

## 9. Přílohy

### Příloha 1: PCR pro stanovení genotypu rostlin

Tabulka byla upravena podle protokolu (PCR Protocol for Taq DNA Polymerase with standard Taq Buffer (New England Biolabs® Inc.).

A. PCR pro stanovení genotypu rostlin		Cyklus		
Chemikálie	1 reakce (μl)	Teplota	Čas	Opakování
ddH <sub>2</sub> O	14,88	95 °C	2 min	35×
10x Mercí reakční pufr	2	95 °C	10 s	
10 mM dNTP	0,4	T <sub>an</sub>	30 s	
10 μM přímý primer	0,8	68 °C	30 s	
10 μM reverzní primer	0,8	68 °C	5 min	
DNA templát	1	4 °C		
DNA polymeráza Taq Mercíáza	0,12			
Objem reakce	20			

  

B. Primery použité ke stanovení genotypu				
Gen	Název	Sekvence primeru (5' - 3')	Délka amplifikovaného úseku	Teplota nasedání primerů (T <sub>an</sub> )
ALBA10	A10seq_F	GTACAACGAGGGCTCTTC	542 bp	46
	A10seq_R	CTGTAAAGTATAACGCCTAGATTAC		
ALBA20	A20seq_F	CCTTAGTTTCCATCGCTGG	473 bp	48
	A20seq_R	TTGAATAGCAAGCAGCGAG		
ALBA30	A30seq_F	TACTATCGGCCTTTCCCG	440 bp	49
	A30seq_R	CCGTACAACAGAGTAGCCG		
ALBA50	A50seq_F	CTGAGTTAGATTCAATGGAAGAG	429 bp	46
	A50seq_R	GCTGCAITGACCTCTGTAAAC		
ALBA60	A60seq_F	CCCGATTTCCATAACCGG	392 bp	48
	A60seq_R	GAGACTTTGGACTGGATTAC		
DAN1	D1seq_F	CGTTAAGCGTCGTAACGG	433 bp	46
	D1seq_R	AGCGAATCTCGAACTCTAG		
Cas9	Cas9seq_F	AGAAGTACGGCGGGTTCGACAGC	486 bp	60
	Cas9seq_R	GGACCTTATCCAGATTTCGCGTCGGC		
Hygromycin	Hyg_F	GGAATCGGTCAATACACTAC	611 bp	56
	Hyg_R	CTCTATTTCTTTGCCCTCGG		

**Příloha 2: Primery použité k amplifikaci sekvencí ALBA z cDNA a dalších sekvencí a jejich následné domestikaci metodou GoldenBraid 3.0**

Gen/fragment	Název primeru	Sekvence primeru (5' – 3')
ALBA 10	GBA10_C1F	GCGCCGTCTCGCTCGAATGATGGATAAGTATCAACGAGTGG
	GBA10_C1R	GCGCCGTCTCGCTCACGAAgcAGCAGCTGCCTGGACTGGTG
ALBA 20	GBA20_C1F	GCGCCGTCTCGCTCGAATGATGGATAAGTATCAGAGAGTTGAG
	GBA20_cDNA1R	GCGCCGTCTCGTTGTCTCAATTGTTTGAAGGCC
	GBA20_cDNA2F	GCGCCGTCTCGACAACGAGGCATGTGTTCGAT
	GBA20_C2R	GCGCCGTCTCGCTCACGAAGCTGCAGCAGCCTGGATAGG
ALBA 50	GBA50_C1F	GCGCCGTCTCGCTCGAATGATGGAAGAGATCACGGAAGG
	GBA50_C1R	GCGCCGTCTCGCTCACGAAgcGTTTTGCTCTTGGGCTTC
ALBA 60	GBA60_C1F	GCGCCGTCTCGCTCGAATGATGGAAGAGATCACCGATGG
	GBA60_C1R	GCGCCGTCTCGCTCACGAAGCGTTCTGCACCTGAGCTTC
DAN 1	GBD1_C1F	GCGCCGTCTCGCTCGAATGATGGCGATGGAAGTAGCAAC
	GBD1_C1R	GCGCCGTCTCGCTGTCTCTGCACTGGCTTCC
	GBD1_C2FN	GCGCCGTCTCGACAGAAGCTTCCGTGGAAGCACAAAGAAGAAGTT GCCGCTGCCACCGAGGTCGCTTCGTGAGCGAGACGGCGC
	GBD1_C2RN	GCGCCGTCTCGCTCACGAAGCGACCTCGGTGGCAGCGGCAACTT CTTCTTGCTTCCACGGAAGCTTCTGTGAGACGGCGC
	GBD1_C2R	GCGCCGTCTCGCTCACGAAGCGGCTTCGTTTTGGTTACT
nYFP	nYFP_F	GCGCCGTCTCGCTCGTTTCGATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
	nYFP_R	GCGCCGTCTCGCTCAAAGCTCAGGCCATGATATAGACGTT
	nYFPeds_F	GCGCCGTCTCGCTCGAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT
cYFP	cYFP_F	GCGCCGTCTCGCTCGTTTCGATGGACAAGCAGAAGAACGG
	cYFP_R	GCGCCGTCTCGCTCAAAGCCTACTTGTACAGCTCGTCCA
	cYFPeds_F	GCGCCGTCTCGCTCGAATGGACAAGCAGAAGAACGGCAT
bZIP34	bZIP34_1_F	GCGCCGTCTCGCTCGAATGGCACAACTCCCTCCTAAAATC
	bZIP34_2_R	GCGCCGTCTCGCTCACGAAGCTGAGACATTGAGGAGCTG
bZIP52	bZip52_F	GCGCCGTCTCGCTCGAATGATGGAGAAATCAGATCCTCCA
	bZip52_R	GCGCCGTCTCGCTCACGAAGCATAGGCAGAGCTACTCTC

**Příloha 3: Tabulka sekvencí gDNA a jejich cílů**

Název	Sekvence gDNA 5' – 3' (bez PAM)	Cíl
gDNA ALBA10	TCGTATCACTAGTCAAGGCA	ALBA10
gDNA ALBA20	CGAATCTCATTCTCAGCAAT	ALBA20
gDNA ALBA30	GAGATCCGTATCACCAGTAA	ALBA30
gDNA ALBA50	AGATTGACGTAGAAGAACAA	ALBA50
gDNA ALBA60	CCGTTTTTCTTCTGCGAAT	ALBA60
gDNA DAN1	GGCTCCGGCACCAATCCCAT	DAN1
gDNA RPP25	CTATGCGATGACTCTTCTTC	ALBA10, ALBA20
gDNA Rpp20	GAACAATGGTTTCTTAGTGT	ALBA50, ALBA60

**Příloha 4: Amplifikace sekvencí ALBA z cDNA a dalších sekvencí ke klonování metodou GoldenBraid 3.0**

**A. Testovací PCR s polymerázou Taq Merciaza**

Protokol byl upraven podle PCR Protocol for Taq DNA Polymerase with Standard Taq Buffer, New England Biolabs® Inc.).

Chemikálie	1x (μl)	Cyklus		
		Teplota	Čas	Opakování
ddH <sub>2</sub> O	15,08	95°C	2 min	30×
10x Mercí reakční pufr	2	95°C	10s	
10 mM dNTP	0,4	T <sub>an-M</sub>	30 s	
10 μM přímý primer	0,8	68 °C	2 min	
10 μM reverzní primer	0,8	68 °C	5 min	
cDNA templát	0,8	4 °C		
DNA polymeráza Taq Merciaza	0,12			
Objem reakce	20			

**B. PCR s DNA polymerázou Phusion®**

Tabulka pro namnožení požadovaných úseků ke klonování pomocí DNA polymerázy Phusion® (upraveno podle protokolu: PCR Protocol for Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (M0530), New England Biolabs® Inc.).

Chemikálie	ALBA50, ALBA60, DAN1, 1x (μl)	ALBA10, ALBA20, 1x (μl)	Cyklus		
			Teplota	Čas	Opakování
ddH <sub>2</sub> O	13	12,5	98 °C	2 min	30×
5x pufr Phusion HF	4	4	98 °C	10 s	
10 mM dNTP	0,4	0,4	T <sub>an</sub>	30 s	
10 μM přímý primer	0,8	0,8	72 °C	T <sub>el</sub>	
10 μM reverzní primer	0,8	0,8	72 °C	5 min	
50 mM Chlorid hořečnatý	-	0,5	4 °C		
cDNA templát	0,8	0,8			
DNA polymeráza Phusion	0,2	0,2			
Objem reakce	20	20			

Amplifikovaný fragment		Kombinace primerů	T <sub>an</sub>	T <sub>el</sub>	T <sub>an-M</sub>
ALBA10	cDNA	GBA10_C1F + GBA10_C1R	66 °C	40 s	58 °C
ALBA20	cDNA	GBA20_C1F + GBA20_C2R	66 °C	40 s	55 °C
	Fragment 1	GBA20_C1F + GBA20_cDNA1R	66 °C	20 s	
	Fragment 2	GBA20_cDNA2F + GBA20_C2R	66 °C	20 s	
ALBA50	cDNA	GBA50_C1F + GBA50_C1R	60 °C	30 s	55 °C
ALBA60	cDNA	GBA60_C1F + GBA60_C1R	60 °C	30 s	55 °C
DAN1	cDNA	GBD1_C1F + GBD1_C2R	66 °C	30 s	55 °C
	Fragment 1	GBD1_C1F + GBD1_C1R	66 °C	20 s	
nYFP	C-terminální fúze	nYFP_F + nYFP_R	57 °C	20 s	59 °C
	cds	nYFPcds_F + nYFP_R	57 °C	20 s	62 °C
cYFP	C-terminální fúze	cYFP_F + cYFP_R	59 °C	20 s	52 °C
	cds	cYFPcds_F + cYFP_R	59 °C	20 s	56 °C
bZIP34	vektor	bZIP34_1_F + bZIP34_2_R	59 °C	40 s	54 °C
bZIP52	vektor	bZIP52_F + bZIP52_R	58 °C	40 s	53 °C

DAN1 Fragment 2 – GBD1\_C2FN + GBD1\_C2RN, primery byly po smísení zahřáty na 95 °C po dobu 5 minut a po ochlazení na pokojovou teplotu byly přidány do ligační reakce.

**Příloha 5: Seznam sekvencí domestikovaných do vektoru pUPD2**

Seznam všech konstruktů vzniklých domestikací sekvencí do vektoru pUPD2. V posledních dvou sloupcích jsou uvedeny konkrétní restriční enzymy použité k ověření vektorů a jim odpovídající reakční pufr. T – Tango, 2x T – dvojnásobek standardního množství pufru Tango, O – Orange, R – Red.

Code	Construct name	Back-bone	Insert	Prefix -Suffix	Gene	Restriction enzyme(s)	Buffer
H1-1	pUPD2::c-nYFP	pUPD2	c-nYFP	TTCG-GCTT	N-terminal fragment YFP	PstI + XhoI	R
H1-2	pUPD2::c-cYFP	pUPD2	c-cYFP	TTCG-GCTT	C-terminal fragment YFP	BsrGI + AvaI	T
H1-3	pUPD2::bZip52	pUPD2	bZip52	AATG-TTCG	bZip52 cds	EcoRV	R
H1-4	pUPD2::bZip34	pUPD2	bZip34	AATG-TTCG	bZip34 cds	AvaI	T
H1-5	pUPD2::nYFP	pUPD2	nYFP	AATG-GCTT	N-terminal fragment YFP	PstI + XhoI	R
H1-6	pUPD2::cYFP	pUPD2	cYFP	AATG-GCTT	C-terminal fragment YFP	BsrGI + AvaI	T
H1-7	pUPD2::ALBA10cds	pUPD2	ALBA10cds	AATG-TTCG	cDNA Alba10 from inflorescence	BcuI	T
H1-8	pUPD2::ALBA20cds	pUPD2	ALBA20cds	AATG-TTCG	cDNA Alba20 from inflorescence	NcoI	T
H1-9	pUPD2::ALBA50cds	pUPD2	ALBA50cds	AATG-TTCG	cDNA Alba50 from inflorescence	EcoRV + EcoRI	2x T
H1-10	pUPD2::ALBA60cds	pUPD2	ALBA60cds	AATG-TTCG	cDNA Alba60 from inflorescence	PstI + EcoRI	O
H1-11	pUPD2::DAN1cds	pUPD2	DAN1cds	AATG-TTCG	cDNA Dan1 from inflorescence	BglII + XhoI	O

**Příloha 6: Ligace a restriční analýza konstruktů****A. Ligační reakce**

Protokol byl upraven podle GoldenGate assembly protocol uvedeného na webové stránce <https://j5.jbei.org/j5manual/pages/81.html>.

Chemikálie	1 reakce	Cyklus		
		Teplota	Čas	Opakování
ddH <sub>2</sub> O	do 10 µl	37 °C	10 min	
10x T4 Reakční pufr	1 µl	37 °C	2 min	
Vektor	75 / 100 ng	16 °C	5 min	45x
Insert (1-n)	75 / 100 ng*	37 °C	30 min	
Restriční enzym (BsmBI, BsaI)	0,5 µl	65 °C	15 min	
T4 ligáza	0,6 µl	4 °C		
Objem reakce	10 µl			

\* Množství 75 / 100 ng platí pouze při klonování segmentu vyštěpením z vektoru. Při domestikaci samostatných sekvencí do vektoru pUPD2 je výsledné množství jednotlivých segmentů vkládaných do vektoru přepočteno na jejich délku podle vzorce: délka inzertu (kb) × množství vektoru (ng) / velikost vektoru (kb) = množství segmentu.  
n = počet vkládaných segmentů

**B. Restriční analýza**

Chemikálie	1 reakce
ddH <sub>2</sub> O	do 10 µl
10x Reakční pufr	1 µl
Konstrukt	300 ng
Restriční enzym	0,5 µl
Objem reakce	10 µl

Použité enzymy a pufr jsou uvedeny v seznamech připravených konstruktů. Inkubace probíhala při 37 °C po dobu jedné hodiny a následně byly enzymy inaktivovány při teplotě 65 či 80 °C (konkrétní teplotu pro daný enzym lze zjistit např. na [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)),

**Příloha 7: Seznam klonovaných transkripčních jednotek ve vektorech Alpha**

Seznam všech transkripčních jednotek klonovaných do vektorů Alpha ( $\alpha$ ). V posledních dvou sloupcích jsou uvedeny konkrétní restriční enzymy použité k ověření vektorů a jim odpovídající reakční pufr. T – Tango, O – orange.

Code	Construct name	backbone	insert	Prefix -Suffix	Restriction enzyme(s)	Buffer
H2-1	$\alpha$ 13::mCherry (H9)	pDGB3 $\alpha$ 13	pCsVMV::mCherry:nosT	GGAG-CCAT	SspI + AvaI	T
H2-2	$\alpha$ 11::YFP (E9)	pDGB3 $\alpha$ 11	pCsVMV::YFP:nosT	GGAG-CCAT	AseI + BsrGI	T
H2-3	$\alpha$ 11::nYFP	pDGB3 $\alpha$ 11	pCsVMV::nYFP:nosT	GGAG-CCAT	PstI + BglII	O
H2-4	$\alpha$ 12::cYFP	pDGB3 $\alpha$ 12	pCsVMV::cYFP:nosT	CCAT-GCTT	BsrGI + AseI	T
H2-5	$\alpha$ 11::bZip52	pDGB3 $\alpha$ 11	pCsVMV::bZip52::c-nYFP:nosT	GGAG-CCAT	PstI + AseI	
H2-6	$\alpha$ 12::bZip34	pDGB3 $\alpha$ 12	pCsVMV::bZip34::c-cYFP:nosT	CCAT-GCTT	BsrGI	T
H2-7	$\alpha$ 11::Alba10	pDGB3 $\alpha$ 11	pCsVMV::ALBA10cds::c-nYFP:nosT	GGAG-CCAT	BspTI + NdeI	O
H2-8	$\alpha$ 11::Alba20	pDGB3 $\alpha$ 11	pCsVMV::ALBA20cds::c-nYFP:nosT	GGAG-CCAT	BspTI + NdeI	O
H2-9	$\alpha$ 11::Alba30	pDGB3 $\alpha$ 11	pCsVMV::ALBA30cds::c-nYFP:nosT	GGAG-CCAT	AvaI + ApaLI	T
H2-10	$\alpha$ 11::Alba50	pDGB3 $\alpha$ 11	pCsVMV::ALBA50cds::c-nYFP:nosT	GGAG-CCAT	PstI + BglI	O
H2-11	$\alpha$ 11::Alba60	pDGB3 $\alpha$ 11	pCsVMV::ALBA60cds::c-nYFP:nosT	GGAG-CCAT	PstI + BglI	O
H2-12	$\alpha$ 11::Dan1	pDGB3 $\alpha$ 11	pCsVMV::DAN1cds::c-nYFP:nosT	GGAG-CCAT	BglII	O
H2-13	$\alpha$ 12::Alba10	pDGB3 $\alpha$ 12	pCsVMV::ALBA10cds::c-cYFP:nosT	CCAT-GCTT	BsrGI + HincII	T
H2-14	$\alpha$ 12::Alba20	pDGB3 $\alpha$ 12	pCsVMV::ALBA20cds::c-cYFP:nosT	CCAT-GCTT	BspTI + NdeI	O
H2-15	$\alpha$ 12::Alba30	pDGB3 $\alpha$ 12	pCsVMV::ALBA30cds::c-cYFP:nosT	CCAT-GCTT	AvaI + ApaLI	T
H2-16	$\alpha$ 12::Alba50	pDGB3 $\alpha$ 12	pCsVMV::ALBA50cds::c-cYFP:nosT	CCAT-GCTT	BsrGI + SspI	T
H2-17	$\alpha$ 12::Alba60	pDGB3 $\alpha$ 12	pCsVMV::ALBA60cds::c-cYFP:nosT	CCAT-GCTT	BsrGI + AseI	T
H2-18	$\alpha$ 12::Dan1	pDGB3 $\alpha$ 12	pCsVMV::DAN1cds::c-cYFP:nosT	GCTT-GGTA	BspTI + BglII	O

**Příloha 8: Seznam často užívaných primerů pro ověření vektorů**

Název	Sekvence	Teplota nasedání primerů
pUPD2_F	CCGATCAACTCGAGTGC	49 °C
pUPD2_R	TGTTCTTTCCTGCGTTATCC	49 °C
LB_F	TGGCAGGATATATTGTGGTG	50 °C
RB_R	GTTTACCCGCCAATATATCC	50 °C
AlphaOmega_F	GAAAGGCGGCAACCTC	51 °C
AlphaOmega_R	CTCTGACTTGAGCGTCG	51 °C
YFPmiddle_F	GTGAACAGAATCGAGCTGAAG	51 °C
Seq_mCherry_F	CATCACCTCCACAACG	51 °C
Seq_YFP_F	CTGAGCTACCAGTCCGC	51 °C

**Příloha 9: Seznam plánovaných kombinací transkripčních jednotek ve vektorech Omega**

Většinu vektorů připravila Ljudmila Timofejeva, výsledky jsou uvedeny s jejím výslovným souhlasem,

Code	Construct name	Backbone	Insert
H4-1	Ω2::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::mCherry:nosT::FAST
H4-2	Ω2::YFP::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::YFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT::FAST
H4-3	Ω2::nYFP::cYFP::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::nYFP:nosT::pCsVMV::cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-4	Ω2::bZip52::bZip34::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::bZip52::c-nYFP:nosT::pCsVMV::bZip34::c-cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-5	Ω2::Alba10::Alba10::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::ALBA10cds::c-nYFP:nosT::pCsVMV::ALBA10cds::c-cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-6	Ω2::Alba20::Alba20::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::ALBA20cds::c-nYFP:nosT::pCsVMV::ALBA20cds::c-cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-7	Ω2::Alba30::Alba30::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::ALBA30cds::c-nYFP:nosT::pCsVMV::ALBA30cds::c-cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-8	Ω2::Alba50::Alba50::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::ALBA50cds::c-nYFP:nosT::pCsVMV::ALBA50cds::c-cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-9	Ω2::Alba60::Alba60::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::ALBA60cds::c-nYFP:nosT::pCsVMV::ALBA60cds::c-cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-10	Ω2::Dan1::Dan1::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::DAN1cds::c-nYFP:nosT::pCsVMV::DAN1cds::c-cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-11	Ω2::Alba10::cYFP::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::ALBA10cds::c-nYFP:nosT::pCsVMV::cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-12	Ω2::Alba20::cYFP::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::ALBA20cds::c-nYFP:nosT::pCsVMV::cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-13	Ω2::Alba30::cYFP::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::ALBA30cds::c-nYFP:nosT::pCsVMV::cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-14	Ω2::Alba50::cYFP::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::ALBA50cds::c-nYFP:nosT::pCsVMV::cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-15	Ω2::Alba60::cYFP::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::ALBA60cds::c-nYFP:nosT::pCsVMV::cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-16	Ω2::Dan1::cYFP::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::DAN1cds::c-nYFP:nosT::pCsVMV::cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-17	Ω2::nYFP::Alba10::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::nYFP:nosT::pCsVMV::ALBA10cds::c-cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-18	Ω2::nYFP::Alba20::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::nYFP:nosT::pCsVMV::ALBA20cds::c-cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-19	Ω2::nYFP::Alba30::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::nYFP:nosT::pCsVMV::ALBA30cds::c-cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-20	Ω2::nYFP::Alba50::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::nYFP:nosT::pCsVMV::ALBA50cds::c-cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-21	Ω2::nYFP::Alba60::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::nYFP:nosT::pCsVMV::ALBA60cds::c-cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT
H4-22	Ω2::nYFP::Dan1::mCherry	pDGB3 Ω2	pCsVMV::nYFP:nosT::pCsVMV::DAN1cds::c-cYFP:nosT::pCsVMV::mCherry:nosT