ribozomálna RNA veľkej podjednotky ribozómov; 18S rRNA – ribozomálna RNA vyskytujúca sa v malej podjednotke ribozómov; M – DNA marker.

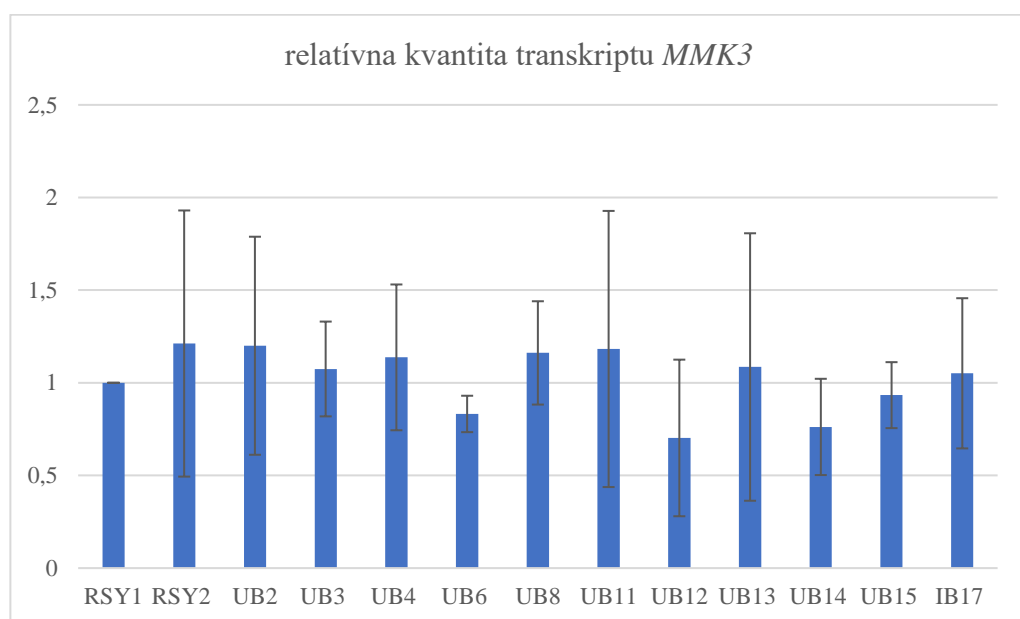
Po spracovaní dát z RT-qPCR bola jedným z výsledkov hodnota CT („cycle threshold“). Táto hodnota slúžila na výpočet relatívnej kvantity transkriptov *MMK2* a *MMK3* vo všetkých vyselektovaných transgénnych rastlinách a tiež v dvoch kontrolných rastlinách (RSY1, RSY2).

V programe „DataAssist“ bola najprv získaná hodnota delta CT, popisujúca rozdiel medzi CT génu záujmu a CT referenčného génu. Potom bola vypočítaná hodnota delta delta CT a následne záporná druhá mocnina delta delta CT, vyjadrujúca expresiu génu záujmu vzhľadom na expresiu referenčného génu. Vzhľadom na to, že experiment bol uskutočnený v troch technických opakovaníach pri sledovaní úrovne expresie oboch génov, bolo takto spracované každé opakovanie. Výsledné hodnoty z troch opakovaní boli priemerované a spracované do grafov.

U rastlín UA5, UA9 a IA2 s CRISPR-KO systémom zacieleným na gén *MMK2*, bola pozorovaná mierne zvýšená hladina transkriptu *MMK2* (Obr. 21) v porovnaní s kontrolnými rastlinami (RSY1, RSY2). Transgénne rastliny UB6, UB12 a UB14 s CRISPR-KO systémom zacieleným na gén *MMK3* vykazovali mierne znížené množstvo transkriptu *MMK3* (Obr. 22) v porovnaní s kontrolnými rastlinami (RSY1, RSY2).



Obr. 21: Relatívna kvantita transkriptu *MMK2* v transgenných rastlinách s CRISPR-KO zacieleným na gén *MMK2*.



Obr. 22: Relatívna kvantita transkriptu *MMK3* v transgenných rastlinách s CRISPR-KO zacieleným na gén *MMK3*.

5 DISKUSIA

V tejto práci bolo rozoberané možné zapojenie kináz MMK2 a MMK3 do regulácie bunkového delenia u lucerny siatej. Je zrejmé, že MMK2 vykazuje podobnosti s AtMPK4 (Tena et al., 2001). Vzhľadom na to, že *mpk4* mutant u *A. thaliana* má defekty v mikrotubuloch a cytokinéze (Beck et al., 2010; Beck et al., 2011), možno hypoteticky predpokladať, že by úspešná mutagenéza *MMK2* mohla mať u lucerny podobné dôsledky. V prípade *MMK3* je pravdepodobné, že jej ortológom v *A. thaliana* je AtMPK13 (Ouaked et al., 2003; Jagodzic et al., 2018). Uvažuje sa, že expresia *AtMPK13* môže súvisieť s mitotickou aktivitou buniek (Zeng et al., 2011). Možno teda predpokladať, že by cieľená mutagenéza *MMK3* mohla tiež ovplyvňovať proces bunkového delenia u lucerny.

V rámci experimentálnej časti tejto diplomovej práce bola preto hlavným cieľom príprava CRISPR-KO vektorov pre multiplexnú editáciu génov *MMK2* a *MMK3* u lucerny siatej podľa Decaestecker et al. (2019) a stabilná transformácia listových explantátov pripravenými vektormi. CRISPR-KO vektory obsahujú štyri gRNA navádzajúce Cas9 nukleázu na vybrané exóny génov *MMK2* alebo *MMK3*.

Expresia *Cas9* bola v prvom variante vektorov pod kontrolou konštitutívneho promótoru *UBQ10*. Pozorovaním somatických embryí transformovaných týmto variantom vektorov bola potvrdená nadexpresia CRISPR-KO systému v celej rastline. Použitie uvedeného konštitutívneho promótoru by mohlo dokonca zvýšiť efektivitu mutagenézy, keďže u *M. truncatula* popísali Wolabu et al. (2020b) až o 70 % zvýšenú efektivitu cielenej CRISPR/Cas9 mutagenézy v prípade expresie *Cas9* pod kontrolou *UBQ10*. Na druhej strane sa zistilo, že konštitutívna nadexpresia transgénu môže niekedy negatívne ovplyvňovať metabolizmus, vývin a rast rastliny (Omelina et al., 2022).

Použitie inducibilného systému pre expresiu *Cas9* predstavuje efektívnu alternatívu pri snahe o elimináciu možných negatívnych dôsledkov konštitutívnej nadexpresie. Preto druhý variant vektorov obsahoval chemicky-indukovateľný systém *GR-Lh/pOp6*, ktorý závisí od prítomnosti glukokortikoidu dexametazón. Vzhľadom na to, že pre reguláciu expresie *Cas9* nebol tento inducibilný systém doposiaľ použitý u lucerny siatej, bolo ďalším cieľom optimalizovať podmienky indukcie. V *M. truncatula* boli pre indukciu systému *GR-Lh/pOp6* v koreňoch testované 1-100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentrácie dexametazónu (Liu a Yoder, 2016). V ďalších rastlinných druhoch, uvedených v úvodnej časti tejto diplomovej práce, bola pre indukciu tohto systému využitá maximálne 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentrácia dexametazónu (Amirsadeghi et al., 2007; Gonzalez et al., 2015; Samalova et al., 2019). V našich experimentoch bol najprv dexametazón (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) v tekutom

MS médiu aplikovaný na vybranú rastlinu umiestnenú na tuhom kultivačnom MS médiu. Avšak, vhodnejším spôsobom bola kultivácia rastliny na tuhom MS médiu obsahujúcom $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ dexametazón. Ďalej bolo pozorované, že po viac ako piatich dňoch od umiestnenia rastliny na toto médium, začali rastliny prejavovať symptómy nekrózy. Takže doba indukcie trvajúca viac ako 5 dní sa ukázala pre rastliny ako škodlivá. Podľa Vlad et al. (2019), ktorí skúmali dexametazónom-inducibilný systém u ryže, môže byť toxický účinok spôsobený aktivitou GR-Lh. Autori tiež zistili, že nežiaduce účinky tohto inducibilného systému môžu byť zmiernené prídavkom IPTG do kultivačného média, nakoľko táto chemikália funguje ako antagonista pre DNA väzbovú doménu *lac*-represora v GR-Lh. Týmto spôsobom by bolo možné, po optimalizácii koncentrácie IPTG v kultivačnom médiu, predĺžiť dobu indukcie v prípade, že by 1-3 dni neboli dostatočné na efektívnu mutagenézu.

Miera regenerácie lucerny transformovanej CRISPR-KO vektormi s inducibilnou expresiou *Cas9* bola znížená (dokonca pred samotnou aplikáciou dexametazónu) oproti rastlinám, v ktorých bola expresia *Cas9* pod kontrolou konštitutívneho promótoru *UBQ10*. Z tohto dôvodu bolo na optimalizáciu podmienok pre indukciu exprese *Cas9* k dispozícii len obmedzené množstvo rastlín. Navyše, vývoj rastlín môže byť podľa Jillette et al. (2019) negatívne ovplyvnený prídavkom druhého selekčného antibiotika do kultivačného média, ktorým bol v tomto prípade hygromycín. Pre potrebu získať čo najviac zdravých transformovaných rastlín by bolo v budúcnosti vhodné znížiť koncentráciu hygromycínu použitého na ich selekciu.

Po úspešnej selekcii transgénnych rastlín na základe fluorescencného signálu jadrovlokalizovaného fúzneho proteínu mCherry-Cas9, bola pre prvotnú analýzu úspešnosti cielenej mutagézy génov *MMK2* a *MMK3* u lucerny sledovaná miera exprese týchto génov pomocou RT-qPCR. Bola zaznamenaná mierne znížená hladina transkriptov *MMK3* v troch transgénnych rastlinách s Cas9 zacielenou na gén *MMK3*, v porovnaní s kontrolou. V prípade rastlín, v ktorých bol multiplexný CRISPR-KO systém zacielený na gén *MMK2*, bola pozorovaná mierne zvýšená hladina transkriptu *MMK2* v troch transgénnych rastlinách. Treba však poznamenať, že analýza exprese génov bola vykonaná na vzorkách z T0 generácie transgénnych rastlín, pričom každá z týchto rastlín pravdepodobne mohla prijať do svojho genómu odlišné množstvo transgénu. Je preto zrejmé, že RT-qPCR metóda nie je vhodná na získanie relevantných výsledkov pre vyhodnotenie úspešnosti mutagenézy *MMK2* a *MMK3* génov v pripravených transgénnych líniiach.

Vhodnou metódou pre potvrdenie úspešnosti CRISPR-KO editácie by mohla byť Western blot analýza so špecifickými protilátkami proti MMK2 a MMK3. V prípade úspešnej mutagenézy génov *MMK2* alebo *MMK3*, by mala byť potvrdená aspoň znížená abundancia proteínov MMK2 alebo MMK3, či dokonca ich absencia v transgénnych rastlinách ak boli súčasne vyradené všetky štyri alely pre tieto gény, podobe ako v prípade úspešnej CRISPR/Cas9 editácie génu *SBE3* („*STARCH BRANCHING ENZYME 3*“) v zemiakoch, ktorá zapríčinila absenciu kódovaného proteínu SBE3 (Takeuchi et al., 2021).

V snahe o efektívnu mutagenézu génov *MMK2* a *MMK3* s využitím pripravených multiplexných CRISPR-KO vektorov boli vždy dve gRNA zacielené na prvý exón týchto génov. Následkom štiepenia DNA sekvencií, vzdialených niekoľko desiatok bp od seba, môžu vzniknúť rozsiahle delécie (Oh et al., 2020). Z genómovej DNA rastlín UB6, UB12 a UB14, ktoré vykazovali podľa výsledkov RT-qPCR zníženú hladinu transkriptu *MMK3* oproti kontrolným rastlinám, boli pomocou PCR amplifikované prvé exóny a odoslané na Sangerovo sekvenovanie (Príloha 5). Avšak, pre analýzu sekvencií DNA z tetraploidnej lucerny nemusí byť tento postup dostatočne efektívny. Dôvodom je analýza sekvencií štyroch alel súčasne, čo môže v prípade odlišností v nukleotidovej sekvencií alel na určitých DNA úsekoch sťažiť vyhodnocovanie výsledkov. Pre potvrdenie úspešnosti mutagenézy *MMK2* a *MMK3* génov na úrovni DNA by bolo vhodné postupovať podľa Wolabu et al. (2023), ktorí editované sekvencie klonovali do špeciálneho vektora, do ktorého sa inkorporuje vždy len DNA sekvencia zodpovedajúca jednej alele. Sangerovým sekvenovaním plazmidovej DNA by bolo potom možné analyzovať charakter mutácií na všetkých alelách. Záverom, pre budúce analýzy editovaných DNA sekvencií a fenotypov je nevyhnutné získať ďalšie generácie z pripravených transgénnych línií lucerny.

6 ZÁVER

Teoretická časť tejto diplomovej práce sa zaoberá všeobecnou charakteristikou MAPK s dôrazom na funkcie kináz MMK2 a MMK3. V rámci tejto kapitoly bola popísaná úloha MAPK počas interakcie *Medicago* spp. s prospešnými baktériami rodu *Sinorhizobium* ako aj v prítomnosti niektorých mikrobiálnych elicitorov. Ďalšia časť bola zameraná na CRISPR/Cas9 technológiu a jej rôzne modifikácie a ich využitie, pričom zvláštna pozornosť bola venovaná multiplexnej CRISPR/Cas9 editácii génov a využitiu pre zlepšovanie vlastností plodín. V nasledujúcej časti bola popísaná funkcia chemicky-inducibilného systému používaného v tejto diplomovej práci a v poslednej kapitole boli rozoberané metódy selekcie transgénnych rastlín a spôsoby analýzy úspešnosti CRISPR/Cas9 editácie génov v rastlinnom genóme.

Prvou úlohou experimentálnej časti práce bol návrh gRNA pre mutagenézu génu *MMK3*, pričom návrh gRNA pre mutagenézu *MMK2* a klonovanie destinačných CRISPR vektorov prebehli už pri riešení bakalárskej práce, na ktorú táto diplomová práca nadväzuje. Po príprave dvojvláknových oligonukleotidov obsahujúcich gRNA nasledovalo „Golden Gate“ klonovanie pripravených konštruktov do príslušných akceptorových vektorov. Prostredníctvom „Green Gate“ klonovania boli potom vytvorené finálne multiplexné CRISPR-KO vektory so štyrmi gRNA zacielenými na tri exóny génov *MMK2* alebo *MMK3*, v ktorých bola expresia *Cas9* pod kontrolou konštitutívneho alebo chemicky-inducibilného promotóra.

Správnosť pripravených vektorov bola overená pomocou fluorescencie fúzných proteínov mCherry-Cas9 po tranzientnej transformácii listov *N. benthamiana*, po ktorej nasledovala stabilná transformácia listových explantátov lucerny siatej. Po prvotnej selekcií rastlín na kultivačnom médiu s prídavkom selekčného antibiotika hygromycín, nasledovala PCR selekcia transgénnych rastlín obsahujúcich CRISPR-KO vektory s inducibilným promotórom pre reguláciu expresie *Cas9*. Vzhľadom na to, že u lucerny nebolo doteraz popísané použitie chemicky-indukovateľného systému *GR-Lh/pOp6*, boli optimalizované podmienky pre indukciu expresie *Cas9* prídavkom glukokortikoidu dexametazón.

Potom nasledovala mikroskopická selekcia úspešne transformovaných somatických embryí a rastlín pomocou ZOOM mikroskopu, epifluorescenčného mikroskopu a CLSM. V bunkách koreňov a listov transgénnych rastlín bol pozorovaný červený fluorescenčný signál zodpovedajúci jadrovo-lokalizovanému chimérenmu proteínu mCherry-Cas9. Vyselektované transgénne rastliny boli podrobené analýze hladiny transkriptov *MMK2*

a *MMK3* prostredníctvom RT-qPCR. Na základe získaných predbežných výsledkov nebolo možné vyhodnotiť úspešnosť cielenej mutagenézy. Avšak, v budúcnosti bude možné využiť pripravené transgénne línie lucerny na ďalšie molekulárne, fenotypové, biochemické alebo proteomické analýzy s cieľom potvrdiť a vyhodnotiť úspešnosť multiplexnej editácie zameranej na mutagenézu génov *MMK2* a *MMK3*.

7 LITERATÚRA

- Abe, K., Araki, E., Suzuki, Y., Toki, S., & Saika, H. (2018). Production of high oleic/low linoleic rice by genome editing. *Plant Physiology and Biochemistry*, *131*, 58–62. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.04.033>
- Amirsadeghi, S., McDonald, A. E., & Vanlerberghe, G. C. (2007). A glucocorticoid-inducible gene expression system can cause growth defects in tobacco. *Planta*, *226*(2), 453–463. <https://doi.org/10.1007/s00425-007-0495-1>
- Anzalone, A. V., Koblan, L. W., & Liu, D. R. (2020). Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. *Nature Biotechnology*, *38*(7), 824–844. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0561-9>
- Anzalone, A. V., Randolph, P. B., Davis, J. R., Sousa, A. A., Koblan, L. W., Levy, J. M., Chen, P. J., Wilson, C., Newby, G. A., Raguram, A., et al. (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, *576*(7785), 149–157. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>
- Bahariah, B., Masani, M. Y. A., Rasid, O. A., & Parveez, G. K. A. (2021). Multiplex CRISPR/Cas9-mediated genome editing of the FAD2 gene in rice: a model genome editing system for oil palm. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *19*(1). <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00185-4>
- Barry, C. S., McQuinn, R. P., Chung, M. Y., Besuden, A., & Giovannoni, J. J. (2008). Amino acid substitutions in homologs of the Stay-Green protein are responsible for the green-flesh and chlorophyll retainer mutations of tomato and pepper. *Plant Physiology*, *147*(1), 179–187. <https://doi.org/10.1104/pp.108.118430>
- Beck, M., Komis, G., Müller, J., Menzel, D., & Šamaj, J. (2010). Arabidopsis homologs of nucleus- and phragmoplast-localized kinase 2 and 3 and mitogen-activated protein kinase 4 are essential for microtubule organization. *Plant Cell*, *22*(3), 755–771. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.071746>
- Beck, M., Komis, G., Ziemann, A., Menzel, D., & Samaj, J. (2011). Mitogen-activated protein kinase 4 is involved in the regulation of mitotic and cytokinetic microtubule transitions in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, *189*(4), 1069–1083. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03565.x>
- Binder, B. M. (2020). Ethylene signaling in plants. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(22), 7710–7725. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.010854>
- Biswas, S., Zhang, D., & Shi, J. (2021). CRISPR/Cas systems: opportunities and challenges for crop breeding. *Plant Cell Reports*, *40*(6), 979–998. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02708-2>
- Bögre, L., Calderini, O., Binarova, P., Mattauch, M., Till, S., Kiegerl, S., Jonak, C., Pollaschek, C., Barker, P., Huskisson, et al. (1999). A MAP kinase is activated late in plant itosis and becomes localized to the plane of cell division. *The Plant Cell*, *11*(1), 101–113.
- Brazelton, V. A., Zarecor, S., Wright, D. A., Wang, Y., Liu, J., Chen, K., Yang, B., & Lawrence-Dill, C. J. (2015). A quick guide to CRISPR sgRNA design tools. *GM Crops & Food*, *6*(4), 266–276. <https://doi.org/10.1080/21645698.2015.1137690>
- Calderini, O., Glab, N., Bergounioux, C., Heberle-Bors, E., & Wilson, C. (2001). A novel Tobacco mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase, NtMEK1, activates the cell cycle-regulated p43Ntf6 MAP kinase. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(21), 18139–18145. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010621200>
- 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>
- Casarin, T., Freitas, N. C., Pinto, R. T., Breitler, J. C., Rodrigues, L. A. Z., Marraccini, P., Etienne, H., Diniz, L. E. C., Andrade, A. C., & Paiva, L. V. (2022). Multiplex CRISPR/Cas9-mediated knockout of the phytoene desaturase gene in *Coffea canephora*. *Scientific Reports*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21566-w>

- Chen, T., Zhou, B., Duan, L., Zhu, H., & Zhang, Z. (2017). MtMAPKK4 is an essential gene for growth and reproduction of *Medicago truncatula*. *Physiologia Plantarum*, *159*(4), 492–503. <https://doi.org/10.1111/ppl.12533>
- Cheng, H., Hao, M., Ding, B., Mei, D., Wang, W., Wang, H., Zhou, R., Liu, J., Li, C., & Hu, Q. (2021). Base editing with high efficiency in allotetraploid oilseed rape by A3A-PBE system. *Plant Biotechnology Journal*, *19*(1), 87–97. <https://doi.org/10.1111/pbi.13444>
- Cheng, X., Li, G., Krom, N., Tang, Y., & Wen, J. (2021). Genetic regulation of flowering time and inflorescence architecture by MtFDa and MtFTa1 in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, *185*(1), 161–178. <https://doi.org/10.1093/PLPHYS/KIAA005>
- Cheng, Y., Li, Y., Yang, J., He, H., Zhang, X., Liu, J., & Yang, X. (2023). Multiplex CRISPR-Cas9 knockout of EIL3, EIL4, and EIN2L advances soybean flowering time and pod set. *BMC Plant Biology*, *23*(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04543-x>
- Craft, J., Samalova, M., Baroux, C., Townley, H., Martinez, A., Jepson, I., Tsiantis, M., & Moore, I. (2005). New pOp/LhG4 vectors for stringent glucocorticoid-dependent transgene expression in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, *41*(6), 899–918. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02342.x>
- Das, D., Singha, D. L., Paswan, R. R., Chowdhury, N., Sharma, M., Reddy, P. S., & Chikkaputtaiah, C. (2022). Recent advancements in CRISPR/Cas technology for accelerated crop improvement. *Planta*, *255*(5). <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03894-3>
- Davidson, M. W., & Campbell, R. E. (2009). Engineered fluorescent proteins: Innovations and applications. *Nature Methods*, *6*(10), 713–717. <https://doi.org/10.1038/nmeth1009-713>
- De Vetten, N., Wolters, A. M., Raemakers, K., Van der Meer, I., Ter Stege, R., Heeres, E., Heeres, P., & Visser, R. (2003). A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop. *Nature Biotechnology*, *21*(4), 439–442. <https://doi.org/10.1038/nbt801>
- Decaestecker, W., Buono, R. A., Pfeiffer, M. L., Vangheluwe, N., Jourquin, J., Karimi, M., van Isterdael, G., Beeckman, T., Nowack, M. K., & Jacobs, T. B. (2019). CRISPR-Tsko: A technique for efficient mutagenesis in specific cell types, tissues, or organs in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *31*(12), 2868–2887. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00454>
- Ferreira, R., Skrekas, C., Nielsen, J., & David, F. (2018). Multiplexed CRISPR/Cas9 genome editing and gene regulation using Csy4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synthetic Biology*, *7*(1), 10–15. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00259>
- Freeman, J., Sparks, C. A., West, J., Shewry, P. R., & Jones, H. D. (2011). Temporal and spatial control of transgene expression using a heat-inducible promoter in transgenic wheat. *Plant Biotechnology Journal*, *9*(7), 788–796. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00588.x>
- Gao, J., Wang, G., Ma, S., Xie, X., Wu, X., Zhang, X., Wu, Y., Zhao, P., & Xia, Q. (2015). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology*, *87*(1–2), 99–110. <https://doi.org/10.1007/s11103-014-0263-0>
- Gao, R., Feyissa, B. A., Croft, M., & Hannoufa, A. (2018). Gene editing by CRISPR/Cas9 in the obligatory outcrossing *Medicago sativa*. *Planta*, *247*(4), 1043–1050. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2866-1>
- Gao, Y., & Zhao, Y. (2014). Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR-mediated genome editing. *Journal of Integrative Plant Biology*, *56*(4), 343–349. <https://doi.org/10.1111/jipb.12152>
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(39). <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>
- Gerashchenkov, G. A., Rozhnova, N. A., Kuluev, B. R., Kiryanova, O. Yu., Gumerova, G. R., Knyazev, A. v., Vershinina, Z. R., Mikhailova, E. v., Chemeris, D. A., Matniyazov, et al. (2020). Design of guide RNA for CRISPR/Cas plant genome editing. *Molecular Biology*, *54*(1), 24–42. <https://doi.org/10.1134/s0026893320010069>
- Gleditsch, D., Pausch, P., Müller-Esparza, H., Özcan, A., Guo, X., Bange, G., & Randau, L. (2019). PAM identification by CRISPR-Cas effector complexes: diversified mechanisms and structures. *RNA Biology*, *16*(4), 504–517. <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1504546>

- Gonzalez, T. L., Liang, Y., Nguyen, B. N., Staskawicz, B. J., Loqué, D., & Hammond, M. C. (2015). Tight regulation of plant immune responses by combining promoter and suicide exon elements. *Nucleic Acids Research*, *43*(14), 7152–7161. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv655>
- Gow, N. A. R., Latge, J.-P., & Munro, C. A. (2017). The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *Microbiology Spectrum*, *5*(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0035-2016>
- Grimrud, P. A., den Os, D., Wenger, C. D., Swaney, D. L., Schwartz, D., Sussman, M. R., Ané, J. M., & Coon, J. J. (2010). Large-scale phosphoprotein analysis in *Medicago truncatula* roots provides insight into in vivo kinase activity in legumes. *Plant Physiology*, *152*(1), 19–28. <https://doi.org/10.1104/pp.109.149625>
- Hassan, M. M., Zhang, Y., Yuan, G., De, K., Chen, J. G., Muchero, W., Tuskan, G. A., Qi, Y., & Yang, X. (2021). Construct design for CRISPR/Cas-based genome editing in plants. *Trends in Plant Science*, *26*(11), 1133–1152. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.06.015>
- Herrmann, M. G., Durtschi, J. D., Bromley, L. K., Wittwer, C. T., & Voelkerding, K. V. (2006). Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: Cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clinical Chemistry*, *52*(3), 494–503. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.063438>
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, *10*(4), 413–417. <https://doi.org/10.1038/nbt0492-413>
- Hlaváčková, K., Šamajová, O., Hrbáčková, M., Šamaj, J., & Ovečka, M. (2023). Advanced microscopy resolves dynamic localization patterns of stress-induced mitogen-activated protein kinase (SIMK) during alfalfa root hair interactions with *Ensifer meliloti*. *Journal of Experimental Botany*, *74*(12), 3729–3748. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad111>
- Hrbáčková, M., Luptovciak, I., Hlaváčková, K., Dvořák, P., Tichá, M., Šamajová, O., Novák, D., Bednarz, H., Niehaus, K., Ovečka, M., et al. (2021). Overexpression of alfalfa SIMK promotes root hair growth, nodule clustering and shoot biomass production. *Plant Biotechnology Journal*, *19*(4), 767–784. <https://doi.org/10.1111/pbi.13503>
- Hryhorowicz, M., Lipiński, D., Zeyland, J., & Słomski, R. (2017). CRISPR/Cas9 Immune system as a tool for genome engineering. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, *65*(3), 233–240. <https://doi.org/10.1007/s00005-016-0427-5>
- Hsieh-Feng, V., & Yang, Y. (2020). Efficient expression of multiple guide RNAs for CRISPR/Cas genome editing. *aBIOTECH*, *1*(2), 123–134. <https://doi.org/10.1007/s42994-019-00014-w>
- Huang, D., Kosentka, P. Z., & Liu, W. (2021). Synthetic biology approaches in regulation of targeted gene expression. *Current Opinion in Plant Biology*, *63*. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102036>
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., & Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, *6*(4), 279–284. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364190>
- Jach, G., Binot, E., Frings, S., Luxa, K., & Schell, J. (2001). Use of red fluorescent protein from *Discosoma* sp. (dsRED) as a reporter for plant gene expression. *Plant Journal*, *28*(4), 483–491. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01153.x>
- Jagodzick, P., Tajdel-Zielinska, M., Ciesla, A., Marczak, M., & Ludwikow, A. (2018). Mitogen-activated protein kinase cascades in plant hormone signaling. *Frontiers in Plant Science*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01387>
- Janik, E., Niemcewicz, M., Ceremuga, M., Krzowski, L., Saluk-Bijak, J., & Bijak, M. (2020). Various aspects of a gene editing system—crispr—cas9. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(24), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms21249604>
- Jiang, Y., Ren, Y., Xu, X., Wang, H., & Wei, C. (2022). Application of allele specific PCR in identifying offspring genotypes of bi-allelic *SbeIIb* mutant lines in rice. *Plants*, *11*(4). <https://doi.org/10.3390/plants11040524>
- Jillette, N., Du, M., Zhu, J. J., Cardoz, P., & Cheng, A. W. (2019). Split selectable markers. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12891-2>

- 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>
- Jones, H. D., & Sparks, C. A. (2009). Selection of transformed plants. *Methods in Molecular Biology*, *478*, 23–37. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-379-0_2
- Jozefczuk, J., & Adjaye, J. (2011). Quantitative real-time PCR-based analysis of gene expression. *Methods in Enzymology*, *500*, 99–109. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385118-5.00006-2>
- Kalyana Babu, B., Mary Rani, K. L., Sahu, S., Mathur, R. K., Naveen Kumar, P., Ravichandran, G., Anitha, P., & Bhagya, H. P. (2019). Development and validation of whole genome-wide and genic microsatellite markers in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): First microsatellite database (OpSatdb). *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37737-7>
- Kanamori, N., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Frantescu, M., Quistgaard, E. M. H., Miwa, H., Downie, J. A., James, E. K., Felle, H. H., Haaning, L. L., et al. (2006). A nucleoporin is required for induction of Ca²⁺ spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(2), 359–364. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508883103>
- Kanchiswamy, C. N. (2016). DNA-free genome editing methods for targeted crop improvement. *Plant Cell Reports*, *35*(7), 1469–1474. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1982-2>
- Kantor, A., McClements, M. E., & Maclaren, R. E. (2020). Crispr-cas9 dna base-editing and prime-editing. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms21176240>
- Khokhani, D., Carriel, C. C., Vayla, S., Irving, T. B., Stonoha-Arther, C., Keller, N. P., & Ané, J.-M. (2021). Deciphering the chitin code in plant symbiosis, defense, and microbial networks. *Annual review of microbiology*, *75* (1), 583–607. doi:10.1146/annurev-micro-051921-114809
- Kim, J. M., Kim, D., Kim, S., & Kim, J. S. (2014). Genotyping with CRISPR-Cas-derived RNA-guided endonucleases. *Nature Communications*, *5*. <https://doi.org/10.1038/ncomms4157>
- Klempner, R. L., Sherwood, J. S., Tugizimana, F., Dubery, I. A., & Piater, L. A. (2014). Ergosterol, an orphan fungal microbe-associated molecular pattern (MAMP). *Molecular Plant Pathology*, *15*(7), 747–761. <https://doi.org/10.1111/mpp.12127>
- Komis, G., Šamajová, O., Ovečka, M. & Šamaj, J. (2018). Cell and Developmental Biology of Plant Mitogen-Activated Protein Kinases. *Annual review of plant biology*, *69*(1), 237–265. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040314>
- Kosetsu, K., Matsunaga, S., Nakagami, H., Colcombet, J., Sasabe, M., Soyano, T., Takahashi, Y., Hirt, H., & Machida, Y. (2010). The MAP kinase MPK4 is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, *22*(11), 3778–3790. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.077164>
- Kovalchuk, N., Jia, W., Eini, O., Morran, S., Pyvovarenko, T., Fletcher, S., Bazanova, N., Harris, J., Beck-Oldach, K., Shavrukov, Y., et al. (2013). Optimization of TaDREB3 gene expression in transgenic barley using cold-inducible promoters. *Plant Biotechnology Journal*, *11*(6), 659–670. <https://doi.org/10.1111/pbi.12056>
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., et al. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, *27*(2–3), 95–125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>
- Li, B., Xie, C., & Qiu, H. (2009). Production of selectable marker-free transgenic tobacco plants using a non-selection approach: Chimerism or escape, transgene inheritance, and efficiency. *Plant Cell Reports*, *28*(3), 373–386. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0640-8>
- Li, C., Shu, Y., & Hu, Q. (2023). Editorial: Genome editing technology in polyploid crops. *Frontiers in Plant Science*, *14*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1340455>
- Li, C., Zong, Y., Wang, Y., Jin, S., Zhang, D., Song, Q., Zhang, R., & Gao, C. (2018). Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. *Genome Biology*, *19*(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1443-z>
- Liu, J., Huang, S., Sun, M., Liu, S., Liu, Y., Wang, W., Zhang, X., Wang, H., & Hua, W. (2012). An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application. *Plant Methods*, *8*(1). <https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-34>

- Liu, L., Kuang, Y., Yan, F., Li, S., Ren, B., Gosavi, G., Spetz, C., Li, X., Wang, X., Zhou, X., et al. (2021). Developing a novel artificial rice germplasm for dinitroaniline herbicide resistance by base editing of OsTubA2. *Plant Biotechnology Journal*, 19(1), 5–7. <https://doi.org/10.1111/pbi.13430>
- Liu, S., & Yoder, J. I. (2016). Chemical induction of hairpin RNAi molecules to silence vital genes in plant roots. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep37711>
- Löfström, C., Josefsen, M. H., Hansen, T., SØndergaard, M. S. R., & Hoorfar, J. (2015). Fluorescence-based real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) technologies for high throughput screening of pathogens. *High Throughput Screening for Food Safety Assessment: Biosensor Technologies, Hyperspectral Imaging and Practical Applications*, 219–248. <https://doi.org/10.1016/B978-0-85709-801-6.00009-5>
- López-Salmerón, V., Schürholz, A. K., Li, Z., Schlamp, T., Wenzl, C., Lohmann, J. U., Greb, T., & Wolf, S. (2019). Inducible, cell type-specific expression in arabidopsis thaliana through LhGR-mediated trans-activation. *Journal of Visualized Experiments*, 2019(146). <https://doi.org/10.3791/59394>
- Ma, X., Zhang, Q., Zhu, Q., Liu, W., Chen, Y., Qiu, R., Wang, B., Yang, Z., Li, H., Lin, Y., et al. (2015). A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Molecular Plant*, 8(8), 1274–1284. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.04.007>
- Madison, B. B., Patil, D., Richter, M., Li, X., Tong, M., Cranert, S., Wang, X., Martin, R., Xi, H., Tan, Y., et al. (2022). Cas-CLOVER is a novel high-fidelity nuclease for safe and robust generation of TSCM-enriched allogeneic CAR-T cells. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 29, 979–995. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.06.003>
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D. H., Horvath, P., et al. (2020). Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*, 18(2), 67–83. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>
- McCue, P., & Shetty, K. (2004). Health benefits of soy isoflavonoids and strategies for enhancement: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(5), 361–367. <https://doi.org/10.1080/10408690490509591>
- 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(1–2), 5–8. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.08.051>
- Meng, Y., Yaling H., Wang, H., Ji, R., Liu, B., Wen, J., Niu, L., & Lin, H. (2017). Targeted mutagenesis by CRISPR/Cas9 system in the model legume Medicago truncatula. *Plant Cell Reports*, 36. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2069-9>
- Menz, J., Modrzejewski, D., Hartung, F., Wilhelm, R., & Sprink, T. (2020). Genome edited crops touch the market: A view on the global development and regulatory environment. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.586027>
- Messinese, E., Mun, J.-H., Huey Yeun, L., Jayaraman, D., Rougé, P., Barre, A., Lougnon, G., Schornack, S., Bono, J.-J., Cook, D. R., et al. (2007). A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium- and calmodulin-dependent protein kinase of Medicago truncatula. *Molecular Plant-Microbe Interactions MPMI*, 20(8), 912–921. <https://doi.org/10.1094/MPMI>
- Metje-Sprink, J., Menz, J., Modrzejewski, D., & Sprink, T. (2019). DNA-Free genome editing: Past, present and future. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01957>
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., & Almendros, C. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 155(3), 733–740. <https://doi.org/10.1099/mic.0.023960-0>
- Montesano, M., Brader, G., & Palva, E. T. (2003). Pathogen derived elicitors: Searching for receptors in plants. *Molecular Plant Pathology*, 4(1), 73–79. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00150.x>
- Moore, I., Gälweiler, L., Grosskopf, D., Schell, J. & Palme, K. (1998). A transcription activation system for regulated gene expression in transgenic plants. *Proceedings of the national academy of sciences*, 95(1), 376–381. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.1.376>

- Morrison, D. K. (2012). MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011254>
- 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>
- Nagappan, J., Rosli, R., Ting, N., Ooi, L., Low, L., & Singh, R. (2013). Exploiting synteny between oil palm and rice to find markers more closely linked to selected trait. *Journal of oil palm research*, 25(25), 180-187.
- Neve, P. (2018). Gene drive systems: do they have a place in agricultural weed management? *Pest Management Science*, 74(12), 2671–2679. <https://doi.org/10.1002/ps.5137>
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., & Nureki, O. (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 156(5), 935–949. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>
- Nishiyama, T., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2021). Toward CRISPR therapies for cardiomyopathies. *Circulation* 144(19), 1525–1527. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.121.057203>
- Oh, Y., Lee, B., Kim, H., & Kim, S. G. (2020). A multiplex guide RNA expression system and its efficacy for plant genome engineering. *Plant Methods*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00580-x>
- Okuzaki, A., Ogawa, T., Koizuka, C., Kaneko, K., Inaba, M., Imamura, J., & Koizuka, N. (2018). CRISPR/Cas9-mediated genome editing of the fatty acid desaturase 2 gene in Brassica napus. *Plant Physiology and Biochemistry*, 131, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.04.025>
- Omelina, E. S., Yushkova, A. A., Motorina, D. M., Volegov, G. A., Kozhevnikova, E. N., & Pindyurin, A. V. (2022). Optogenetic and chemical induction systems for regulation of transgene expression in plants: Use in basic and applied research. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031737>
- Ouaked F, Rozhon W, Lecourieux D, Hirt H. (2003). A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *EMBO Journal*, 22(6), 1282-1288. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg131>
- Ovečka, M., Takáč, T., Komis, G., Vadovič, P., Bekešová, S., Doskočilová, A., Smékalová, V., Luptovčíak, I., Šamajová, O., Schweighofer, A., et al. (2014). Salt-induced subcellular kinase relocation and seedling susceptibility caused by overexpression of Medicago SIMKK in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 65(9), 2335–2350. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru115>
- Park, S. Y., Yu, J. W., Park, J. S., Li, J., Yoo, S. C., Lee, N. Y., Lee, S. K., Jeong, S. W., Hak, S. S., Koh, H. J., Jeon, J. S., et al. (2007). The senescence-induced staygreen protein regulates chlorophyll degradation. *Plant Cell*, 19(5), 1649–1664. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.044891>
- Pixley, K. V., Falck-Zepeda, J. B., Paarlberg, R. L., Phillips, P. W. B., Slamet-Loedin, I. H., Dhugga, K. S., Campos, H., & Gutterson, N. (2022). Genome-edited crops for improved food security of smallholder farmers. *Nature Genetics*, 54(4), 364–367. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01046-7>
- Qin, D. (2019). Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer Biology and Medicine*, 16(1), 4–10. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0055>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Ranganathan, V., Wahlin, K., Maruotti, J., & Zack, D. J. (2014). Expansion of the CRISPR-Cas9 genome targeting space through the use of H1 promoter-expressed guide RNAs. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms5516>
- Ren, G., An, K., Liao, Y., Zhou, X., Cao, Y., Zhao, H., Ge, X., & Kuai, B. (2007). Identification of a novel chloroplast protein AtNYE1 regulating chlorophyll degradation during leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 144(3), 1429–1441. <https://doi.org/10.1104/pp.107.100172>

- Ren, J., Meng, X., Hu, F., Liu, Q., Cao, Y., Li, H., Yan, C., Li, J., Wang, K., Yu, H., et al. (2021). Expanding the scope of genome editing with SpG and SpRY variants in rice. *Science China Life Sciences*, 64(10), 1784–1787. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1883-5>
- Riaz, A., Kanwal, F., Ahmad, I., Ahmad, S., Farooq, A., Madsen, C. K., Brinch-Pedersen, H., Bekalu, Z. E., Dai, F., Zhang, G., & Alqudah, A. M. (2022). New hope for genome editing in cultivated grasses: CRISPR variants and application. *Frontiers in Genetics*, 13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.866121>
- Ryu, H., Laffont, C., Frugier, F., & Hwang, I. (2017). Map kinase-mediated negative regulation of symbiotic nodule formation in *Medicago truncatula*. *Molecules and Cells*, 40(1), 17–23. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.2211>
- Samac, D. A., & Austin-Phillips, S. (2006). Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 343, 301–311. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:301>
- Šamaj, J., Ovecka, M., Hlavacka, A., Lecourieux, F., Meskiene, I., Lichtscheidl, I., Lenart, P., Salaj, J., Volkmann, D., Bögre, L., et al. (2002). Involvement of the mitogen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth. *EMBO Journal*, 21(13), 3296–3306. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf349>
- Šamajová, O., Plíhal, O., Al-Yousif, M., Hirt, H., & Šamaj, J. (2013). Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. *Biotechnology Advances*, 31(1), 118–128. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.12.002>
- Samalova, M., Brzobohaty, B., & Moore, I. (2005). pOp6/LhGR: A stringently regulated and highly responsive dexamethasone-inducible gene expression system for tobacco. *Plant Journal*, 41(6), 919–935. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02341.x>
- Samalova, M., Kirchhelle, C., & Moore, I. (2019). Universal methods for transgene induction using the dexamethasone-inducible transcription activation system pOp6/LhGR in *Arabidopsis* and other plant species. *Current Protocols in Plant Biology*, 4(2). <https://doi.org/10.1002/cppb.20089>
- Samalova, M., & Moore, I. (2021). The steroid-inducible pOp6/LhGR gene expression system is fast, sensitive and does not cause plant growth defects in rice (*Oryza sativa*). *BMC Plant Biology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03241-w>
- Sentmanat, M. F., Peters, S. T., Florian, C. P., Connelly, J. P., & Pruett-Miller, S. M. (2018). A survey of validation strategies for CRISPR-Cas9 editing. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19441-8>
- Singha, D. L., Das, D., Sarki, Y. N., Chowdhury, N., Sharma, M., Maharana, J., & Chikkaputtaiah, C. (2022). Harnessing tissue-specific genome editing in plants through CRISPR/Cas system: current state and future prospects. *Planta*, 255(1). <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03811-0>
- Stukenberg, D., Hoff, J., Faber, A., & Becker, A. (2022). NT-CRISPR, combining natural transformation and CRISPR-Cas9 counterselection for markerless and scarless genome editing in *Vibrio natriegens*. *Communications Biology*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03150-0>
- Takeuchi, A., Ohnuma, M., Teramura, H., Asano, K., Noda, T., Kusano, H., Tamura, K., & Shimada, H. (2021). Creation of a potato mutant lacking the starch branching enzyme gene *stsbe3* that was generated by genome editing using the CRISPR/dMac3-Cas9 system. *Plant Biotechnology*, 38(3), 345–353. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.21.0727a>
- Tang, T., Yu, X., Yang, H., Gao, Q., Ji, H., Wang, Y., Yan, G., Peng, Y., Luo, H., Liu, K., et al. (2018). Development and validation of an effective CRISPR/Cas9 vector for efficiently isolating positive transformants and transgene-free mutants in a wide range of plant species. *Frontiers in Plant Science*, 871. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01533>
- Tena, G., Asai, T., Chiu, W.-L., & Sheen, J. (2001). Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(5), 392–400. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(00\)00191-6](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(00)00191-6)
- Thuronyi, B. W., Koblan, L. W., Levy, J. M., Yeh, W. H., Zheng, C., Newby, G. A., Wilson, C., Bhaumik, M., Shubina-Oleinik, O., Holt, J. R., et al. (2019). Continuous evolution of base editors with expanded target compatibility and improved activity. *Nature Biotechnology*, 1070–1079. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0193-0>

- Totomoch-Serra, A., Marquez, M. F., & Cervantes-Barragán, D. E. (2017). Sanger sequencing as a first-line approach for molecular diagnosis of Andersen-Tawil syndrome. *F1000Research*, 6. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11610.1>
- Tripathi, L., Ntui, V. O., Tripathi, J. N., Norman, D., & Crawford, J. (2023). A new and novel high-fidelity genome editing tool for banana using Cas-CLOVER. *Plant Biotechnology Journal*, 21(9), 1731–1733. <https://doi.org/10.1111/pbi.14100>
- Tsuda, K., Qi, Y., Nguyen, L. V., Bethke, G., Tsuda, Y., Glazebrook, J., & Katagiri, F. (2012). An efficient Agrobacterium-mediated transient transformation of Arabidopsis. *Plant Journal*, 69(4), 713–719. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04819.x>
- Tuteja, N., Verma, S., Sahoo, R. K., Raveendar, S., & Reddy, I. B. L. (2012). Recent advances in development of marker-free transgenic plants: Regulation and biosafety concern. *Journal of Biosciences*, 37(1), 167–197. <https://doi.org/10.1007/s12038-012-9187-5>
- Utomo, J. C., Hodgins, C. L., & Ro, D. K. (2021). Multiplex genome editing in yeast by CRISPR/Cas9 – a potent and agile tool to reconstruct complex metabolic pathways. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.719148>
- Varma Penmetsa, R., Uribe, P., Anderson, J., Lichtenzveig, J., Gish, J. C., Nam, Y. W., Engstrom, E., Xu, K., Sckisel, G., Pereira, M., et al. (2008). The Medicago truncatula ortholog of Arabidopsis EIN2, sickle, is a negative regulator of symbiotic and pathogenic microbial associations. *Plant Journal*, 55(4), 580–595. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03531.x>
- Vlad, D., Abu-Jamous, B., Wang, P., & Langdale, J. A. (2019). A modular steroid-inducible gene expression system for use in rice. *BMC Plant Biology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2038-x>
- Vossen, R. H. A. M., Aten, E., Roos, A., & Den Dunnen, J. T. (2009). High-resolution melting analysis (HRMA) - More than just sequence variant screening. *Human Mutation*, 30(6), 860–866. <https://doi.org/10.1002/humu.21019>
- Walton, R. T., Christie, K. A., Whittaker, M. N., & Kleinstiver, B. P. (2020). Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants. *Science (New York, N.Y.)*, 368(6488), 290–296. <https://doi.org/10.1126/science.aba8853>
- Wang, T., Zhang, H., & Zhu, H. (2019). CRISPR technology is revolutionizing the improvement of tomato and other fruit crops. *Horticulture Research*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0159-x>
- Wang, X., Ye, L., Lyu, M., Ursache, R., Löytynoja, A., & Mähönen, A. P. (2020). An inducible genome editing system for plants. *Nature Plants*, 6(7), 766–772. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0695-2>
- Wittwer, C. T., Reed, G. H., Gundry, C. N., Vandersteen, J. G., & Pryor, R. J. (2003). High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical chemistry*, 49(6 Pt 1), 853–860. <https://doi.org/10.1373/49.6.853>
- Wolabu, T. W., Cong, L., Park, J. J., Bao, Q., Chen, M., Sun, J., Xu, B., Ge, Y., Chai, M., Liu, Z., et al. (2020a). Development of a highly efficient multiplex genome editing system in outcrossing tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01063>
- Wolabu, T. W., Park, J. J., Chen, M., Cong, L., Ge, Y., Jiang, Q., Debnath, S., Li, G., Wen, J., & Wang, Z. (2020b). Improving the genome editing efficiency of CRISPR/Cas9 in Arabidopsis and Medicago truncatula. *Planta*, 252(2). <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03415-0>
- Wolabu, T. W., Mahmood, K., Jerez, I. T., Cong, L., Yun, J., Udvardi, M., Tadege, M., Wang, Z., & Wen, J. (2023). Multiplex CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of alfalfa FLOWERING LOCUS Ta1 (*MsFTa1*) leads to delayed flowering time with improved forage biomass yield and quality. *Plant Biotechnology Journal*, 21(7), 1383–1392. <https://doi.org/10.1111/pbi.14042>
- Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39(1), 75–85. <https://doi.org/10.2144/05391RV01>

- Xie, K., Minkenberg, B., & Yang, Y. (2015). Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(11), 3570–3575. <https://doi.org/10.1073/pnas.1420294112>
- Xing, H. L., Dong, L., Wang, Z. P., Zhang, H. Y., Han, C. Y., Liu, B., Wang, X. C., & Chen, Q. J. (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC plant biology*, *14*, 327. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0327-y>
- Xue, G. P., Way, H. M., Richardson, T., Drenth, J., Joyce, P. A., & McIntyre, C. L. (2011). Overexpression of TaNAC69 leads to enhanced transcript levels of stress up-regulated genes and dehydration tolerance in bread wheat. *Molecular Plant*, *4*(4), 697–712. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr013>
- Yang, S., Hu, Y., Cheng, Z., Rice, J. H., Miao, L., Ma, J., Hewezi, T., Li, Y., & Gai, J. (2019). An efficient Agrobacterium-mediated soybean transformation method using green fluorescent protein as a selectable marker. *Plant Signaling & Behavior*, *14*(7), 1612682. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1612682>
- Yau, Y. Y., & Stewart, C. N., Jr (2013). Less is more: strategies to remove marker genes from transgenic plants. *BMC biotechnology*, *13*, 36. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-36>
- Zafar, K., Sedeek, K. E. M., Rao, G. S., Khan, M. Z., Amin, I., Kamel, R., Mukhtar, Z., Zafar, M., Mansoor, S., & Mahfouz, M. M. (2020). Genome editing technologies for rice improvement: Progress, prospects, and safety concerns. *Frontiers in Genome Editing*, *2*, 5. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2020.00005>
- Zeng, Q., Sritubtim, S., & Ellis, B. E. (2011). AtMKK6 and AtMPK13 are required for lateral root formation in Arabidopsis. *Plant Signaling and Behavior*, *6*(10), 1436–1439. <https://doi.org/10.4161/psb.6.10.17089>
- Zhang, D., & Zhang, B. (2020). SpRY: Engineered CRISPR/Cas9 harnesses new genome-editing power. *Trends in Genetics*, *36*(8), 546–548. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.05.001>
- Zhang, K., Nie, L., Cheng, Q., Yin, Y., Chen, K., Qi, F., Zou, D., Liu, H., Zhao, W., Wang, B., et al. (2019). Effective editing for lysophosphatidic acid acyltransferase 2/5 in allotetraploid rapeseed (*Brassica napus* L.) using CRISPR-Cas9 system. *Biotechnology for Biofuels*, *12*(1). <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1567-8>
- Zhang, P., Du, H., Wang, J., Pu, Y., Yang, C., Yan, R., Yang, H., Cheng, H., & Yu, D. (2020). Multiplex CRISPR/Cas9-mediated metabolic engineering increases soya bean isoflavone content and resistance to soya bean mosaic virus. *Plant Biotechnology Journal*, *18*(6), 1384–1395. <https://doi.org/10.1111/pbi.13302>
- Zhang, T., Mudgett, M., Rambabu, R., Abramson, B., Dai, X., Michael, T. P., & Zhao, Y. (2021). Selective inheritance of target genes from only one parent of sexually reproduced F1 progeny in Arabidopsis. *Nature Communications*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24195-5>
- Zhang, Z., Mao, Y., Ha, S., Liu, W., Botella, J. R., & Zhu, J. K. (2016). A multiplex CRISPR/Cas9 platform for fast and efficient editing of multiple genes in Arabidopsis. *Plant Cell Reports*, *35*(7), 1519–1533. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1900-z>
- Zhao, M., Wang, T., Wu, P., Guo, W., Su, L., Wang, Y., Liu, Y., Yan, F., & Wang, Q. (2017). Isolation and characterization of GmMYBJ3, an R2R3-MYB transcription factor that affects isoflavonoids biosynthesis in soybean. *PLoS ONE*, *12*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179990>
- Zhou, C., Han, L., Pislariu, C., Nakashima, J., Fu, C., Jiang, Q., Quan, L., Blancaflor, E. B., Tang, Y., Bouton, J. H., et al. (2011). From model to crop: Functional analysis of a stay-green gene in the model legume *Medicago truncatula* and effective use of the gene for alfalfa improvement. *Plant Physiology*, *157*(3), 1483–1496. <https://doi.org/10.1104/pp.111.185140>
- Zhou, L., Errigo, R. J., Lu, H., Poritz, M. A., Seipp, M. T., & Wittwer, C. T. (2008). Snapback primer genotyping with saturating DNA dye and melting analysis. *Clinical Chemistry*, *54*(10), 1648–1656. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.107615>

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

5S rRNA	zložka veľkej ribozomálnej podjednotky ribozómu
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ACC	aminocyklopropán-1-karboxylová kyselina
<i>AtU6</i>	promótor RNA polymerázy III z <i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	adenozin trifosfát
bp	bázové páry
Cas9	CRISPR-asociovaná nukleáza 9
cDNA	komplementárna DNA
CRISPR	úseky pozostávajúce z krátkych palindromatických repetitívnych sekvencií pravidelne usporiadaných v klastroch
crRNA	CRISPR RNA
Csy4	exogénna endoribonukleáza
dNTP	deoxyribonukleozidtrifosfát
DSB	dvojláknové zlomy DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>G7</i>	sekvencia polyadenylačného signálu z génu 7 v <i>A. tumefaciens</i>
<i>GAL4</i>	transkripčná aktivačná doména zo <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
GFP	zelený fluorescenčný proteín
GR	doména glukokortikoidového receptora izolovaného z potkana
<i>GR-LhG4</i>	časť indukibilného systému
HSP90	proteín teplotného šoku
KO	vyradenie z funkcie
<i>M. sativa</i>	<i>Medicago sativa</i>
<i>M. truncatula</i>	<i>Medicago truncatula</i>
MAPK	mitogénom aktivovaná proteín kináza
MAPKK/MAP2K	mitogénom aktivovaná proteín kináza kináza
MAPKKK/MAP3K	mitogénom aktivovaná proteín kináza kináza kináza
mCherry	fluorescenčná značka
MMK2, 3	Medicago mitogénom aktivovaná proteín kináza 2, 3
MPK 1	MAP kináza 1
mRNA	mediátorová RNA
NHEJ	nehomologická oprava koncových častí DNA

<i>NLS</i>	jadrová lokalizačná sekvencia
<i>NOS</i>	gén nopalín syntázy
OMTK1	oxidatívny stresom aktivovaná MAPKKK1
PAGE	polyakrylamidová gélová elektroforéza
PAM	protospaceru priľahlý motív
PCR	polymerázová reťazová reakcia
pDNA	plazmidová DNA
PEG	polyetylén glykol
polyA	polyadenylový chvost
<i>pOp</i>	operátor
PTM	posttranslačné modifikácie
RB/LB	pravá/ľavá hranica T-DNA
RE	restrikčný enzým
<i>recA1</i>	rekombináza A1 v <i>E. coli</i>
RNAi	RNA interferencia
ROS	reaktívne formy kyslíka
RPM	otáčky za minútu
RSY	kultivar <i>M. sativa</i> Regen SY
SAMK	stresom aktivovaná MAPK
SIMK	stresom indukovaná MAPK
SIMKK	stresom indukovaná MAPK kináza
SNP	jednonukleotidový polymorfizmus
STU	systém pozostávajúci z 1 transkripčnej jednotky
<i>T2A</i>	translačná vírusová sekvencia kódujúca samoštiepiace peptidy
TALEN	efektorové nukleázy podobné transkripčnému aktivátoru
T-DNA	transferová DNA
tracrRNA	trans-aktivujúca RNA
<i>tRbcS (E9)</i>	terminátor malej podjednotky ribulóza-1,5-bisfosfát-karboxylázy z <i>Pisum sativum</i>
tRNA	transferová RNA
TTU	systém skladajúci sa z dvoch transkripčných jednotiek
<i>U6</i>	promótor RNA polymerázy III
<i>UBQ10</i>	promótor génu <i>UBIQUITIN 10</i> z <i>A. thaliana</i>
ZFN	nukleáza so zinkovým prstom

9 PRÍLOHY

Príloha č.1: Vyhodnotenie „off-targetov“ gRNA1 pre mutagenézu génu *MMK3*.

gRNA1: ATTCCTCCTCTTCAACCCGT CGG					
„off“ skóre	počet nezhôd („mismatch “)	sekvencia s vyznačenou nezhodou	lokus	označenie génu	oblasť
1.000	0	ATTCCTCCTCTTC AACCCGT CGG	chr4.1:-37990454	MS.gene08564	CDS
1.000	0	ATTCCTCCTCTTC AACCCGT CGG	chr4.4:-43627537	MS.gene049834	CDS
1.000	0	ATTCCTCCTCTTC AACCCGT CGG	chr4.3:-41082116	MS.gene65257	CDS
0.800	2	TTT TCCTCTTC AACCCGT TGG	chr1.2:-17283403	-	mimo génu
0.800	2	TTT TCCTCTTC AACCCGT TGG	chr3.1:-26057046	-	mimo génu
0.800	2	TTT TCCTCTTC AACCCGT TGG	chr3.2:-24188426	-	mimo génu
0.800	2	TTT TCCTCTTC AACCCGT TGG	chr3.3:-26102655	-	mimo génu
0.800	2	TTT TCCTCTTC AACCCGT TGG	chr7.1:-52659888	-	mimo génu
0.800	2	TTT TCCTCTTC AACCCGT TGG	chr3.4:-26910304	-	mimo génu
0.800	2	TTT TCCTCTTC AACCCGT TGG	chr6.1:+75506933	-	mimo génu
0.800	2	TTT TCCTCTTC AACCCGT TGG	chr6.2:+84914918	-	mimo génu
0.800	2	TTT TCCTCTTC AACCCGT TGG	chr4.4:+8086652	-	mimo génu
0.800	2	TTT TCCTCTTC AACCCGT TGG	chr3.3:+20273334	-	mimo génu
0.800	2	TTT TCCTCTTC AACCCGT TGG	chr4.2:+8676584	-	mimo génu
0.800	2	TTT TCCTCTTC AACCCGT TGG	chr3.2:+18997897	-	mimo génu
0.538	4	TTT TCCT TTT C AACCC ATTGG	chr7.2:-53065241	-	mimo génu
0.525	4	TTT TC TTCA TC AACCCGT TGG	chr4.2:+66677564	-	mimo génu
0.377	3	TTA CTCCTCTTC AACCC CTTGG	chr2.4:-26520102	-	mimo génu
0.317	4	AATCA TCTTCATC AACCCGT AGG	chr6.1:+19548262	-	mimo génu
0.188	4	ATTCCTCCTCT GT AA ACAGT AGG	chr7.4:-19603631	-	mimo génu

CDS – „coding sequence“, kódujúca sekvencia; chr – chromozóm; „mismatch“ – nezhoda nukleotidov; MS – *Medicago sativa*; „off“ skóre – pravdepodobnosť „off target“, zacielenia mimo záujmu. Červenou farbou sú vyznačené nezhody nukleotidov; zelenou farbou je vyznačená PAM sekvencia („protospacer adjacent motif“, protospaceru príľahlý motív).

Príloha č. 2: Vyhodnotenie „off targetov“ gRNA216 pre mutagenézu génu *MMK3*.

gRNA216: GAGTTTGCTTTCTCAGATTCAGG					
off skóre	počet nezhôd (mismatch)	sekvencia s vyznačenou nezhodou	lokus	označenie génu	oblasť
1.000	0	GAGTTTGCTTTCT CAGATTCAGG	chr4.1:+37990567	MS.gene08564	CDS
1.000	0	GAGTTTGCTTTCT CAGATTCAGG	chr4.4:+43627650	MS.gene049834	CDS
1.000	0	GAGTTTGCTTTCT CAGATTCAGG	chr3.4:+26910382	-	mimo génu
1.000	0	GAGTTTGCTTTCT CAGATTCAGG	chr3.2:+24188501	-	mimo génu
1.000	0	GAGTTTGCTTTCT CAGATTCAGG	chr3.1:+26057124	-	mimo génu
1.000	0	GAGTTTGCTTTCT CAGATTCAGG	chr7.2:+53066224	-	mimo génu
1.000	0	GAGTTTGCTTTCT CAGATTCAGG	chr7.1:+52660871	-	mimo génu
1.000	0	GAGTTTGCTTTCT CAGATTCAGG	chr3.3:+26102733	-	mimo génu
1.000	0	GAGTTTGCTTTCT CAGATTCAGG	chr4.3:+41082229	MS.gene65257	CDS
1.000	0	GAGTTTGCTTTCT CAGATTCAGG	chr1.2:+17283481	-	mimo génu
1.000	0	GAGTTTGCTTTCT CAGATTCAGG	chr4.4:-8086574	-	mimo génu
1.000	0	GAGTTTGCTTTCT CAGATTCAGG	chr4.2:-8676506	-	mimo génu
1.000	0	GAGTTTGCTTTCT CAGATTCAGG	chr3.2:-18997819	-	mimo génu
1.000	0	GAGTTTGCTTTCT CAGATTCAGG	chr6.2:-84914840	-	mimo génu
1.000	0	GAGTTTGCTTTCT CAGATTCAGG	chr6.1:-75506855	-	mimo génu
1.000	0	GAGTTTGCTTTCT CAGATTCAGG	chr3.3:-20273256	-	mimo génu
0.430	4	CAGTTTCTTTTCT CAAATTCGGG	chr5.4:+44272903	MS.gene053835	CDS
0.430	4	CAGTTTCTTTTCT CAAATTCGGG	chr5.3:+44739546	MS.gene64620	CDS
0.430	4	CAGTTTCTTTTCT CAAATTCGGG	chr5.2:+48099359	MS.gene65666	CDS
0.344	3	TATTTTCCTTTCT CAGATTCGG	chr4.4:-47070131	-	mimo génu

CDS – „coding sequence“, kódujúca sekvencia; chr – chromozóm; „mismatch“ – nezhoda nukleotidov; MS – *Medicago sativa*; „off“ skóre – pravdepodobnosť „off target“, zacielenia mimo záujmu. Červenou farbou sú vyznačené nezhody nukleotidov; zelenou farbou je vyznačená PAM sekvencia („protospacer adjacent motif“, protospaceru príľahlý motív).

Príloha č. 3: Vyhodnotenie off targetov gRNA63 pre mutagenézu génu *MMK3*.

gRNA63: ACGAACTCAGATACGAATGAAGG					
off skóre	počet nezhôd (mismatch)	sekvencia s vyznačenou nezhodou	lokus	označenie génu	oblasť
0.667	1	ACGAACTC GG GATA CGAATGAAGG	chr3.2:-21009406	-	mimo génu
0.667	1	ACGAACTC GG GATA CGAATGAAGG	chr7.1:-52659745	-	mimo génu
0.667	1	ACGAACTC GG GATA CGAATGAAGG	chr1.2:-17283260	-	mimo génu
0.667	1	ACGAACTC GG GATA CGAATGAAGG	chr5.4:-24655988	-	mimo génu
0.667	1	ACGAACTC GG GATA CGAATGAAGG	chr7.2:-53065098	-	mimo génu
0.667	1	ACGAACTC GG GATA CGAATGAAGG	chr3.2:-24188283	-	mimo génu
0.667	1	ACGAACTC GG GATA CGAATGAAGG	chr3.3:-26102512	-	mimo génu
0.667	1	ACGAACTC GG GATA CGAATGAAGG	chr4.1:-37990311	MS.gene08564	CDS
0.667	1	ACGAACTC GG GATA CGAATGAAGG	chr4.4:-43627394	MS.gene049834	CDS
0.667	1	ACGAACTC GG GATA CGAATGAAGG	chr3.4:-26910161	-	mimo génu
0.667	1	ACGAACTC GG GATA CGAATGAAGG	chr3.4:-35775046	-	mimo génu
0.667	1	ACGAACTC GG GATA CGAATGAAGG	chr6.1:+75507076	-	mimo génu
0.667	1	ACGAACTC GG GATA CGAATGAAGG	chr6.2:+84915061	-	mimo génu
0.667	1	ACGAACTC GG GATA CGAATGAAGG	chr3.3:+20273477	-	mimo génu
0.667	1	ACGAACTC GG GATA CGAATGAAGG	chr6.3:+32440162	-	mimo génu
0.667	1	ACGAACTC GG GATA CGAATGAAGG	chr2.3:+17411884	-	mimo génu
0.667	1	ACGAACTC GG GATA CGAATGAGGG	chr3.1:-26056903	-	mimo génu
0.583	2	ACGAACT TG GATA CGAATGAAGG	chr4.2:+8676727	-	mimo génu
0.583	2	ACGAACT TG GATA CGAATGAAGG	chr4.4:+8086795	-	mimo génu
0.571	1	ACGAACTC CG GATA CGAATGAAGG	chr4.3:-41081973	MS.gene65257	CDS

CDS – „coding sequence“, kódujúca sekvencia; chr – chromozóm; „mismatch“ – nezhoda nukleotidov; MS – *Medicago sativa*; „off“ skóre – pravdepodobnosť „off target“, zacielenia mimo záujmu. Červenou farbou sú vyznačené nezhody nukleotidov; zelenou farbou je vyznačená PAM sekvencia („protospacer adjacent motif“, protospaceru priľahlý motív).

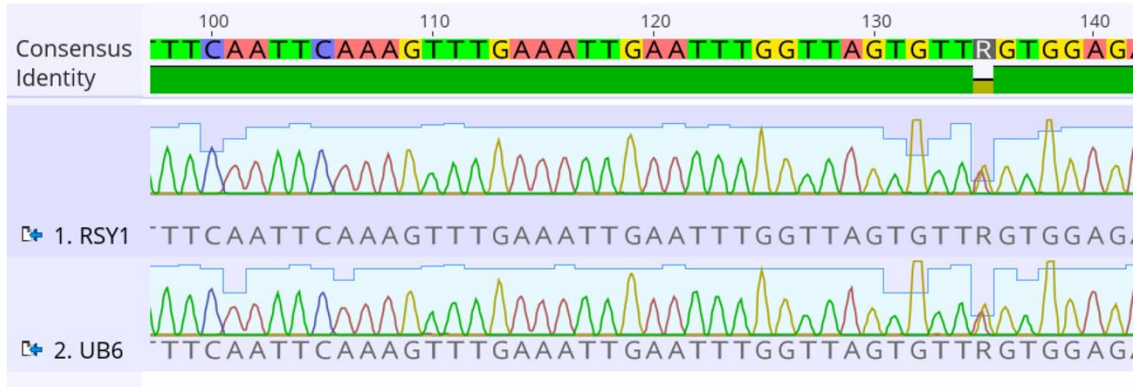
Príloha č. 4: Vyhodnotenie off targetov gRNA50 pre mutagenézu génu *MMK3*.

gRNA50: TGTCATGAAGTCTGTCTCAGAGG					
off skóre	počet nezhôd (mismatch)	sekvencia s vyznačenou nezhodou	lokus	označenie génu	oblasť
1.000	0	TGTCATGAAGTC TGTCTCAGAGG	chr4.3:+41079082	MS.gene65257	CDS
1.000	0	TGTCATGAAGTC TGTCTCAGAGG	chr4.4:+43624556	MS.gene049834	CDS
1.000	0	TGTCATGAAGTC TGTCTCAGAGG	chr4.1:+37987476	MS.gene08564	CDS
0.542	4	TGTCATAAATCCT GTATCAGGGG	chr3.1:+33472170	-	mimo génu
0.542	4	TGTCATAAATCCT GTATCAGGGG	chr3.4:+42235912	-	mimo génu
0.542	4	TGTCATAAATCCT GTATCAGGGG	chr3.2:+39475726	-	mimo génu
0.522	4	TGTCATAAATTCT GTATTAGGGG	chr1.4:+31497829	-	mimo génu
0.522	4	TGTCATAAATTCT GTATTAGGGG	chr7.3:-37339733	-	mimo génu
0.398	4	TTTCATAAGGTCT GTCTCAACGG	chr4.2:-8594791	-	mimo génu
0.172	4	GATCATGAAGTC AGTTTCAGTGG	chr5.2:-41094667	MS.gene62115	CDS
0.172	4	GATCATGAAGTC AGTTTCAGTGG	chr5.4:-39114840	-	mimo génu
0.157	4	TCTCACGAATTCT GTTTCAGTGG	chr4.3:+47368844	-	mimo génu
0.142	4	TGTTCTGAAGCCT GTCACAGGGG	chr5.2:+64700164	-	mimo génu
0.132	4	GGTCATGAAGGC TGTCTTTGGGG	chr5.3:-43121318	-	mimo génu
0.132	4	GGTCATGAAGGC TGTCTTTGGGG	chr5.4:-42507553	-	mimo génu
0.128	4	TTGCATGAAGAT TGTCTCAGAGG	10656:+11170	MS.gene065161	CDS
0.128	4	TTGCATGAAGAT TGTCTCAGAGG	chr1.4:+84141039	MS.gene029436	CDS
0.128	4	TTGCATGAAGAT TGTCTCAGAGG	10655:+12917	MS.gene065163	CDS
0.128	4	TTGCATGAAGAT TGTCTCAGAGG	10654:+7400	MS.gene029438	CDS
0.128	4	TTGCATGAAGAT TGTCTCAGAGG	10653:+8823	MS.gene029437	CDS

CDS – „coding sequence“, kódujúca sekvencia; chr – chromozóm; „mismatch“ – nezhoda nukleotidov; MS – *Medicago sativa*; „off“ skóre – pravdepodobnosť „off target“, zacielenia mimo záujmu. Červenou farbou sú vyznačené nezhody nukleotidov; zelenou farbou je vyznačená PAM sekvencia („protospacer adjacent motif“, protospaceru príľahlý motív).

Príloha č. 5: Reprezentatívny výsledok Sangerovho sekvenovania prvého exónu génu *MMK3*. RSY1: úsek exónu 1 génu *MMK3* v kontrolnej rastline; UB6: úsek exónu 1 génu *MMK3* v transgénej rastline s označením UB6, v ktorej je CRISPR-KO systém zacielený na tento gén. **(A)** Optimálny výsledok sekvenačnej analýzy. **(B)** Výsledok sekvenačnej analýzy obdržaný vo väčšine prípadov, ktorý nemožno vyhodnotiť z dôvodu odlišných nukleotidových sekvencií súčasne analyzovaných štyroch alel.

A



B

