

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet

Tomislav Mamić i Filip Španić

Uređivanje gena *VvPDS* vinove loze (*Vitis vinifera L.*) sustavom
CRISPR-Cas9 korištenjem vakuumske agroinfiltracije i biolistike

Zagreb, 2023.

Ovaj rad izrađen je na zavodu za molekularnu biologiju biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Nenada Malenice i predan je na natječaj za dodjelu rektorove nagrade u akademskoj godini 2022./ 2023.

Popis kratica

Cas - *CRISPR-associated protein*

CRISPR- *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*

crRNA - CRISPR RNA

DNA – engl. *deoxyribonucleic acid*, deoksiribonukleinska kiselina

DSB - engl. *double strand break*, dvolančani lom

gDNA – engl. *guide DNA*

gRNA – engl. *guide RNA*

GUS - β -glukuronidaza

HDR – eng. *homology directed repair*

HRMA – eng. *high resolution melting analysis*

LB medij - Luria-Bertani medij

MYB - engl. *myeloblastosis-like*

NHEJ - engl. *non homology end joining*, nehomologno sparivanje krajeva

PAM - engl. *protospacer adjacent motif*

PCR – engl. *polymerase chain reaction*, lančana reakcija polimerazom

PDS – gen za fitoen desaturazu

PMC – plavac mali crni

PMS – plavac mali sivi

RNA – eng. *ribonucleic acid*, ribonukleinska kiselina

SOC- engl. *Super Optimal broth with Catabolite repression*

TAE pufer - Tris-acetate-EDTA pufer

tracrRNA - engl. *trans activating crRNA*

Vv – *Vitis vinifera*

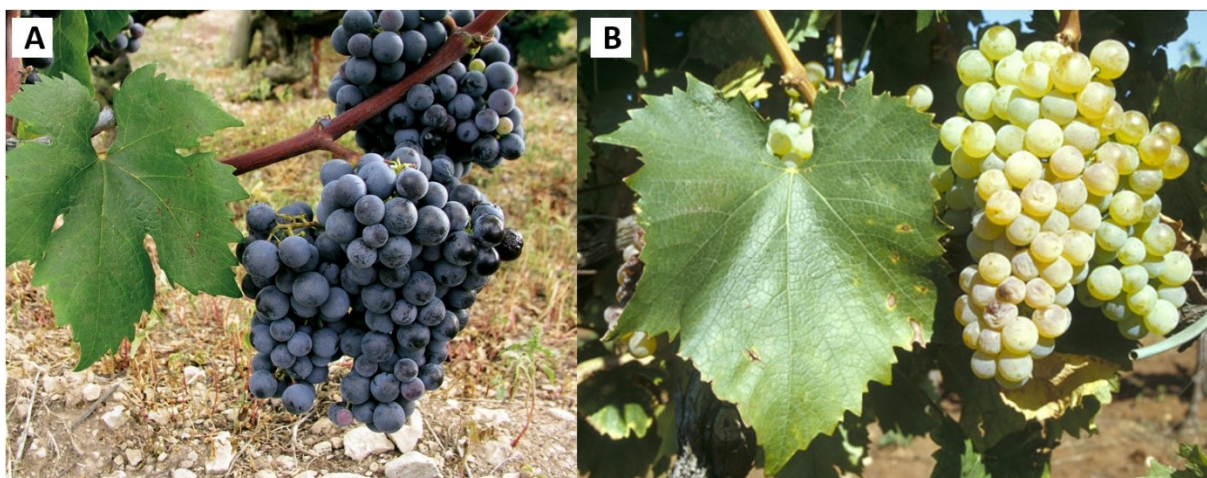
Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Gen <i>VvPDS</i> i obitelj transkripcijskih faktora MYB	2
1.2. Sustav CRISPR-Cas	3
1.3. Transformacija biljaka	6
1.3.1. Transformacija agrobakterijama	7
1.3.2. Biolistika	7
1.4. Somatski embriji kao sustav za transformaciju	9
2. Ciljevi rada	11
3. Materijali i metode	12
3.1. Hranjive podloge i puferi	12
3.2. Plazmidi	13
3.3. Bakterijski sojevi i uzgoj	15
3.4 Mjerenje optičke gustoće bakterija	16
3.5. Transformacija bakterijskih stanica	16
3.6. Biljni materijal i uzgoj	17
3.6.1. Dobivanje i sterilizacija cvatova za izolaciju eksplantata za biolistiku	17
3.6.2. Izolacija i nasađivanje eksplantata za somatsku embriogenezu	18
3.6.3. Regeneracija biljaka	18
3.7. Lančana reakcija polimerazom (PCR)	19
3.7.1. PCR s DNA polimerazom Q5	19
3.7.2. PCR s polimerazama EmeraldAmp i OneTaq	21
3.8. Cijepanje DNA restrikcijskim endonukleazama	22
3.9. Agarozna gel-elektroforeza	23
3.10. Izolacija DNA	24
3.10.1. Izolacija plazmidne DNA	24
3.10.2. Izolacija biljne genomske DNA	24
3.11. Pročišćavanje DNA	25
3.12. Koncentriranje DNA	26
3.13. Mjerenje koncentracije DNA	26
3.14. Kloniranje DNA u plazmidni vektor	26
3.14.1. Kloniranje metodom <i>In-Fusion</i>	26
3.14.2. Kloniranje metodom <i>NEBuilder</i>	27
3.14.3. TA kloniranje	28
3.15. Vakuumska agroinfiltracija	29

3.16. Biolistika	30
3.16.1. Priprema alikvota čestica zlata.....	30
3.16.2. Priprema kompleksa DNA i čestica zlata.....	30
3.16.3. Bombardiranje.....	30
4. Rezultati	33
4.1. Dizajn gRNA (sgRNA).....	33
4.2. Konstrukcija plazmida	34
4.2.1. Konstrukcija plazmida pMR396+218+VvPDS1.....	34
4.2.2. Strategija pripreme plazmida za genomsko editiranje u jednom koraku kloniranja	38
4.3. Vakuumska agroinfiltracija na plavcu malom sivom.....	40
4.3.1 Genotipska analiza targetinga vakuumske agroinfiltracije na plavcu malom sivom	42
4.4. Genotipizacija kultivara vinove loze s obzirom na Ddel mjesto u regiji targetinga	43
4.5. Vakuumska agroinfiltracija na malvaziji istarskoj.....	45
4.6. Biolistika na teranu	49
4.6.1 Genotipska analiza targetinga biolistike na teranu.....	51
5. Rasprava	53
6. Zaključak.....	58
7. Zahvale	59
8. Literatura.....	60
9. Sažetak	70
10. Summary	71

1. Uvod

Vinova loza (*Vitis sp.*) biljka je koja se 2019. globalno kultivirala na 7,5 milijuna hektara u svrhu proizvodnje vina, sušenog voća, stolnog grožđa ili organskih spojeva (Grassi i de Lorenzis, 2021). U Hrvatskoj je tradicionalno vinogradarstvo jedno od vodećih grana poljoprivrede, s ukupno 19 000 hektara vinogradarske površine u 2019. godini (Gjajić, 2021). Hrvatsko primorje je regija tradicionalno poznata po vinogradarstvu, a najzastupljeniji kultivari su malvazija istarska i plavac mali. Plavac mali (slika 1.1A) je kultivar koji se uzgaja u srednjoj i južnoj Dalmaciji, a najbolje uspijeva na lokacijama okrenutima moru (Maletić i sur., 2004).



Slika 1.1. Plavac mali, najzastupljenija sorta u Dalmaciji (A) te malvazija istarska, gospodarski najvažnija vrsta malvazije u Hrvatskoj (B). Preuzeto iz: <https://ovinu.info/plavac-mali/>; <https://www.trznica-trg.eu/novosti/44>.

U Istri je teran bio najzastupljeniji kultivar sve do sredine 20. stoljeća nakon čega se počinju uzgajati kultivari bijelog vina, najviše istarska malvazija (slika 1.1B) (Maletić i sur., 2014).

Tradicionalni način dobivanja novih kultivara vinove loze stoljećima bio je križanje nasumičnih ili odabranih roditeljskih biljaka, selekcijom potomaka s poželjnim fenotipom te njihovom vegetativnom propagacijom. Iz tog je razloga danas svaka biljka vinove loze visoko heterozigotna, što otežava svaki pokušaj križanja s ciljem dobivanja biljaka s novim karakteristikama (Iocco i sur., 2001). Naime, zbog spomenute heterozigotnosti svaki kultivar spolnim razmnožavanjem izgubio bi svoja poželjna svojstva tj. potomstvo križanja bilo bi različitog genotipa u odnosu na izvorni kultivar. S druge strane, uslijed sve većeg pritiska tržišta za uzgojem vinove loze s optimalnim fenotipskim i genotipskim obilježjima, konvencionalno križanje u svrhu dobivanja novih kultivara nije isplativo ni vremenski ni ekonomski. Stoga se danas u svrhu zadržavanja identiteta sorte, razvoj oplemenjivanja kreće

u smjeru stvaranja transgeničnih biljaka vinove loze (Campos i sur., 2021; Zhou i sur., 2014). Često je cilj dobiti biljku koja je otporna na različite gljivične, bakterijske ili virusne bolesti, ali i poboljšati fenotip i otpornost biljke na stresne uvjete (Saporta i sur., 2017). Prostor za značajan napredak dogodio se 2007. godine kada je sekvenciran prvi genom vinove loze, iz potomka kultivara Pinot Noir uzgojenog samooplodnjom zbog čega je imao gotovo 90% homozigotnih lokusa (The French–Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization, 2007). Ovim postignućem otvorila se mogućnost identifikacije novih, agronomski značajnih gena i njihove manipulacije u svrhu stvaranja biljaka s željenim fenotipskim karakteristikama kada se pojavi za to odgovarajuća tehnologija, unatoč otporu neznanstvene javnosti. Pojavom CRISPR-Cas9 tehnologije manipulacija genima vinove loze *in vivo* postala je praktično provediva (Ren i sur., 2016). Nadalje, novom tehnologijom oplemenjeni kultivari se više vjerojatno neće tretirati kao klasične transgenične biljke (Ahmad, 2023).

Stvaranje transgeničnih kultivara zahtijeva razvijanje posebnih protokola za svaku vrstu, a s obzirom na to da je genom vinove loze relativno nedavno sekvenciran, trenutno se radi na uspostavljanju onih koji najbolje funkcioniraju za svaki kultivar. Geni na kojima se takvi protokoli najčešće razvijaju su oni čija je preinaka fenotipski vidljiva, primjerice rezistencija na antibiotik kanamicin (Scorza i sur., 1995), kako bi se što jednoznačnije dokazala njihova učinkovitost. Na primjeru vinove loze, gen *VvPDS* i obitelj MYB transkripcijskih faktora čimbenici su koji određuju boju listova, odnosno bobice grozda, što ih čini idealnom metom za testiranje protokola na novom kultivaru.

1.1. Gen *VvPDS* i obitelj transkripcijskih faktora MYB

Fitoen desaturaza jedan je od glavnih enzima koji utječe na sintezu karotenoida. Ovaj enzim uvodi dvije dvostruke veze u 15-cis-fitoen stvarajući 9,15,9'-tri-cis- ζ -karoten preko intermedijera 9,15-di-cis-fitofluena (Koschmieder i sur., 2017). Karakterističan fenotip mutanta za ovaj gen je pojava bijelih sektora na biljnom tkivu što je rezultat nemogućnosti sinteze klorofila. Metodom CRISPR-Cas9 dosad je uspješno provedena inaktivacija ovog gena u dinji (Hooghvorst i sur., 2019), borovnici (Vaia i sur., 2022), jabuci (Nishitani i sur., 2016), jagodi (Wilson i sur., 2019) i kruški (Charrier i sur., 2019). Eksperimenti vezani uz transformaciju vinove loze još su malobrojni, ostavljajući prostora za usavršavanje protokola i odabira najbolje metode. Dosad su objavljena dva pokušaja inaktivacije gena *VvPDS* na vinovoj lozi s različitom učinkovitošću, a oba su rađena na stanicama embrionalnog kalusa. U prvom istraživanju (Nakajima i sur., 2017) transformacija agrobakterijama je pokušana na kultivaru Neo Muscat s rasponom učinkovitosti 2-86%, dok je u drugom istraživanju (Ren i sur., 2019) zabilježena

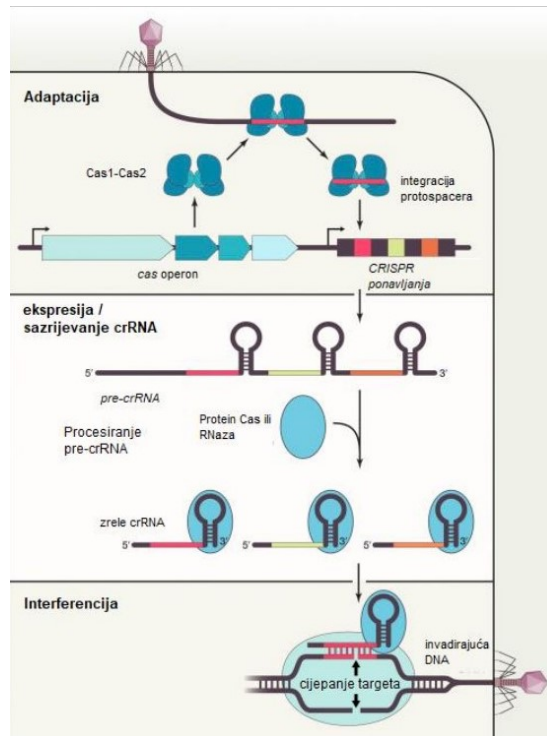
učinkovitost transformacije, također sa agrobakterijama, 20-60% za kultivar Chardonnay, odnosno 30-86%, za kultivar 41B. Vidljivo je kako je ostalo mjesta za napredak, odnosno, za usavršavanje protokola na drugim kultivarima ili transformacijom pomoću drugih metoda.

Boja grozda jedna je od najuočljivijih i najvažnijih karakteristika vinove loze, a ovisi o količini antocijanina u epidermalnom i subepidermalnom sloju kože grozda (Ferreira i sur., 2019), pri čemu boja može varirati od bijele, zelene, ružičaste, crvene pa sve do gotovo crne boje.

Geni iz obitelji transkripcijskih faktora Myb, *VvMybA1* i *VvMybA2*, sudjeluju u pigmentaciji kože grozda (Walker i sur., 2007). Mutacije u ovim genima narušavaju normalnu sintezu antocijanina stvarajući bijeli fenotip bobice. Najčešća mutacija koja dovodi do inaktivacije gena *VvMybA1* jest insercija retrotranspozona Gret1 u 5' regulatornu regiju gena (Kobayashi i sur., 2004). U genu *VvMybA2*, inaktivaciju mogu stvoriti dvije točkaste mutacije u samom genu. Geni *VvMybA1* i *VvMybA2* dio su visoko srodnog klastera na kromosomu 2 u kojem se nalazi i *VvMybA3* koji ne kodira funkcionalni proteinski produkt (Péros i sur., 2015; Fournier-Level i sur., 2009, Walker i sur., 2007).

1.2. Sustav CRISPR-Cas

CRISPR-Cas sustav je adaptivne imunosti koji je prisutan u bakterija i arheja (slika 1.3). Prilikom infekcije bakterije virusom, ukoliko bakterija preživi infekciju, dolazi do degradacije virusne DNA i ugradnje jednog dijela u genom bakterije, u točno predviđena mjesta u regiji CRISPR. Pri drugoj infekciji istim virusom, dolazi do transkripcije regije CRISPR i nastaje crRNA, odnosno, sekvenca koja je komplementarna jednom dijelu virusnog genoma, onome koji se ugradio prilikom prve infekcije. Istovremeno dolazi do transkripcije i translacije nukleaze Cas, odnosno stvaranja ribonukleoproteinskog kompleksa. Vezu između crRNA i proteina posreduje mala nekodirajuća RNA - tracrRNA. Njezina druga uloga je prepoznavanje regije nukleinske kiseline koju je potrebno pocijepati, a to čini zajedno s crRNA prepoznavanjem sekvence PAM, koja najčešće ima slijed NGG (pri čemu je N bilo koji nukleotid). Dio strane DNA koji je komplementaran crRNA uvijek se nalazi u neposrednoj blizini PAM sekvence. Nakon prepoznavanja ciljne sekvence, nukleaza Cas9 radi DSB i strana DNA se razgrađuje (Jiang i Doudna, 2017).

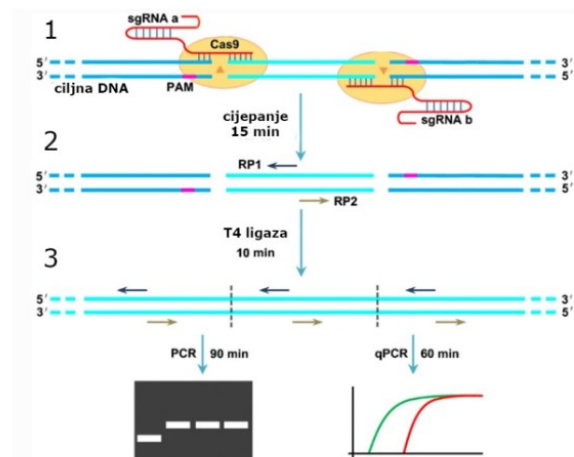


Slika 1.3. Ugradnja dijela virusnog genoma u CRISPR regiju bakterijskog genoma je prvi korak u CRISPR-Cas sustavu; u slučaju ponovne infekcije istim virusom, ekspresija i sazrijevanje crRNA osiguravaju interferenciju, cijepanje virusnog genoma i zaštitu od infekcije (preuzeto iz <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:168533>).

Opisani je sustav modificiran na način koji omogućuje uvođenje ciljanih izmjena u genom, pri čemu je dovoljno znati sekvencu regije koju želimo modificirati. crRNA i tracrRNA se spajaju u *single-guide RNA* (sgRNA ili jednostavno gRNA), pri čemu se crRNA dizajnira prema sekvenci koju želimo modificirati, kao u slučaju modifikacije somatskih embrija kultivara *Thompson Seedless* (Wang i sur., 2018). Metodom CRISPR-Cas9 moguće je postići ciljane inaktivacije gena ili ubaciti potpuno nove gene u genom. Ciljana inaktivacija gena događa se kao posljedica nemogućnosti popravka DSB u stanici pomoću homologne sekvence, što rezultira popravkom procesom NHEJ, a time najčešće i uvođenjem manjih delecija ili insercija (Cui i sur., 2018). No, mehanizam dopušta i nastajanje supstitucija (Lieber 2010). Alternativni način popravka DSB u biljaka jest HDR, kojim se može postići i ugradnja novoga gena. S obje strane gena potrebno je dodati krajeve koji su homologni regiji genoma u koju uvodimo gen. Postoje dva načina unosa gRNA::Cas9 kompleksa u stanicu, ekspresijom s vektora koji se može, ali i ne mora, ugraditi u genom, odnosno, sintezom ribonukleoproteinskog kompleksa *in vitro* i unosom istog u stanicu (Ma i sur., 2014).

S ciljem jednoznačne detekcije CRISPR-Cas9 događaja, potrebno je pomno dizajnirati gRNA specifičnu za gen od interesa. Ukoliko *null*-mutacija gena od interesa daje uočljiv fenotip, gRNA je dobro pozicionirati na mjesto u genu čijim bi pomakom okvira čitanja, uslijed mutacije,

došlo do nastanka aberantnog genskog produkta. S druge strane, na nukleotidnoj razini, osim što je potrebno paziti na to da se uzvodno od mjesta vezanja gRNA nalazi sekvenca PAM, nužno je i osigurati da se u mjestu potencijalnog mutacijskog događaja (najčešće unutar 5 nukleotida uzvodno od PAM mjesta) nalazi restrikcijsko mjesto, jedinstveno u toj genskoj regiji. Na taj način, u svrhu potvrde CRISPR-Cas događaja, provodi se PCR reakcija s početnicama koje omeđuju regiju s predviđenom mutacijom, dok se kao kalup koristi genomna DNA biljke koja je transformirana (slika 1.4), kao u primjeru (Nakajima i sur., 2017).



Slika 1.4. Događaji nakon prepoznavanja ciljane genske regije od strane gRNA-Cas kompleksa. 1 - Cas9 nukleaza radi DSB; 2 - pocijepana DNA se spaja pomoću T4 ligaze; 3 - PCR reakcija s početnicama koje omeđuju regiju u kojoj je došlo do DSB u svrhu potvrde mutacijskog događaja (preuzeto iz <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-021-03173-2>).

Produkti PCR-a inkubiraju se s endonukleazom koja prepoznaje spomenuti restrikcijski slijed. Ukoliko je došlo do mutacije u mjestu koje prepoznaje restrikcijski enzim, na agaroznom gelu uočava se i nepocijepani fragment, dok u suprotnom slučaju možemo očekivati potpunu restrikciju. Problemu potencijalno niske (nedetektibilne) frekvencije CRISPR-Cas9 događaja, može se doskočiti cijepanjem genske DNA odabranim restrikcijskim enzimom prije provođenja samog PCR-a čime se obogaćuje udio modificirane DNA koja je dostupna za umnažanje DNA polimerazom. U svrhu identifikacije mutacijskog događaja (delecija ili insercija) i za konačnu potvrdu rezultata potrebno je provesti kloniranje i sekvenciranje nepocijepanih fragmenata. Odabrana metoda transformacije CRISPR-Cas9 vektora u stanice ovisi o potrebama eksperimenta i vrsti koju transformiramo (Kaur i sur., 2021).

1.3. Transformacija biljaka

Transformacija biljaka podrazumijeva prijenos gena iz jednog organizma u drugi uz moguću integraciju i ekspresiju gena u novom organizmu. Gen koji se prenosi naziva se transgen, a organizam s transgenom integriranim u genom genetički modificiranim (transgeničnim) organizmom. Genetički modificirane biljke otporne na različite abiotičke (temperaturu, pH, salinitet, sušu) i / ili biotičke stresore (insekte, bakterijske ili virusne bolesti) jedan su od razloga velikog povećanja uzgoja takvih biljaka u poljoprivredi na prijelazu iz 20. u 21. stoljeće (Raman, 2017). Najčešće transgenične biljke u upotrebi danas uključuju kukuruz, pamuk, rižu, i uljarice, dok je transformacija vinove loze još uvijek veliki izazov, što potvrđuje činjenica da je stopa transformacija relativno niska (1-33%), a regeneracija biljaka iz transformiranih stanica uz korištenje antibiotika 10-30% (Bouquet i sur., 2006).

Činjenica da bakterije mogu biti uzročnici bolesti biljaka nije bila poznata sve do kraja 19. stoljeća, kada je znanstvenik Erwin Smith prvi uočio tvorbe nalik tumorima na korijenima različitih vrsti voćaka. Nakon 20 godina, kao uzročnik ove bolesti potvrđena je bakterija *Agrobacterium tumefaciens*, a fizičke promjene koje uzrokuje na biljci nazvane su *crown-gall* (Gelvin, 2003). S obzirom na to da mehanizam kojim bakterija zaražava biljku nije bio poznat, ovo je otkriće ubrzo zaboravljeno do početka 1970-tih godina. Godine 1976. dokazano je da bakterija u biljku prenosi plazmid koji omogućuje iniciranje stvaranja tumora (Gordon i Christie, 2014). Plazmid je nazvan Ti, a mogućnost transformacije biljaka odabranim genom pokrenula je utrku za dobivanjem prve transgenične biljke. To je ostvareno 1984. godine, a prva genetički modificirana biljka bio je duhan (*Nicotiana tabacum*). Godinu kasnije javlja se alternativa agroinfiltraciji - mikroinjektiranje DNA u protoplaste, a konačno, 1987. godine razvijena je tehnika „bombardiranja“ stanica s DNA koja je nazvana biolistika (Somssich, 2019). Za transformaciju agrobakterijama i/ ili viralnim vektorom najčešće su potrebna oštećenja na staničnoj stijenci kroz koje bakterija/ virus mogu ući u biljnu stanicu. S druge strane, za metode poput biolistike, odnosno, transformacije putem silicijevog karbida i UV zraka. nisu potrebna oštećenja na stanicama te su ove metode široko primjenjive (Keshavareddy i sur., 2018). Budući da su metode transformacije vinove loze pomoću *Agrobacterium tumefaciens* i biolistike najkorištenije metode transformacije, upravo njih smo odabrali kao glavne metode transformacije biljaka u ovom radu.

1.3.1. Transformacija agrobakterijama

Ovaj se princip transformacije biljaka zasniva na sposobnosti bakterije *Agrobacterium tumefaciens* da preko svog Ti-plazmida prenese T-DNA u biljnu stanicu, pri čemu je ugradnja nasumična. Metoda je veoma uspješna za dikotiledone, dok je uspješnost kod monokotiledona nešto slabija (Hofmann, 2016). Problem stvara činjenica da na uspješnu stopu transformacije utječe nekoliko faktora: bakterijski soj koji se koristi, uvjeti uzgoja i gustoća bakterija, vrijeme inkubacije s tkivom i sastav inokulacijskog medija.

Metoda je posebno uspješna za rajčicu, uročnjak i vrste *Nicotiana tabacum* i *Nicotiana benthamiana*, dok je za druge biljke uspješnost transformacije relativno niska zbog specifične morfologije listova (Ueki i sur., 2013). Uobičajeni sustav dostave agrobakterija uključuje unošenje u lisni parenhim putem injekcijske šprice ili pomoću vakuuma, ovisno o preferencijama izvođača i vrsti biljke koja se transformira. Korištenjem injekcijske šprice područje infiltracije agrobakterija ostaje limitirano, a moguća je i pojava nekroze što je vjerojatno rezultat ekspresije R (od eng. *resistance*) gena (Van der Hoorn, 2000.) U svrhu poboljšanja metode dostave, iskušane su različite varijacije poput sonikacije tkiva kako bi se povećao broj mjesta infekcije (Santarém i sur., 1998) i vakuumske filtracije (Mariashibu i sur., 2013) kako bi veći broj bakterija uspješno ušao u biljku. Metoda vakuumske infiltracije dosad je isprobana na salati (Simmons i sur., 2009), leći (Mahmoudian i sur., 2002), petuniji (Tjokrokusumo i sur., 2000), grahu (Bakshi i sur., 2011) i banani (Subramanyam i sur., 2011). Vakuumska infiltracija je pogodna alternativa infiltraciji pomoću šprice zbog svoje jednostavnosti, ali i činjenici da ne zahtijeva pretjerano skupu aparaturu za izvođenje. Jedna od opcija je i korištenje plazmida pCB301-p19 u svrhu povećanja efikasnosti transformacije (Voinnet i sur., 2003). Ovaj plazmid kodira za virusni protein p19 koji ima ulogu u ometanju posttranskripcijskog utišavanja gena, čime poboljšava privremenu ekspresiju gena, zbog čega se koristi u industrijskoj proizvodnji rekombinantnih proteina. U odnosu na druge metode, transformacija pomoću agrobakterija je daleko najkorištenija metoda transformacije, iskušana na različitim uzorcima biljnog tkiva, u različitim medijima i na različitim kultivarima. U našem je eksperimentu vakuumska infiltracija poslužila u svrhu testiranja gRNA::Cas9 konstrukta.

1.3.2. Biolistika

Ova metoda najčešće se koristi za transformaciju biljaka, konkretno zbog sposobnosti uvođenja DNA kroz staničnu stijenku koja predstavlja fizičku prepreku. Osim za biljke, biolistika

se može koristiti za transformaciju prokariotskih organizama poput bakterija, ali i eukariotskih kao što su alge, gljive i životinje (Lacroix i Citovsky, 2020). Transformacija biolistikom ima brojne prednosti, uključujući i mogućnost da se i ostali organeli transformiraju. Međutim, za razliku od drugih metoda, potrebno je prilagoditi protokol za svaku pojedinu vrstu tkiva. Također, stopa transformiranih stanica je manja negoli kod transformacije agrobakterijama, a ujedno je i skuplja. Zbog toga što ne možemo predvidjeti konačnu metu mikročestica, efikasnost regeneracije transgeničnih biljaka iz somatskih embrija vinove loze varira. Primjerice, zabilježena je efikasnost od 54% regeneriranih transgeničnih biljaka iz kultivara Chardonnay (Vidal i sur., 2003). Razlika ovako dobivenih transgeničnih biljaka vinove loze u odnosu na one s editiranim genomom je što se kod transgeničnih biljaka strana DNA ugrađuje nasumično, dok se kod one s editiranim genomom promjena uvodi u ciljnoj regiji genoma. Parametri koji su najčešće podložni promjenama ovisno o biljci koju transformiramo su promjer čestica, udaljenost od tkiva i tlak pod kojim se ispucavaju čestice s DNA. Vektor se može pripremiti u linearnom ili cirkularnom obliku, a moguća je i istovremena transformacija s više vrsta vektora. Ukoliko je cilj privremena ekspresija u stanici, postoji mogućnost korištenja i RNA molekula. U svrhu vezanja DNA na čestice zlata koje su najčešće korišteni mikronosači za dostavu, koriste se kalcijev klorid i spermidin. Nakon početnog koraka vezanja provodi se više koraka centrifugiranja u etanolu. Ovaj postupak ima dvije svrhe: ukloniti višak kalcijevog klorida i spermidina, ali i osigurati da u otopini nema vode koja bi mogla narušiti veze između čestica zlata i DNA. Nakon transformacije, privremenu je ekspresiju moguće promatrati već nakon 24 sata ukoliko se eksprimira reporter gen poput GUS-a (Joubert i sur., 2013) ili dvojni luciferazni sustav (Hichri i sur., 2010). Izbor tkiva za sam postupak ovisi o potrebama istraživanja. Osim kalusa, koji se najčešće koriste jer je iz njih kasnije moguće regenerirati kompletnu transgeničnu biljku, za biolistiku se mogu koristiti i suspenzije stanica, reproduktivni i vegetativni organi biljke, meristemsko tkivo, sjemenke ili embriji. Kod izbora tkiva potrebno je voditi računa o činjenici da se odabrano tkivo stavlja u relativno malenu komoru u uređaju, stoga je potrebno prilagoditi veličinu tkiva. Najveća prednost somatskih embrija u odnosu na ostala biljna tkiva je što je iz njih moguće regenerirati transgeničnu biljku koja se može koristiti u daljnjim istraživanjima bez da je potrebna faza stvaranja kalusa i inducirane organogeneze (korijena i izdanka). Zbog toga je ovaj tip biljnog tkiva najkorišteniji u metodi biolistike.

1.4. Somatski embriji kao sustav za transformaciju

Biljke su jedne od rijetkih vrsta organizama koji imaju sposobnost totipotencnosti, odnosno razvoja čitavog organizma iz jedne stanice. Postoje dva procesa u kojima može doći do razvoja nove biljke, organogeneza i embriogeneza.

Organogeneza je proces nastajanja izdanka ili korijena iz jednog dijela biljke (primjerice lista, korijena ili cvijeta), što je potpomognuto različitim biljnim hormonima. Ukoliko se biljno tkivo prvo dediferencira do stadija kalusa, a potom iz njega biljni organi, govorimo o indirektnoj organogenezi (Kurmi i sur., 2011). Direktna organogeneza podrazumijeva nastajanje izdanka ili korijena direktno iz eksplantiranog biljnog tkiva, bez ulaska u stadij kalusa (Stamp i sur., 1990). U tkivu nakon eksplantacije, neke stanice ostaju osjetljive na biljne hormone, odnosno kombinacijom istih moguće je iz njih razviti izdanak/ korijen, ovisno o kombinaciji i omjeru različitih biljnih hormona. Velika uloga u uspješnosti procesa je veličina i vrsta eksplantiranog tkiva, uz promjenu omjera biljnih hormona auksina i citokinina što može izazvati različite fenotipove kod pojedinih vrsta. Ovi čimbenici moraju biti uzeti u obzir uz uvjete uzgoja poput temperature, svjetlosti i vlažnosti. Prednosti ove metode su njezina jednostavnost, mala vjerojatnost mutacije i mogućnost formiranja izdanka iz nodija biljke. Nepoželjna pojava u izvođenju ove metode je somaklonska varijabilnost koja se može dogoditi prilikom dediferencijacije u kalusno tkivo, pri čemu se stanice mogu genetički razlikovati, najčešće uslijed epigenetičkih modifikacija, a rjeđe trajnih mutacija. Također, činjenica da protokol nije standardiziran za sve biljke onemogućuje primjenu organogeneze na sve vrste pa se danas najviše koristi za umnažanje biljaka (Kurmi i sur., 2011).

Embriogeneza je jednostavniji proces gdje se biljka formira iz embrija. Kao i u slučaju organogeneze, embriogeneza se može podijeliti na direktnu ili indirektnu, ovisno o tome formira li se embrij iz kalusa ili ne (Arnold i sur., 2002, Bhatia i Bera 2015). Somatskom embriogenezom moguće je dobiti čitavu biljku iz somatskih/ vegetativnih stanica ili tkiva. Eksplantirana masa stanica ili tkiva se dediferencira u kalus djelovanjem različitih hormona. U cijelom kalusu, određene vrste stanica zadržavaju embriogeni potencijal. Ukoliko se takve stanice nalaze u povoljnim uvjetima za rast, proći će različite embriogene stadije - globularni, srololiki, torpedo i kotiledonarni stadij te na kraju stvoriti novu biljku. Na uspješnost postupka utječe tip i starost eksplanta, pri čemu je bolje koristiti mlađe tkivo jer ima više potencijala za dediferencijaciju. Primijećeno je da postoje varijacije u stvaranju embriogenog kalusa između različitih kultivara biljaka iste vrste. Već spomenuti omjer hormona auksina i citokinina i ovdje ima značajan utjecaj, ponovno drugačiji za svaku biljku. Određene komponente hranjive podloge poput aminokiselina triptofana, prolina i glutamina, poliamina putrescina i spermidina

te brasinosteroida mogu povećati frekvenciju stvaranja embriogenog kalusa kod nekih vrsta (Martinelli i Gribaudo, 2001). Prednost ove metode je mogućnost široke proizvodnje biljaka iz embriogenog kalusa, te mogućnost dugotrajne pohrane induciranjem dormancije. Ključni nedostatak metode je činjenica da se nakon nekoliko regeneracija ne može dobiti embriogeno tkivo, a razvoj embrija iz embriogenog kalusa često nije sinkroniziran. Somatska embriogeneza se koristi za regeneraciju somatskih hibrida (nastali fuzijom dvaju protoplasta), regeneraciju homozigotnih biljaka i umnažanje biljaka (von Arnold i sur., 2002; Frugis, 2019).

Zbog genetičke raznolikosti koja se može dogoditi prilikom regeneracije biljke organogenezom, u istraživanjima se danas češće koriste somatski embriji. Regeneracija biljke uspješno je provedena iz različitih vrsta tkiva poput zigotnih embrija, vitica, filamenata, cvjetova, pupova, tučka i prašnika. Efikasnost dobivanja somatskih embrija kod vinove loze ovisi o više faktora poput vrste tkiva koje se koristi, ali i o njegovoj starosti, kao i genotipu biljke (Zhang i sur., 2021). Primjerice, zabilježena je različita stopa uspješnosti dobivanja somatskih embrija između prašnika (4.9%) i tučka (10.1%) (Vidal i sur., 2009). Unatoč tome, još uvijek ne postoji faktor čija bi modifikacija jednoznačno povećavala stopu uspješnosti dobivanja somatskih embrija.

2. Ciljevi rada

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. Razvoj protokola za konstrukciju plazmida za ciljano uređivanje genoma (od eng. *genome editing*) vinove loze sustavom CRISPR-Cas9 u jednom koraku kloniranja.
2. Konstrukcija plazmida za ciljanu inaktivaciju gena *VvPDS* i istovremenu inaktivaciju triju funkcionalno srodnih lokusa *VvMybA1*, *VvMybA2* i *VvMybA3*.
3. Uspostava metode za preliminarno ispitivanje funkcionalnosti sustava za ciljanu inaktivaciju gena vakuumskom agroinfiltracijom na mladim listovima vinove loze.
4. Stvaranje sustava za uređivanje genoma vinove loze transformacijom CRISPR-Cas9 plazmida u stanice somatskih embrija tehnikom biolistike za dobivanje kimernih biljaka.

3. Materijali i metode

3.1. Hranjive podloge i puferi

1. LB hranjivi medij

Sastav: 10,0 g/ L tripton (BD, Franklin Lakes, New Jersey, SAD), 10,0 g/ L natrijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska) i 5,0 g/ L kvašćev ekstrakt (BD, Franklin Lakes, New Jersey, SAD) u destiliranoj vodi, podesiti pH na 7,0. Otopina se autoklavira (20 min, 120 °C, 1 bar).

Dodatci u LB medij po potrebi: 15,0 g/ L agaroz (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) (za kruti LB - dodaje se prije autoklaviranja), 50 µg/ mL rifampicin, 100 µg/ mL gentamicin, 50 µg/ mL spektinomycin, 50 µg/ mL kanamicin.

2. SOC medij

Korišten je *SOC Outgrowth Medium* (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, SAD) za oporavak bakterijskih stanica nakon toplinskog šoka tijekom kemijske transformacije.

3. Pufer za agroinfiltraciju

Sastav: 10 mmol/ L MES (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Njemačka), 10 mmol/ L magnezijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska) u destiliranoj vodi, podesiti pH na 5,8. Otopina je filter-sterilizirana. Korišten je filter LLG-Syringe filters Spheros (LLG Labware, Meckenheim, Njemačka) s veličinom pore 0,22 µm.

4. 50×TAE pufer za agaroznu gel-elektroforezu

Sastav: 242 g/ L tris-baza (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Njemačka), 5,71%-tna octena kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska), 50 mmol/ L, pH = 8,0 EDTA (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Njemačka) u destiliranoj vodi.

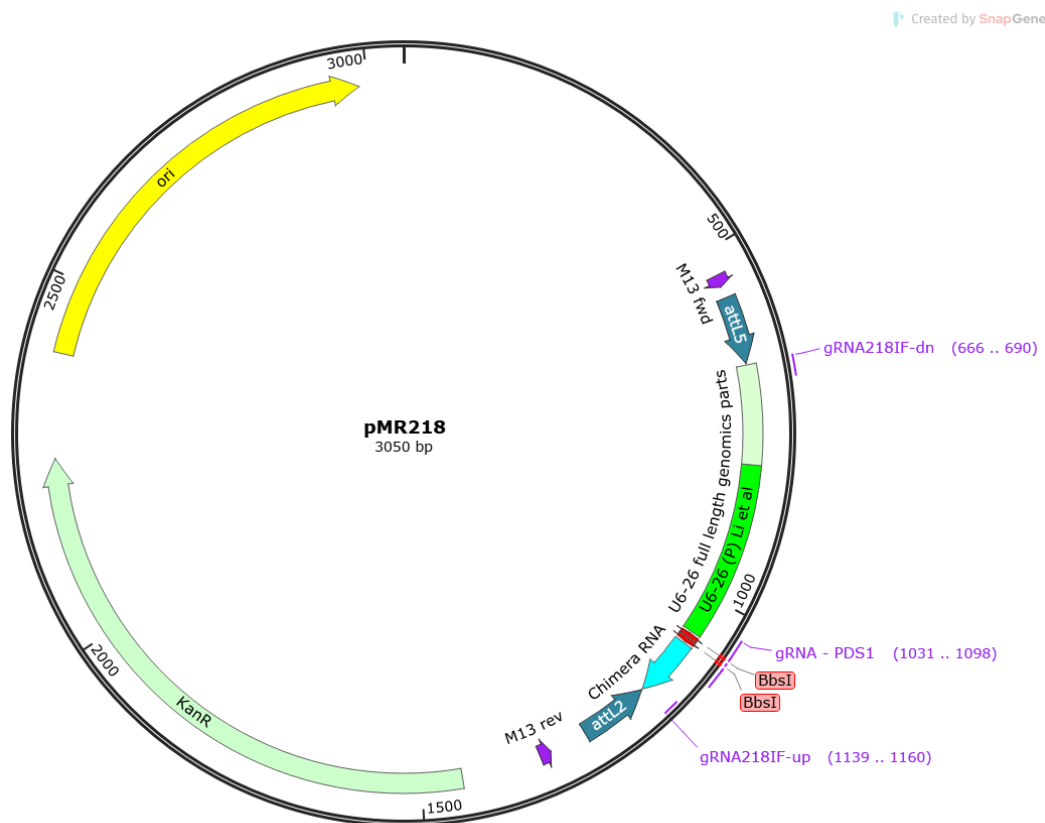
3.2. Plazmidi

Plazmidni vektori koji su korišteni u ovom eksperimentu, njihova imena, porijeklo i gen za rezistenciju priloženi su u tablici 3.2.1. Mape plazmida pMR218 i pMR396 od kojih je dobivena većina ostalih plazmida, priložene su na slikama 3.2.1 i 3.2.2.

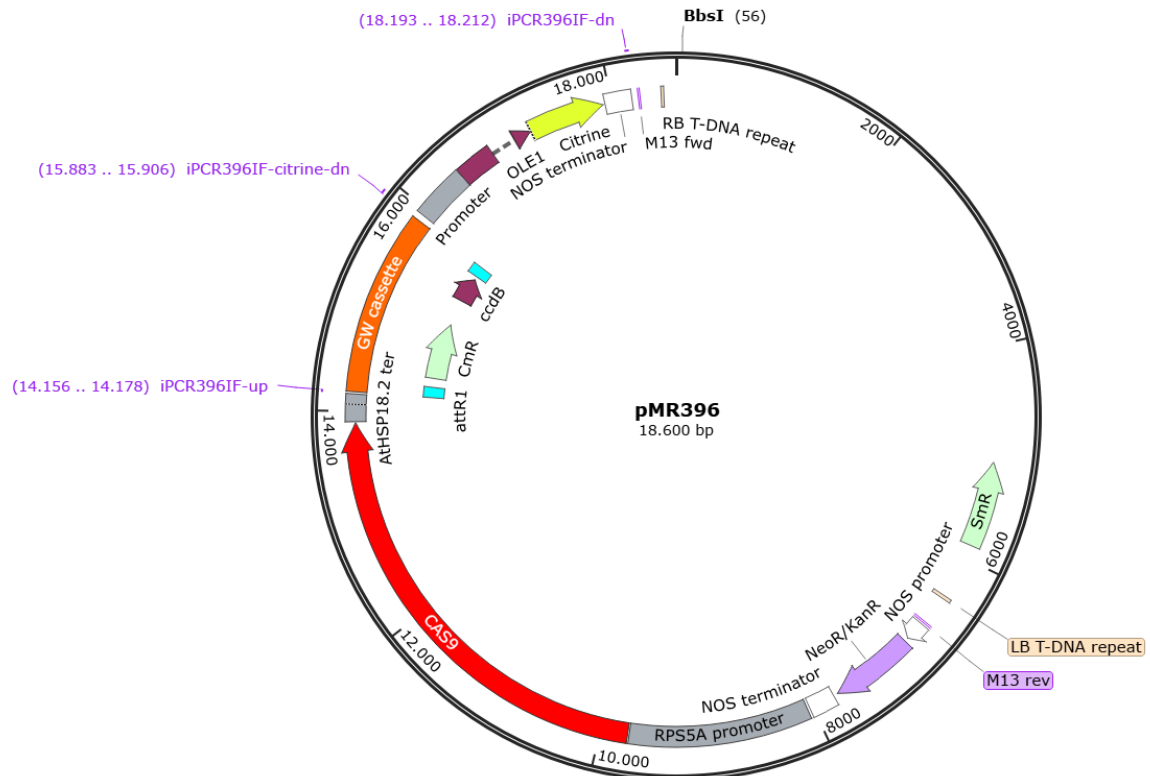
Tablica 3.2.1. Ime, porijeklo i obilježja korištenih plazmida.

Ime plazmida	Porijeklo	Obilježja (promotor, gen, selekcija)
pMR218	Dr.sc. Mily Ron (UC Davis)	U6-26::gRNA vektor (Kan ^r)
pMR396	Dr.sc. Mily Ron (UC Davis)	RPS5A::Cas9 vektor (Spec ^r)
pMR218- VvPDS1	VvPDS1 ciljna sekvenca (gRNA) ugrađena između regije promotora U6-26 i tracrDNA plazmida pMR218, reakcijom <i>NEBuilder</i> (vidi 3.14.2)	U6-26::gRNA- VvPDS1 vektor (Kan ^r)
pMR396+ 218+VvPDS1	Ugrađena kazeta za ekspresiju gRNA iz plazmida pMR218-VvPDS1 (3.7.1), u skraćeni i linearizirani plazmid pMR396, dobiven inverznim PCR-om (vidi 3.7.1), reakcijom <i>In-Fusion</i> (vidi 3.14.1)	U6-26::gRNA- VvPDS1, RPS5A::Cas9 vektor (Spec ^r)
pMR396+ 218	Ugrađena kazeta za ekspresiju gRNA iz plazmida pMR218 (vidi 3.7.1), u skraćeni i linearizirani plazmid pMR396, dobiven inverznim PCR-om (vidi 3.7.1), reakcijom <i>In-Fusion</i> (vidi 3.14.1)	U6-26::gRNA, RPS5A::Cas9 vektor (Spec ^r)
pMR396+ 218+VvPDS2	Ugradnjom ciljne sekvence (gDNA) za alel gena VvPDS bez <i>Ddel</i> mjesta u plazmid pMR396+218, reakcijom <i>NEBuilder</i> (vidi 3.14.2)	U6-26::gRNA- VvPDS2, RPS5A::Cas9 vektor (Spec ^r)
pMR396+ 218+VvMybA1	Ugradnjom ciljne sekvence (gDNA) za lokuse VvMybA1 i VvMybA2 i VvMybA3 u plazmid pMR396+218, reakcijom <i>NEBuilder</i> (vidi 3.14.2)	U6-26::gRNA- VvMybA1, RPS5A::Cas9 vektor (Spec ^r)

pCB301-p19	Kodira za protein p19 koji veže siRNA i tako sprečava posttranskripcijsko utišavanje gena od interesa (Win i Kamoun 2004)	35S::p19 (Kan ^r)
pGEM®-T Vector	Komercijalni komplet pGEM-T Easy Vector System I (Promega, Madison, Wisconsin, SAD), plazmidni vektor za TA kloniranje, sadrži gen za beta-galaktozidazu koji se inaktivira	<i>lacZ</i> (Amp ^r)
pGEM®-T Vector – derivati	Produkti TA kloniranja s plazmidom pGEM®-T Vector kao kalupom te PCR produktima kao insertima, radi potreba sekvenciranja	plavo-bijela selekcija (Amp ^r)



Slika 3.2.1. Mapa plazmida pMR218 izvezena iz programa *Snappgene*. Plazmid nosi gen za tracrDNA pod U6-26 promotorom, *BbsI* restrikcijsko mjesto za ugradnju gDNA od interesa te gen za rezistenciju na kanamicin.



Slika 3.2.2. Mapa plazmida pMR396 konstruirana u programu *Snapgene*. Plazmid nosi gen za nukleazu Cas9 pod RPS5A konstitutivnim promotorom te gen za rezistenciju na spektinomycin.

3.3. Bakterijski sojevi i uzgoj

U tablici 3.3.1 navedeni su korišteni sojevi bakterija.

Tablica 3.3.1. Popis korištenih bakterijskih sojeva.

Bakterijska vrsta	Soj	Genotip	Porijeklo	Upotreba
<i>E. coli</i>	XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyra96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' proAB lacIqZ.M15 Tn10 (Tetr)]	Bullock 1987	TA kloniranje
<i>E. coli</i>	5-alfa (C2897)	<i>fhuA2 lacZ</i> U169 Δ (<i>argF-phoA</i>)	New England Biolabs (Ipswich,	Konstrukcija plazmidnih

		<i>glnV44</i> Φ 80 $\Delta(\text{lacZ})\text{M15}$ <i>gyrA96</i> <i>recA1 relA1 endA1</i> <i>thi-1 hsdR17</i>	Massachusetts, SAD)	vektora za biolistiku i agroinfiltraciju
<i>A. tumefaciens</i>	GV 3101 <i>with helper</i> <i>plasmid</i> pMP90	C58 (rif ^R) Ti pMP90 (pTiC58DT-DNA) (gent ^R) Nopaline	Koncz i Schell 1986	Agroinfiltracija

Kulture bakterija uzgajane su u tekućem LB-u (3 mL) ili krutom LB-u (25 mL) s dodatkom antibiotika, ovisno o plazmidu kojim su transformirane. Inkubirane su prekonočno u tresilici uz 250 rpm (za tekuće podloge) ili u inkubatoru (za krute podloge) na 37 °C (*E. coli*) ili 28 °C (*A. tumefaciens*).

3.4 Mjerenje optičke gustoće bakterija

Optičku gustoću bakterija mjerili smo u svrhu postizanja optimalne faze rasta bakterija za korak agroinfiltracije. Mjerenje je provedeno pri valnoj duljini $\lambda = 600$ nm na denzitometru *Ultrospec 10 Cell Density Meter* (GE Healthcare, Chicago, Illinois). Mjerenje je izvođeno u staklenim kivetama. Kao slijepa proba korišten je pufer za agroinfiltraciju (1 mL). Uzorci su prije mjerenja razrijeđeni 10 puta (0,1 mL bakterija u 0,9 mL pufera za agroinfiltraciju).

3.5. Transformacija bakterijskih stanica

Kemijski kompetentne stanice *E. coli*, 5-alfa, C2897H transformirane su slijedeći protokol proizvođača. Stanice (50 μ L) se vade iz zamrzivača (-80 °C) i otapaju na ledu 10 minuta. Kada se stanice otope, dodaje se 1 μ L plazmida ($\gamma = 50\text{-}200$ ng/ μ L), a mikroeproveta se pažljivo okrene pet puta. Stanice se inkubiraju na ledu 30 min nakon čega slijedi toplinski šok: 30 s na 42 °C u termobloku *Thermomixer Comfort* (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) nakon čega se stanice vraćaju na led 5 min. Potom im se dodaje 950 μ L medija SOC te se stanice inkubiraju u tresilici 1 sat na 37 °C uz 250 rpm. Na ploče s odgovarajućim antibiotikom nasadi se 150 μ L transformiranih stanica.

Kemijski kompetentne stanice *E. coli*, XL1-Blue, (100 µL) vade se iz zamrzivača (-80 °C) i otapaju na ledu 10 minuta. Kada se stanice otope, dodaje im se 3 µL plazmida (γ = 50-200 ng/ µL), a mikroepreveta se polako okrene pet puta. Stanice se inkubiraju na ledu 20 min nakon čega slijedi toplinski šok: 90 s na 42 °C u termobloku *Thermomixer Comfort* (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) nakon čega se stanice vraćaju na led 2 min. Potom im se dodaje 400 µL medija LB te se stanice inkubiraju u tresilici 1 sat na 37 °C uz 250 rpm. Na ploče s odgovarajućim antibiotikom nasadi se 150 µL transformiranih stanica.

Elektrokompetentne stanice *A. tumefaciens* (50 µL) vade se iz zamrzivača (-80 °C) i otapaju na ledu 10 minuta. Kada se stanice otope, dodaje im se 3 µL plazmida (γ = 50-200 ng/ µL). Čitav volumen jednom se resuspendira i prebaci u staklenu kivetu ohlađenu na ledu. . Kiveta se posuši papirnatim ubrusom te smjesti u elektroporator *MicroPulser* (Bio-Rad, Hercules, California, SAD). Primjenjuje se električni puls uz parametre: 1800 V (*E. coli*), 2200 V (*A. tumefaciens*), uz trajanje pulsa 4-5 ms. U kivetu se nakon pulsa odmah dodaje 450 µL LB-a i polako resuspendira. Čitav sadržaj prebacuje se u mikroeprevetu te inkubira 1 sat uz mućkanje u termobloku *Thermomixer Comfort* (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) na 22 °C. Stanice se nasađuju (150 µL) na ploče s odgovarajućim antibioticima.

3.6. Biljni materijal i uzgoj

Genomsko modificiranje sustavom CRISPR-Cas9 provedeno je na autohtonim hrvatskim sortama vinove loze: PMS, malvaziji istarskoj i teranu. Biolistika je provedena na somatskim embrijima terana, a vakuumska agroinfiltracija na mladim biljkama PMS i malvazije istarske dobivenim putem zigotne, odnosno, somatske embriogeneze.

3.6.1. Dobivanje i sterilizacija cvatova za izolaciju eksplantata za biolistiku

Rozgve/ reznice terana potaknute su na cvatnju u destiliranoj vodi u uvjetima 16 h dan, 8 h noć te pri 22 °C.

Cvatovi s neotvorenim cvjetnim pupovima odvajaju se s rozgve te steriliziraju po sljedećem protokolu:

1. Cvatovi se inkubiraju u plastičnoj epruveti (15 mL), 1 min u 70%-tnom etanolu uz lagano okretanje epruvete. Etanol se izlije kroz sterilno sito, a cvatovi ponovno skupljaju u epruvetu.

2. Slijede tri jednogminutna ispiranja u sterilnoj destiliranoj vodi uz okretanje epruvete. Voda se nakon svakog koraka odbacuje kroz sterilno sito, a cvatovi skupljaju u epruvetu.
3. U epruvetu se dodaje 13%-tni natrijev hipoklorit (Kemika, Zagreb, Hrvatska) nakon čega slijedi desetominutno mućkanje
4. Ponavljaju se ispiranja iz koraka 2, pet puta.
5. Isprani cvatovi prebacuju se u Petrijevu zdjelicu s vlažnim filter papirom koja se omata parafilmom. Čuvaju se na 4 °C 2-6 dana do izolacije antera.

3.6.2. Izolacija i nasađivanje eksplantata za somatsku embriogenezu

Pojedinačni mladi cvjetni pupovi odvoje se od cvata. Cvjetni pupovi otvaraju se rezanjem na bazalnoj strani medicinskom iglom. Prašničke niti odvajaju se od svoje baze, a prašnici se prebacuju na medij X1 za indukciju embriogeneze, te uzgajaju u mraku, pri 22 °C.

3.6.3. Regeneracija biljaka

Na mediju X1 (Malenica i sur., 2020) dolazi do pojave embriogenih kalusa u kojima dominiraju embriji u globularnoj fazi razvoja. Embriogeni kalusi s individualno raspoređenim embrijima prebacuju se na medij X6 (Malenica i sur., 2020) za indukciju embriogeneze. Na globularnim embrijima netom prebačenima na medij X6 provodili smo biolistiku.

Embriji na mediju X6 se i dalje uzgajaju u mraku pri 22 °C. Kotiledonarni embriji s definiranim hipokotilom i kotiledonima prebacuju se na Petrijevu zdjelicu s medijem za indukciju klijanja. Biljčice se uzgajaju na 22 °C, ali pri uvjetima 16 h dan, 8 h noć. S razvitkom prvih listova, biljčice se prebacuju se na medij EG (Malenica i sur., 2020) u epruvetu gdje dolazi do daljnjeg rasta i razvoja biljke. Dosadašnji dio regeneracije biljaka zahtijevao je rad u sterilnim uvjetima u laminaru. Nakon 3-4 tjedna biljke se prebacuju u *Magenta Box* sa zemljom, u nesterilne uvjete, u kojoj se biljke prilagođavaju na uvjete *in vivo* s postupnim smanjenjem uvjeta vlage.

3.7. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Ovisno o njihovim karakteristikama, korištene su različite DNA polimeraze. Za korake u kojima je očekivani produkt PCR-a bio zahtjevne duljine (> 10 kb) i/ ili kada je bila nužna visoka točnost, korištene su *high fidelity* i *long range* polimeraze. Kad to nije bio slučaj, korištena je standardna Taq polimeraza. Sve PCR reakcije provodili smo na uređaju *T100 Thermal Cycler* (Bio-Rad, Hercules, California, SAD).

3.7.1. PCR s DNA polimerazom Q5

Q5 je *high fidelity* DNA polimeraza (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, SAD).

Za korak umnažanja fragmenta s genom za gRNA, te istog fragmenta bez ugrađene gDNA, iz plazmida pMR218-VvPDS1, odnosno, pMR218, korištene su sljedeće početnice:

1. gRNA218IF-up – 5' **ACTAGTCGGTCCGG**ACTAGAAAAAAGCACCGACTCG 3'
2. gRNA218IF-dn – 5' **GGCCTGTTATCC**CTACTTTTTTTCTTCTTCTTCGTTCA 3'.

Plavom bojom označeni su 5' stršeci krajevi za *In-Fusion* kloniranje homologni lineariziranim krajevima plazmida pMR396. Pripremljena je reakcijska smjesa prikazana u tablici 3.7.1.1.

Tablica 3.7.1.1. Sastav smjese za PCR s DNA polimerazom Q5 s početnicama gRNA218IF-up i -dn.

Komponenta	V (μL)
5×Q5 <i>Reaction Buffer</i>	5
dNTPs (c = 2 mM)	2,5
gRNA218IF-up (c = 2 μM)	6,25
gRNA218IF-dn (c = 2 μM)	6,25
pMR218/ pMR218+VvPDS1	X*
Q5 polimeraza	0,25
destilirana voda	do 25

*Volumen koji odgovara masi 0,5 ng.

Reakcija je provedena uz uvjete prikazane u tablici 3.7.1.2.

Tablica 3.7.1.2. Uvjeti PCR reakcije pripremljene prema tablici 3.7.1.1.

Korak	T (°C)	t (s)
Inicijalna denaturacija	98	30
35 ciklusa	98	10
	61	20
	72	30
Finalna ekstenzija	72	120

Za korak linearizacije i uklanjanja suvišnog dijela plazmida pMR396 korištene su sljedeće početnice:

1. iPCR396IF-up – 5' TAGGGATAACAGGCCTAGGGAGC 3'
2. iPCR396IF-dn – 5' TCCGGACCGACTAGTGGATC 3'

Pripremljena je reakcijska smjesa prikazana u tablici 3.7.1.3.

Tablica 3.7.1.3. Sastav smjese za PCR s DNA polimerazom Q5 s početnicama iPCR396IF-up i -dn.

Komponenta	V (µL)
5×Q5 <i>Reaction Buffer</i>	10
dNTPs (c = 2 mM)	5
iPCR396IF-up (c = 2 µM)	12,5
iPCR396IF-dn (c = 2 µM)	12,5
pMR396	X*
Q5 polimeraza	1
destilirana voda	do 50

*Volumen koji odgovara masi 1 ng.

Reakcija je provedena uz uvjete prikazane u tablici 3.7.1.4.

Tablica 3.7.1.4. Uvjeti PCR reakcije pripremljene prema tablici 3.7.1.3.

Korak	T (°C)	t (s)
Inicijalna denaturacija	98	30
35 ciklusa	98	10
	69	20
	72	600
Finalna ekstenzija	72	120

3.7.2. PCR s polimerazama EmeraldAmp i OneTaq

PCR s polimerazom *EmeraldAmp* (TakaraBio, Kusatsu, Shiga, Japan) proveden je u svrhu umnažanja genomske regije gena *VvPDS* s ciljem daljnje genotipizacije sorti s obzirom na *Ddel* restrikcijsko mjesto, i detekcije djelovanja sustava CRISPR-Cas9. Za genotipizaciju sorti s obzirom na restrikcijsko mjesto *Ddel* i detekciju djelovanja sustava CRISPR-Cas9 pomoću restrikcijskog mjesta *Ddel* (vidi 4.3.1 i 4.4) korištene su sljedeće početnice:

1. *VvPDS2*-up – 5' TGTTCAATAGCTTCACCCAGAAC 3'
2. *VvPDS2*-dn – 5' CATCTGTGCATTCATTAGAATCTTG 3'

Za detekciju djelovanja sustava CRISPR-Cas9 pomoću restrikcijskog mjesta *Hpy188III* (vidi 4.5 i 4.6.1) korištene su sljedeće početnice:

1. *VvPDS3*-up – 5' CTTGTTTTCTCATCCAGTCTTTAACAG 3'
2. *VvPDS3*-dn – 5' CATTACAACCTTTTATGGCTTGGATC 3'

U tablici 3.7.2.1 priložena je pripremljena reakcijska smjesa.

Tablica 3.7.2.1. Sastav smjese za PCR s DNA polimerazom *EmeraldAmp*.

Komponenta	V (μL)
2× <i>EmeraldAmp Mastermix</i>	10
<i>VvPDS2/3</i> -up (<i>c</i> = 10 μM)	0,4
<i>VvPDS2/3</i> -dn (<i>c</i> = 10 μM)	0,4
genomska DNA	1
destilirana voda	8,2

Reakcija je provedena uz uvjete prikazane u tablici 3.7.2.2.

Tablica 3.7.2.2. Uvjeti PCR reakcije pripremljene prema tablici 3.7.2.1.

Korak	T (°C)	t (s)
Inicijalna denaturacija	95	120
35 ciklusa	95	30
	53/ 55*	30
	72	60
Finalna ekstenzija	72	300

*Prva temperatura se odnosi na reakciju s početnicama *VvPDS3*, a druga s početnicama *VvPDS2*.

DNA Polimeraza *OneTaq*, (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, SAD), korištena je u *colony* PCR-u za provjeru uspješnosti dvaju kloniranja reakcijom *In-Fusion*. Kao kalup korištene su lizirane stanice bakterijskih kolonija nastale nasađivanjem stanica transformiranih produktom reakcije *In-Fusion* na selektivne hranjive podloge. Čačalicom se ubode jedna kolonija te resuspendira u 10 μ L destilirane vode, a 1 μ L smjese kalup je za PCR. Stanice se liziraju u produljenom koraku inicijalne denaturacije na 98 °C. Reakcijska smjesa je pripremljena prema tablici 3.7.2.3.

Tablica 3.7.2.3. Sastav smjese za PCR s DNA polimerazom *OneTaq*.

Komponenta	V (μ L)
gRNA218IF-up (c = 2 μ M)	2,5
gRNA218IF-dn (c = 2 μ M)	2,5
lizirane stanice	1
<i>OneTaq 2\times Master Mix with Standard Buffer</i>	12,5
destilirana voda	do 25

Uvjeti PCR reakcije priloženi su u tablici 3.7.2.4.

Tablica 3.7.2.4. Uvjeti PCR reakcije pripremljene prema tablici 3.7.2.3.

Korak	T (°C)	t (s)
Inicijalna denaturacija	98	180
35 ciklusa	94	30
	47	30
	68	30
Finalna ekstenzija	68	300

3.8. Cijepanje DNA restrikcijskim endonukleazama

Korištena su tri restrikcijska enzima proizvođača New England Biolabs (*BbsI*, *DdeI*, *Hpy188III*) te dva restrikcijska enzima proizvođača ThermoFischer (*DraI*, *PagI*). Za enzime *BbsI* i *Hpy188III* korišten je pufer *CutSmart*, za *DdeI* pufer 3.1, za *DraI* pufer *FastDigest*, a za *PagI* pufer O, prema uputama proizvođača. Reakcijske smjese pripremljene su prema tablici 3.8.1.

Tablica 3.8.1. Sastav smjese za reakcije cijepanja DNA restrikcijskim endonukleazama.

Komponenta	V (μ L)
10 \times pufer	2
kalup*	X
restrikcijski enzim	0,5
destilirana voda	do 20

*U reakciju je stavljeno 2 μ L ukoliko je kalup bio PCR produkt te 1 μ L u slučaju cijepanja plazmida.

Reakcijske smjese inkubirane su na 37 °C, 60 min (za enzime *DraI*, *PagI* i *BbsI*), ili preko noći (za enzime *Hpy188III* i *DdeI*) kada nam je bilo potrebno potpuno cijepanje kalupa.

3.9. Agarozna gel-elektroforeza

Produkte PCR-a i restrikcijskih reakcija analizirali smo elektroforetski. Elektroforezu smo provodili na 1%-tnom agaroznom gelu u 15 ili 30 mL 1 \times pufera TAE, ovisno o potrebnom broju jažica, uz dodatak 0,75 ili 1,5 μ L interkalirajuće boje 20 000 \times GelStar (Lonza Group AG, Basel, Švicarska). Elektroforeza je provođena u sustavu *OneRun Electrophoresis Cell*, (EmbiTec, San Diego, California, SAD). U jažice smo nanosili 1 μ L uzorka za plazmidnu DNA, 2 μ L za PCR produkte i genomsku DNA, 5 μ L za restrikcijske reakcije koje su nam bile potrebne za daljnje korake kloniranja te čitav reakcijski volumen za pročišćavanje DNA iz gela i za restrikcijske reakcije koje su nam služile za provjeru uspješnosti kloniranja. Svakom uzorku dodavali smo šestinu konačnog volumena boje za nanošenje na gel 6 \times *Purple Loading Dye*. Za volumene manje od 6 μ L dodavali smo i destiliranu vodu do konačnog volumena 6 μ L. Boju i destiliranu vodu nije bilo potrebno dodavati za PCR produkte polimeraza *EmeraldAmp* i *OneTaq* jer su one već sadržavale boju za nanošenje na gel. Na svaki gel nanosili smo i 2 μ L markera *GeneRuler DNA Ladder Mix* (ThermoFischer, Waltham, Massachusetts, SAD). Elektroforezu smo provodili na 75 V, 30 min, za bolje razlučivanje fragmenata, ili na 100 V, 15 min. Gel smo vizualizirali u transiluminatoru *Uvitec* te snimali kamerom EDAS 290 (Kodak, Rochester, New York, SAD). Fotografije su uređene u programu *IrfanView*.

3.10. Izolacija DNA

3.10.1. Izolacija plazmidne DNA

Sve izolacije plazmida provedene su koristeći komercijalni komplet *Wizard Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega, Madison, Wisconsin, SAD), prema uputama proizvođača:

Bakterijske stanice iz prekonoćnih tekućih kultura (3 mL) istalože se centrifugirajući 5 min na 10 000 g. Sva centrifugiranja provode se na sobnoj temperaturi. Stanice se centrifugiraju u dva ciklusa s obzirom da je kapacitet mikroeprevete 1,5 mL. Nakon svakog ciklusa centrifugiranja uklanja se supernatant te se talog resuspendira u 250 μ L *Cell Resuspension Solution*. Nakon toga dodaje se 250 μ L *Cell Lysis Solution* pri čemu stanice liziraju, a u otopinu se ispušta plazmidna DNA. Slijedi inkubacija 1-5 min na sobnoj temperaturi dok se smjesa ne razbistri. Zatim se dodaje 10 μ L *Alkaline Protease Solution* koja inaktivira DNaze i ostale proteine koji bi interferirali s izolacijom, a otopina se inkubira 5 minuta na sobnoj temperaturi. Suspenzija stanica se neutralizira s 350 μ L *Neutralization Solution* koja uzrokuje precipitaciju proteina i genomske DNA te renaturaciju plazmidne DNA. Slijedi centrifugiranje 10 min na 16 000 g. Supernatant se prebacuje u kolonu smještenu u epruvetu za skupljanje eluata. Slijedi centrifugiranje, 1 min na 16 000 g, pri čemu se DNA veže za kolonu. Eluat se baca, a kolona se ispiri sa 750 μ L *Column Wash Solution* s prethodno dodanim 96%-tnim etanolom, te provodi centrifugiranje, 1 min na 16 000 g, a eluat se baca. Prethodni korak se ponavlja s 250 μ L *Column Wash Solution*. Zatim, provodi se suho centrifugiranje, 2 min na 16 000 g, kako bi se uklonio zaostali etanol. Konačno, DNA se eluira s kolone u 100 μ L *Nuclease Free Water* u mikroeprevetu (1,5 mL).

3.10.2. Izolacija biljne genomske DNA

Biljna genomska DNA izolirana je pomoću komercijalnog kompleta *NucleoSpin Plant II*, (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka), prema protokolu proizvođača.

Do 100 mg lista smjesti se u mikroeprevetu te smrzne u tekućem dušiku. Tkivo se homogenizira u tarioniku ili homogenizatoru pri čemu se mora paziti da tkivo ostane kontinuirano smrznuto. Nakon homogenizacije stanice se liziraju dodavanjem 400 μ L pufera za lizu PL1, a RNA se razgrađuje s 10 μ L RNaze A. Uzorak se inkubira 10 min na 65 °C u

termobloku *Thermomixer Comfort* (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) uz povremeno vorteksiranje. Zatim, slijedi centrifugiranje 5 min na 11 000 g. Sva centrifugiranja se provode na sobnoj temperaturi. Supernatant se prebacuje u kolonu *NucleoSpin Filter* u svrhu uklanjanja krutog lizata. Uzorci se centrifugiraju 2 min na 11 000 g. Kolona s filterom se baci, a filtratu se dodaje 450 µL pufera PC koji omogućuje vezanje DNA u koloni *NucleoSpin Plant II Column*, u koju se premješta uzorak. Slijedi centrifugiranje 1 min na 11 000 g. Eluat se baca. Potom, kolonica se ispiri s 400 µL pufera PW1 pa dvaput s puferom PW2 (700 µL u prvom ispiranju, 200 µL u drugom). Nakon svakog ispiranja uzorci se centrifugiraju na 11 000 g: 1 min za prva dva ispiranja te 2 min za zadnje ispiranje. Eluat se baca nakon svakog ispiranja. U posljednjem koraku kolonica se prebacuje u mikroeprijetu (1,5 mL), a u kolonicu se dodaje 50 µL elucijskog pufera prethodno zagrijanog na 65 °C. Uzorci se inkubiraju 5 min na 65 °C u termobloku *Thermomixer Comfort* (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Slijedi centrifugiranje 1 min, na 11 000 g. Postupak se ponavlja još jednom s novih 50 µL elucijskog pufera. Kolonica se odbacuje, a u mikroeprijeti se nalazi izolirana genomska DNA.

3.11. Pročišćavanje DNA

Za kloniranja *NEBuilder* i *In-Fusion* bila je potrebna pročišćena DNA kako bismo se riješili soli koje bi mogle interferirati s reakcijom kloniranja. Pročišćavanje je provedeno koristeći komercijalni komplet *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, Wisconsin, SAD), prema uputama proizvođača:

Produkt inverznog PCR-a (vidi 3.7.1) pročišćen je direktno iz agaroznog gela kako se zaostali kalup iz PCR reakcije ne bi transformirao u bakterije nakon *In-Fusion* reakcije i dao lažno-pozitivne rezultate. Ostala pročišćavanja provedena su direktno iz PCR reakcije. U slučaju inverznog PCR-a fragment od interesa izrezan je i smješten u mikroeprijetu i izvagan. U mikroeprijeti se dodaje onoliko mikrolitara *Membrane Binding Solution*, koliko je miligrama gela u mikroeprijeti. Fragment se otapa u vodenoj kupelji na 65 °C. Za sva ostala pročišćavanja smjesi je dodan jednak volumen *Membrane Binding Solution*. Ostali koraci identični su za oba oblika pročišćavanja. Otopina se prebaci u kolonicu smještenu u tubicu za skupljanje eluata i inkubira 1 min na sobnoj temperaturi. Zatim slijedi centrifugiranje, 1 min. Sva se centrifugiranja provode na sobnoj temperaturi, pri brzini 16 000 g. Potom, eluat se uklanja, a na kolonicu se dodaje 700 µL *Membrane Wash Solution*. Sijedi centrifugiranje, 1 min, nakon čega se eluat baca. Taj korak se ponavlja uz dvije preinake: dodaje se 500 µL *Membrane Wash solution*, uz 5 minuta centrifugiranja. Nadalje, provodi se suho centrifugiranje (1 min), kako bi ispario rezidualni etanol. Kolonica se premješta u mikroeprijeti. Dodaje se

50 μ L *Nuclease Free Water* uz inkubaciju 1 min na sobnoj temperaturi. Slijedi konačno centrifugiranje, 1 min. Kolonika se baca, a u eluatu se nalazi pročišćena DNA.

3.12. Koncentriranje DNA

Koncentriranje DNA provođeno je u uređaju *Thermo Savant DNA 120 SpeedVac*, (ThermoFischer, Waltham, Massachusetts, SAD), uz postavke uređaja namještene na: *Heater, Auto, Drying rate: High*. Vrtinja je zaustavljana u intervalima od 5 ili 10 min s ciljem provjere postizanja željenog volumena.

3.13. Mjerenje koncentracije DNA

Koncentraciju DNA mjerili smo nakon izolacije plazmida i genomske DNA te nakon pročišćavanja DNA. Mjerenje smo vršili spektrofotometrijski pri valnoj duljini $\lambda = 260$ nm na uređaju *NanoVue Plus Spectrophotometer* (GE Healthcare, Chicago, Illinois). Kao slijepa proba koristi se 2 μ L tekućine kojom je DNA eluirana, u našem slučaju *Nuclease Free Water*, a za mjerenje 2 μ L uzorka.

3.14. Kloniranje DNA u plazmidni vektor

3.14.1. Kloniranje metodom *In-Fusion*

Produkti PCR-a s plazmidom pMR218+VvPDS1 kao kalupom i intaktnim plazmidom pMR218 kao kalupom (vidi 3.7.1) ugrađeni su u okosnicu plazmida pMR396, dobivenu inverznim PCR-om s lineariziranim pMR396 kao kalupom, dvjema reakcijama kloniranja *In-Fusion*. *In-Fusion* je strategija kloniranja, a temelji se na aktivnosti smjese enzima koji pomoću preklapajućih homolognih sljedova povezuje fragmente DNA na temelju 15 bp homologije na krajevima fragmenata. Korišten je komercijalni komplet *In-Fusion® HD Cloning Kit* (TakaraBio, Kusatsu, Shiga, Japan). Pripremljena je reakcijska smjesa prema tablici 3.14.1.1.

Tablica 3.14.1.1. Sastav reakcijske smjese za kloniranje *In-Fusion*.

Komponenta	V (μL)
1. Pročišćeni insert (218+VvPDS1)*	X
2. Pročišćeni insert (prazni 218)*	Y
Pročišćena okosnica plazmida pMR396*	Z
5× <i>In-Fusion HD Enzyme Premix</i>	2
destilirana voda	do 10

*Volumen koji odgovara masi 50 ng.

Reakcija je provedena u termobloku *Thermomixer Comfort* (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) na 50 °C, 15 min. Produkt je, prije transformacije, pohranjen u zamrzivač na -20 °C.

3.14.2. Kloniranje metodom *NEBuilder*

NEBuilder (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts) metoda je kloniranja koja se temelji na ugradnji jednolančane ili dvolančane DNA (u našem slučaju gDNA) na temelju homologije krajeva inserta s krajevima lineariziranog vektora u koji se ugrađuje. S obzirom da je gRNA potrebno ugraditi u plazmid pMR218 nizvodno od promotora U6-26, a uzvodno od tracrDNA kloniranjem *NEBuilder*, središnjih 20 nukleotida gDNA specifično je za gen od interesa, ali rubnih 25 nukleotida sa svake strane mora biti homologno krajevima lineariziranog plazmida u koji se jednolančana DNA ugrađuje. Fuzijskom ekspresijom gDNA i tracrDNA nastaje RNA koja stvara kompleks s proteinom Cas9 i odgovorna je za specifično djelovanje sustava CRISPR-Cas9. Korištene su tri različite jednolančane gDNA, specifične za pojedine gene/ alele vinove loze:

1. gDNA-VvPDS1, specifična za alel gena *VvPDS* s *Ddel* mjestom – 5' ACAGCTAGAGTCGAAGTAGTGATTGCATTT**CATTATTCCTCAGG**AGTTTTAGAGCTAGAA ATAGCAAGTT 3'

2. gDNA-VvPDS2, specifična za alel gena *VvPDS* bez *Ddel* mjesta – 5' ACAGCTAGAGTCGAAGTAGTGATTGCATTT**CATTATTCCTCAAG**AGTTTTAGAGCTAGAA ATAGCAAGTT 3'

3. gDNA-VvMybA1, specifična za tri srodna lokusa *VvMybA1*, *VvMybA2*, *VvMybA3* – 5' ACAGCTAGAGTCGAAGTAGTGATTG**ACGAGGTTGATCTCATG**ATTGTTTTAGAGCTAGA AATAGCAAGTT 3'

Plavom bojom označeni su dijelovi gRNA specifični za pojedini gen. Provedena su tri različita *NEBuilder* kloniranja:

1. Ugradnja gDNA-*VvPDS1* u plazmid pMR218 lineariziran restriksijskim enzimom *BbsI* kao prvi od dva koraka dobivanja vektora pMR396+218+*VvPDS1*.
2. Ugradnja gDNA-*VvPDS2* u jednom koraku u plazmid pMR396+218 lineariziran restriksijskim enzimom *BbsI*.
3. Ugradnja gDNA-*VvMybA1* u jednom koraku u plazmid pMR396+218 lineariziran restriksijskim enzimom *BbsI*.

Korišten je komercijalni komplet *NEB HiFi Assembly Kit* (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA). Prema uputama proizvođača, pripremljene su reakcijske smjese prikazane u tablici 3.14.2.1.

Tablica 3.14.2.1. Sastav reakcijske smjese za kloniranje *NEBuilder*.

Komponenta	V (µL)
1. Linearizirani i pročišćeni pMR218	X*
2. Linearizirani i pročišćeni pMR218+396	
3. Linearizirani i pročišćeni pMR218+396	
1. ssDNA, <i>VvPDS1</i> (c = 50 nmol/ L)	0,5
2. ssDNA, <i>VvPDS1</i> (c = 50 nmol/ L)	
3. ssDNA, <i>VvMybA1</i> (c = 50 nmol/ L)	
2× <i>NEBuilder HiFi DNA Mastermix</i>	5
Destilirana voda	do 11

*Volumen koji odgovara masi 100 ng.

Reakcija je provedena u PCR uređaju *T100 Thermal Cycler* (Bio-Rad, Hercules, California, SAD), na 50 °C, 20 min.

3.14.3. TA kloniranje

TA kloniranje provodili smo kako bismo PCR fragmente gena *VvPDS* ugradili u plazmid pGEM te ih tako omeđili početnicama za Sangerovo sekvenciranje s ciljem genotipizacije regije s obzirom na *Ddel* restriksijsko mjesto, te detekcije DSB induciranog sustavom CRISPR-Cas9. Korišten je komercijalni komplet *pGEM-T Easy Vector System I* (Promega, Madison, Wisconsin, SAD). Reakcijska smjesa pripremljena je prema tablici 3.14.3.1.

Tablica 3.14.3.1. Sastav reakcijske smjese za TA-kloniranje.

Komponenta	V (μ L)
2 \times <i>Rapid Ligation Buffer</i>	5
<i>pGEM[®]-T Easy Vector</i> ($\gamma = 50$ ng/ μ L)	0,5
insert*	X**
<i>T4 DNA Ligase</i>	0,5
destilirana voda	do 10

*Inserti za pojedine reakcije bili su pročišćeni PCR produkti regije gena *VvPDS* omeđene početnicama *VvPDS2*-up i -dn na netretiranom teranu i PMC te početnicama *VvPDS3*-up i -dn na malvaziji istarskoj podvrgnutoj vakuumskoj agroinfiltraciji i teranu podvrgnutom biolistici.

**Volumen koji odgovara masi 75 ng.

Ligacijska smjesa inkubirana je 60 min na sobnoj temperaturi pa prekončno u PCR uređaju *T100 Thermal Cycler* (Bio-Rad, Hercules, California, SAD) na 4 °C.

3.15. Vakuumska agroinfiltracija

Tri prekončne tekuće kulture agrobakterija s plazmidom pCB301-p19 te s plazmidom pMR396+218+*VvPDS1* prebace se zasebno u plastične epruvete (15 mL) i centrifugiraju 10 min na 3 000 rpm. Supernatant se odlijeva, a talog resuspendira u 3 mL pufera za agroinfiltraciju uz dodatak 3 μ L acetosiringona ($c_0 = 100$ mmol/ L). Bakterije se smještaju u tresilicu preko noći na 28 °C (250 rpm). Agrobakterije s plazmidom pMR396+218+*VvPDS1* se zajedno premjeste u jednu epruvetu, a agrobakterije s plazmidom pCB301-p19 u drugu, i dobro promiješaju. Bakterijama se zatim izmjeri optička gustoća. Zatim smo u pločicu sa šest jažica, u pet jažica dodali agrobakterije i pufer za agroinfiltraciju do $OD_{600} = 1$ te konačnog volumena $V = 5$ mL. U šestu jažicu dodaje se 0,25%-tni bromfenol plavo razrijeđen destiliranom vodom do konačnog masenog udjela $\omega = 0,01\%$ te volumena $V = 5$ mL. Jažica s bromfenol plavim priprema se s ciljem kontrole penetracije tekućine u međustanične prostore listova. U svaku jažicu dodano je i 5 μ L 100%-tnog tritona (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Njemačka), s ciljem smanjenja površinske napetosti. S odrasle biljke malvazije istarske otkinuto je šest mladih listova i po jedan je potopljen u svaku jažicu. Pločica se smjesti u stakleno zvono (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Njemačka) spojeno na vakuum. Vakuum se primijeni te drži 20 min, pri čemu iz međustaničnog prostora izlazi zrak vidljiv u obliku mjehurića, nakon čega se vakuum počne lagano otpuštati, pri čemu suspenzija bakterija ulazi u međustanične prostore. Listovi se smjeste u Petrijevu zdjelicu s vlažnim filter-papirom, zatvore parafilmom te

ostave u mraku. Nakon 2-5 dana, prije nego što listovi počnu žutjeti, uzorci se smrznu u tekućem dušiku i izolira im se genomska DNA.

3.16. Biolistika

3.16.1. Priprema alikvota čestica zlata

Korišteno je zlato *0,6 μm Gold Microcarriers* (Bio-Rad, Hercules, California, SAD). Alikvoti su pripremljeni na sljedeći način. Odvaži se 60 mg zlata u mikroepruvetu (2 mL). Zatim, dodaje se 1 mL ledenog 96%-tnog etanola i resuspendira pipetiranjem (2 min) i vorteksiranjem (1 min). Slijedi sonikacija (1 min) pa centrifugiranje 15 s na 10 000 rpm i 4 °C. Etanol se uklanja pa slijede tri ciklusa ispiranja s 1 mL ledenog 96%-tnog etanola i centrifugiranja (1 min na 5 000 rpm i 4 °C). Nakon zadnjeg ispiranja etanol se uklanja, a zlato se resuspendira u 1 mL destilirane vode uz vorteksiranje (1 min). Odvajaju se alikvoti od 50 μL.

3.16.2. Priprema kompleksa DNA i čestica zlata

Alikvotu čestica zlata (50 μL) dodaje se 5 μL plazmida pMR396+218+VvPDS1 ($c = 10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) te 5 μL plazmida pMR396+218+VvPDS2 ($c = 10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) na stijenku mikroepruvete, 20 μL filter-sterilizirane 0,1 mol/L otopine spermidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) na suprotnu stijenku mikroepruvete te 50 μL 2,5 mol/L otopine kalcijeva klorida (Kemika, Zagreb, Hrvatska) u čep mikroepruvete. Spermidin i kalcijev klorid filter-steriliziran je pomoću filtera LLG-Syringe filters Spheros (LLG Labware, Meckenheim, Njemačka), veličine pore 0,22 μm. Mikroepruveta se zatim zatvori te lupi od stol s čepom okrenutim prema stolu. Slijede dva ciklusa vorteksiranja (20 s), centrifugiranja (13 000 rpm, 20 s) i ispiranja sa 150 μL 96%-tnog etanola. Tako pripremljena DNA drži se na ledu i spremna je za bombardiranje.

3.16.3. Bombardiranje

Nakon pripreme DNA slijedi namještanje uređaja za biolistiku *VvPDS-100/He Biolistic Particle Delivery System* (Bio-Rad, Hercules, California, SAD). Sve komponente uređaja i sam

prostor oko uređaja treba dobro dezinficirati etanolom. Namještanje uređaja prikazano je i objašnjeno na slici 3.16.3.1. Kada je uređaj postavljen, a biljno tkivo smješteno, primjenjuje se vakuum 26 inHg (88 kPa). Zatim se primjenjuje tlak helija koji probija disk za pucanje (od eng. *rupture disc*) pri 1350 psi (9308 kPa)). Uređaj se otvara i Petrijeva zdjelica poklapa. Provode se dva bombardiranja po jednom uzorku.



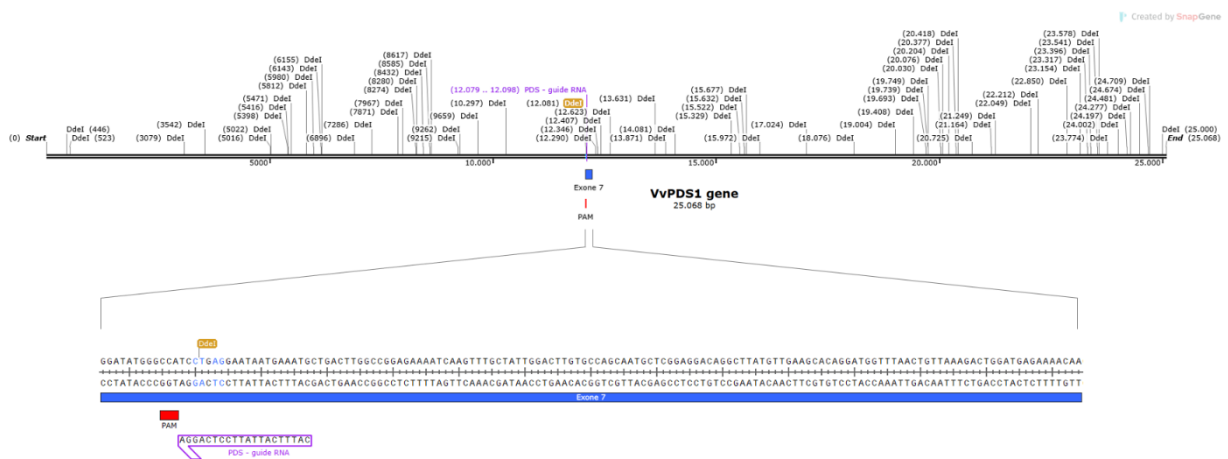
Slika 3.16.3.1. Komponente uređaja za biolistiku VvPDS-100/He *Biolistic Particle Delivery System* (Bio-Rad, Hercules, California, SAD). Vanjski izgled postavljenog uređaja (A). Postavljanje uređaja (B, C, D i E): Na makronosač (2) se nanosi 10 μ L kompleksa DNA i zlata. Potrebno je oko 10 min da se makronosač posuši. Potom mrežica za zaustavljanje (od eng. *stopping screen*) (3) smješta se na svoje postolje (4), Iznad mrežice smješta se makronosač sa stranom na koju je nanosena DNA okrenutom prema mrežici. Mrežica zaustavlja dijelove makronosača, koji će puknuti uslijed visokog tlaka, da završe u tkivu. Makronosač i mrežica učvršćuju se metalnim zatvaračem (1) kao što je prikazano na slici C.

Zatim, disk za pucanje (od eng. *rupture disc*) (6) smješta se u svoje postolje (5) kao što je prikazano na slici D. On puca pri tlaku karakterističnom za pojedini disk pri čemu se postiže da tlak helija dosegne optimalnu vrijednost prije nego što dospije do DNA kojom se tkivo bombardira. Postolje s mrežicom i makronosačem, kao i nosač diska za pucanje smještaju se na mjesto predviđeno u uređaju, a Petrijeva zdjelica s biljnim tkivom postavlja se ispod, kao što je prikazano na slici E. Neposredno prije bombardiranja, poklopac Petrijeve zdjelice se uklanja, a vakuum-komora uređaja se zatvara.

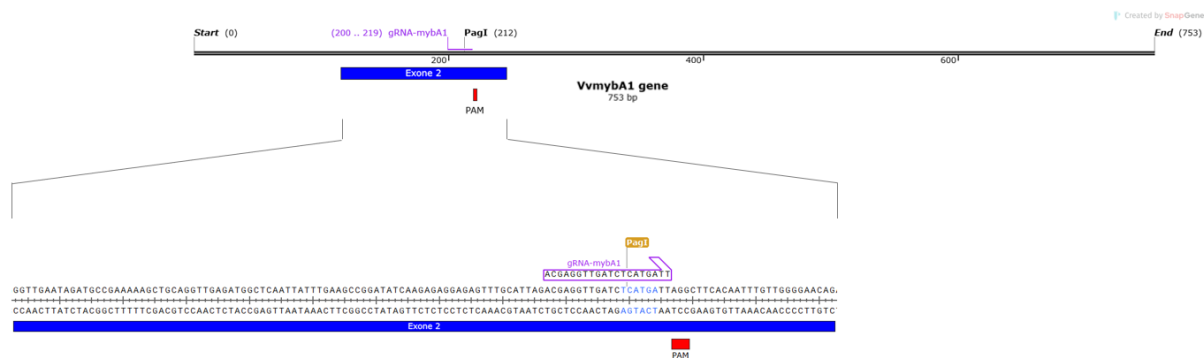
4. Rezultati

4.1. Dizajn gRNA (sgRNA)

Pri dizajnu gRNA bilo je ključno naći regiju u genu *VvPDS* (slika 4.1.1) i trima srodnim lokusima *VvMybA1* (slika 4.1.2), *VvMybA2* i *VvMybA3* uz koju se uzvodno nalazi sekvenca PAM (5' NGG 3'). Također, uzvodno od sekvence PAM tražili smo restriksijsko mjesto pogodno za detekciju mutacija nakon DSB. Odabrano je restriksijsko mjesto za enzim *DdeI* (gen *VvPDS*), odnosno, za enzim *PagI*, (gen *VvMybA*). Uslijed insercijsko-delecijskih mutacija nastalih djelovanjem sustava CRISPR-Cas9 i nepreciznim popravkom DNA, očekuju se pomaci u okvirima čitanja gena, a time i nastanak nefunkcionalnog proteinskog produkta, pa je gRNA locirana u sedmom eksonu, za gen *VvPDS*, odnosno, u drugom eksonu, za gen *VvMybA*, čime očekujemo da mutacijski događaj dobije fenotipsku dimenziju. Konkretnije, bialelne mutacije gena *VvPDS*, koji kodira za fitoen desaturazu - ključnu sastavnicu beta-karotenskog biokemijskog puta, rezultiraju izostankom klorofila u listovima (Nakajima i sur., 2017). S druge strane izostanak pigmentacije u bobicama uočava se u biljaka s nefunkcionalnom proteinom MybA1 koji sudjeluje u putu sinteze antocijana (This i sur., 2007).



Slika 4.1.1. Fizička mapa gena *VvPDS* u vinovoj lozi s izdvojenim sedmim eksonom. Naznačene su sekvenca PAM (crveno), palindrom koji prepoznaje restriksijska endonukleaza *DdeI* (plavo) te mjesto vezanja gRNA (ljubičasto). Slika je izrađena u programu *SnapGene*.



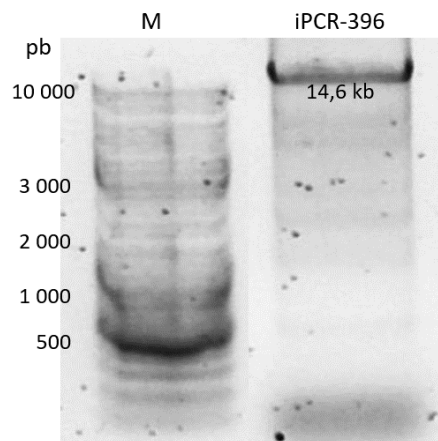
Slika 4.1.2. Fizička mapa gena *VvMybA1* u vinovoj lozi s izdvojenim drugim eksonom. Naznačene su sekvenca PAM (crveno), palindrom koji prepoznaje restriksijska endonukleaza *PagI* (plavo) te mjesto vezanja gRNA homologno za sva tri *VvMyb* lokusa (ljubičasto). Slika je izrađena u programu *SnapGene*.

4.2. Konstrukcija plazmida

4.2.1. Konstrukcija plazmida pMR396+218+*VvPDS1*

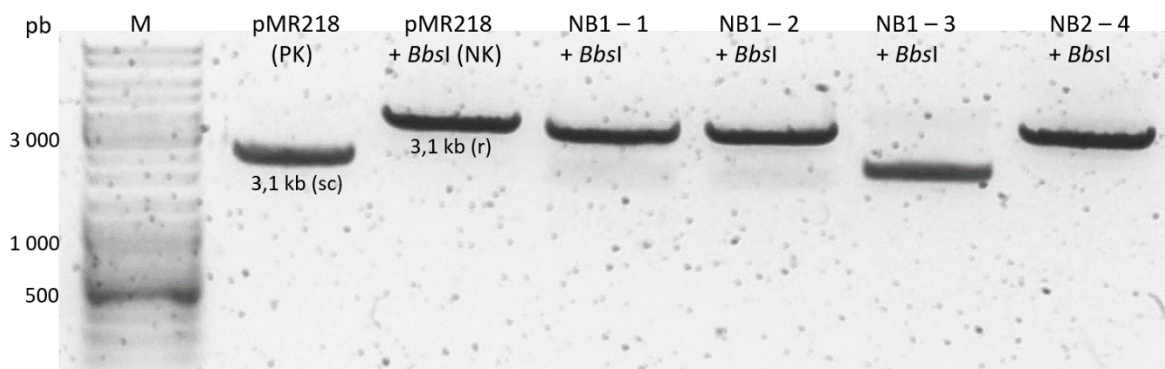
Bilo je potrebno konstruirati plazmid kojim ćemo transformirati biljni materijal i s kojeg će se eksprimirati elementi CRISPR-Cas9 sustava: nukleaza Cas9 i gRNA.

Inverznim PCR-om s plazmidom pMR396 (Cas9 vektor) kao kalupom postigli smo tri cilja: linearizirali smo plazmidni vektor, uklonili smo dio plazmida koji nije neophodan za djelovanje sustava CRISPR-Cas9 kako bi maksimalno smanjili veličinu krajnjeg konstrukta, i u konačnici, umnožili smo PCR produkt koji je vizualiziran na agaroznom gelu (slika 4.2.1.1.). Može se zaključiti na osnovu intenziteta vrpce kako prinos amplikona nije velik. No, s obzirom na duljinu PCR produkta (14 586 bp), to je bilo očekivano.



Slika 4.2.1.1. Analiza uspješnosti inverznog PCR-a s plazmidom pMR396 kao kalupom, agaroznom gel-elektroforezom. Označene su veličine fragmenata markera (M) i amplicona od interesa (iPCR-396).

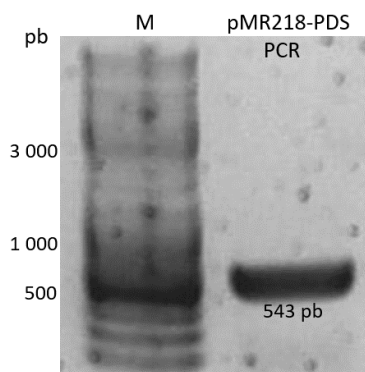
Plazmid pMR218 (gRNA vektor) najprije je lineariziran pomoću restriksijske endonukleaze *Bbsl*. Jednolančana gDNA specifična za gen *VvPDS* ugrađena je u pročišćeni linearizirani pMR218 reakcijom *NEBuilder*. Uspješnost reakcije *NEBuilder* provjerena je restriksijskim enzimom *Bbsl*. Plazmid pMR218 u kojemu nije došlo do ugradnje posjeduje *Bbsl* restriksijsko mjesto, a u slučaju ugradnje ono se gubi. Intaktni plazmidi nalaze se u superzavijenoj formi i brže putuju kroz agarozni gel (slika 4.2.1.2 – PK) od lineariziranih koji se nalaze u relaksiranoj formi (slika 4.2.1.2 – NK). Jedna kolonija (slika 4.2.1.2 - NB1-3) bila je pozitivna i taj plazmid je korišten za daljnje kloniranje.



Slika 4.2.1.2. Restriksijska provjera uspješnosti kloniranja *NEBuilder*. Redom su nanoseni: marker (M); pozitivna kontrola (PK) – intaktni pMR218; negativna kontrola (NK) – linearizirani pMR218, plazmidi izolirani iz četiriju kolonija nastalih iz bakterija transformiranih produktom kloniranja *NEBuilder* inkubirani s enzimom *Bbsl* (NB1 1-4 + *Bbsl*). Označene su veličine fragmenata markera te superzavijenog (sc) i relaksiranog (r) oblika plazmida pMR218.

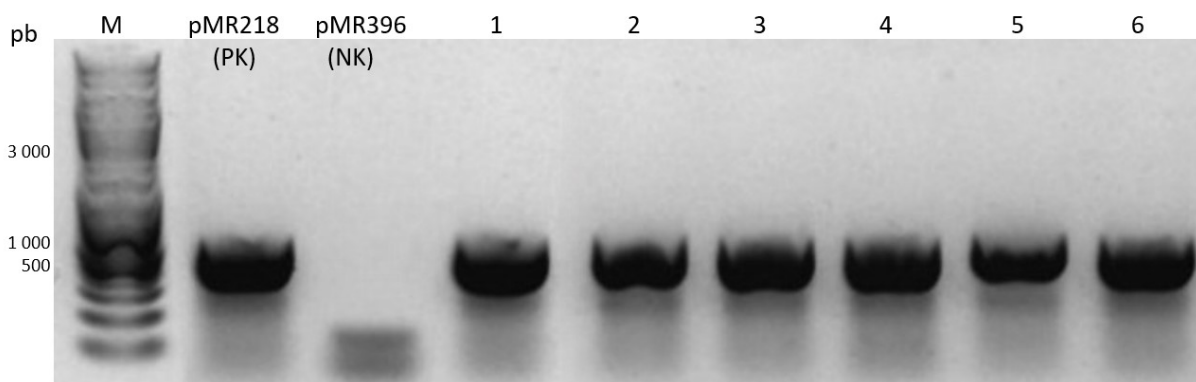
Fragment koji uključuje promotor U6-26 i gDNA-*VvPDS1*, a omeđen je početnicama gRNA218IF-up i gRNA218IF-dn koje sadrže 5' homologne sljedove, umnožen je PCR-om (slika 4.2.1.3). Zatim, provedeno je *In-Fusion* kloniranje: fragment je pročišćen i ugrađen u

linearizirani pMR396 (dobiven inverznim PCR-om) na temelju homologije 5' stršćih krajeva s rubovima lineariziranog plazmida.



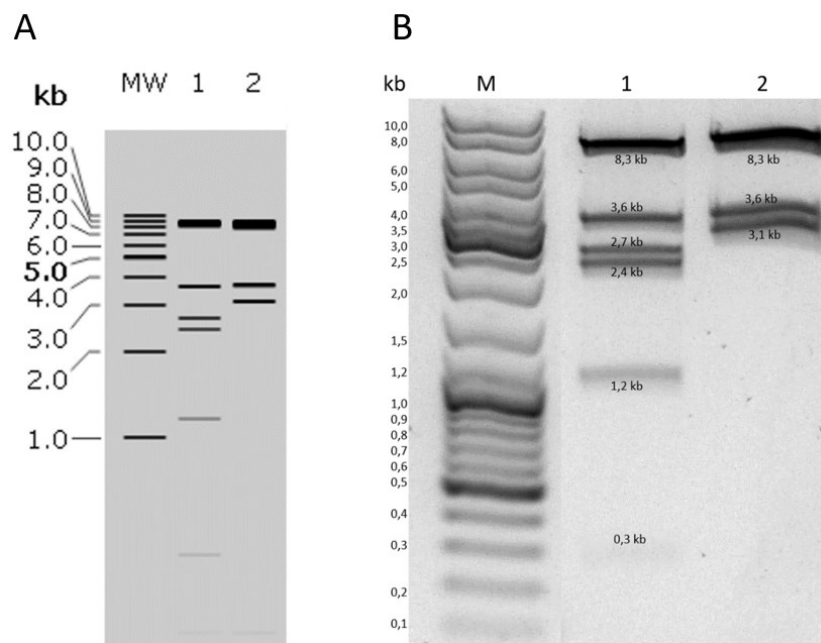
Slika 4.2.1.3. Analiza uspješnosti umnažanja inserta s *VvPDS*-gDNA za kloniranje *In-Fusion*. Označene su veličine fragmenata markera (M) i amplicona od interesa (pMR218-*PDS* PCR).

Uspješnost *In-Fusion* reakcije najprije ispitana je *colony* PCR-om s početnicama gRNA218IF-up i gRNA218IF-dn. PCR produkti vizualizirani su na agaroznom gelu (slika 4.2.1.4)



Slika 4.2.1.4. Provjera uspješnosti kloniranja *In-Fusion* pomoću *colony* PCR-a tijekom pripreme plazmida pMR396+218+*VvPDS*1. U prvoj jažici nanesen je marker, a zatim slijede PCR produkti sa sljedećim kalupima: pMR218 (pozitivna kontrola – PK), pMR396 (negativna kontrola – NK), plazmidi izolirani iz šest kolonija nastalih iz bakterija transformiranih produktom kloniranja *In-Fusion* (1-6).

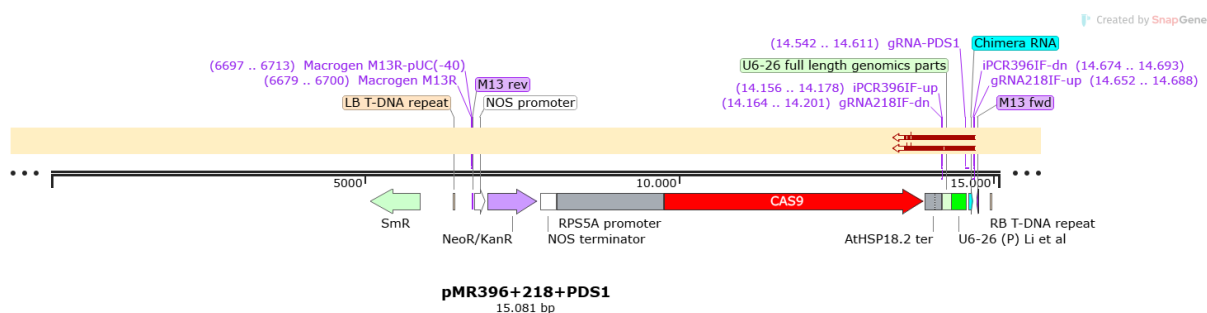
Sve reakcije bile su pozitivne s obzirom na prisustvo amplicona. Izolirana je plazmidna DNA, a ispravnost ugradnje ispitana je digestijom restriksijskim enzimom *Dra*I. Dobiveni fragmenti analizirani su agaroznom gel-elektroforezom. Na slici 4.2.1.5A prikazan je očekivani izgled restriksijskog obrasca, a na slici 4.2.15B agarozni gel koji smo dobili.



Slika 4.2.1.5. Restriksijska provjera uspješnosti pripreme plazmida pMR396+218+VvPDS1 kloniranjem *In-Fusion* enzimom *DraI*. Očekivani izgled restriksijskog obrasca s kontrolnim plazmidom pMR396 (1) i plazmidom pMR396+218+VvPDS1 (2), izrađen u programu *SnapGene* (A). Rezultat restriksijske reakcije vizualiziran na agaroznom gelu s ekvivalentnim oznakama i veličinama dobivenih fragmenata (B). M, MW – marker.

Izuzev najmanjeg fragmenta (77 bp) koji nije uočen ni kod kontrole (plazmid pMR396) ni kod pMR396+218+VvPDS1, fragmenti se podudaraju s očekivanim obrascem.

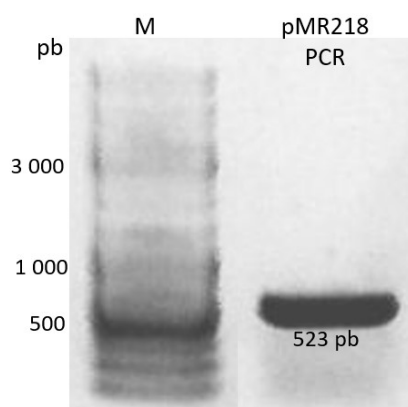
Konačno, dva plazmida poslana su na Sangerovo sekvenciranje pomoću primera M13-up čime su obuhvaćeni dio inserta i dio okosnice reakcije *In-Fusion*. Dobivene sekvence poravnane su na fizičku mapu plazmida pMR396+218+VvPDS1 uz potpuno poklapanje (slika 4.2.1.6). Time je dokazano da je *In-Fusion* reakcija dala željeni plazmid.



Slika 4.2.1.6. Provjera uspješnosti pripreme plazmida pMR396+218+VvPDS1 poravnanjem sekvencirane regije (označene crveno u žutom pravokutniku) dvaju plazmida, dobivenih kloniranjem *In-Fusion*, na fizičku mapu plazmida pMR396+218+VvPDS1. Slika je dobivena u programu *SnapGene*.

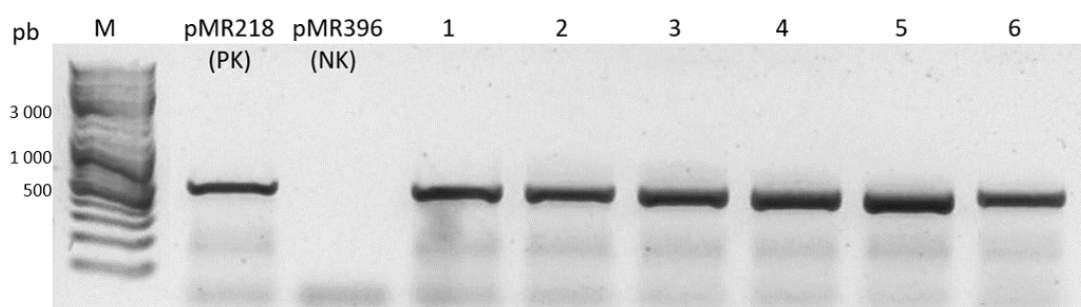
4.2.2. Strategija pripreme plazmida za genomsko editiranje u jednom koraku kloniranja

Paralelno s pripremom spomenutog plazmidnog produkta, razvijana je i strategija za pripremu plazmidnog vektora za CRISPR-Cas9 s ugradnjom gRNA u jednom koraku. Jednako kao i u standardnom protokolu, proveden je PCR s početnicama gRNA218IF-up i gRNA218IF-dn, no ovaj put kalup za reakciju PCR-a nije bio produkt kloniranja *NEBuilder*, već intakti plazmid pMR218 (slika 4.2.2.1).



Slika 4.2.2.1. Analiza uspješnosti umnažanja inserta plazmida pMR218 za kloniranje *In-Fusion*. Označene su veličine fragmenata markera (M) i amplikona od interesa (pMR218 PCR).

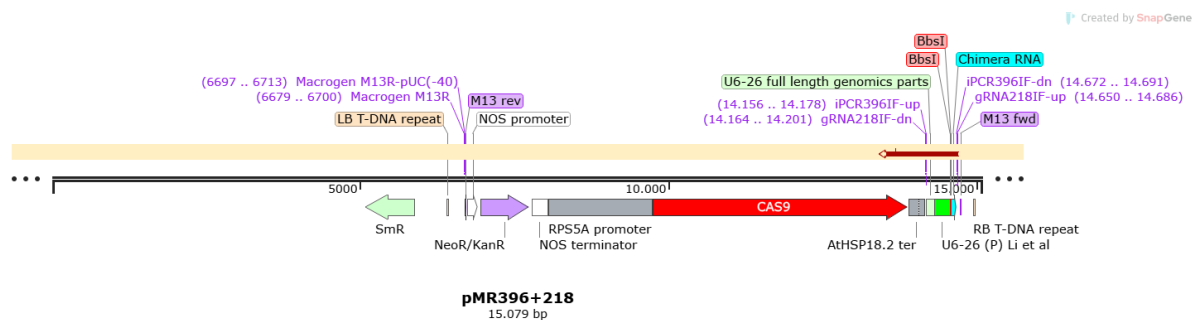
Protokol je bio jednak kao i za pripremu plazmidnog vektora pMR396+218+VvPDS1. Uspješnost reakcije *In-Fusion* također je provjerena pomoću *colony* PCR-a i svih šest ispitanih kolonija pokazale su ugradnju fragmenta (slika 4.2.2.2).



Slika 4.2.2.2. Provjera uspješnosti kloniranja *In-Fusion* pomoću *colony* PCR-a tijekom pripreme plazmida pMR396+218. U prvoj jažici nanesen je marker, a zatim slijede PCR produkti sa sljedećim kalupima: pMR218 (pozitivna kontrola – PK), pMR396 (negativna kontrola – NK), plazmidi izolirani iz šest kolonija nastalih iz bakterija transformiranih produktom kloniranja *In-Fusion* (1-6).

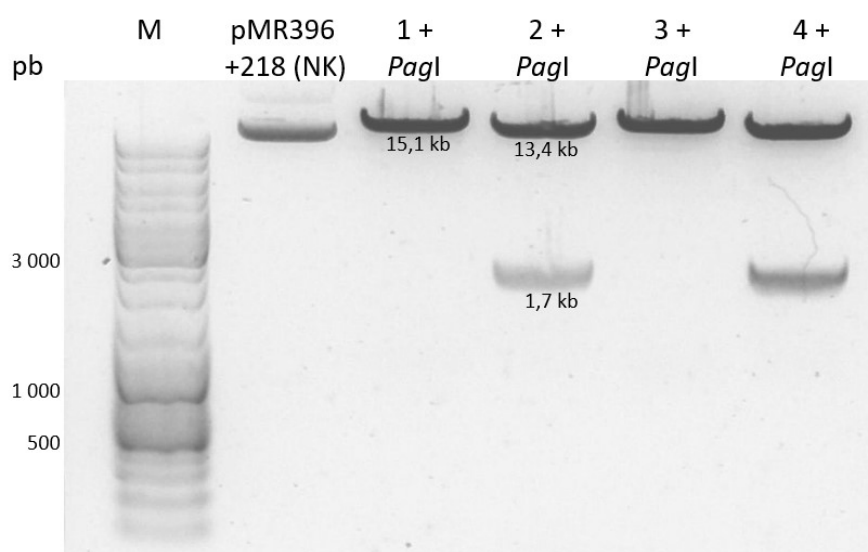
Izolirana je plazmidna DNA i dva plazmida poslana su na Sangerovo sekvenciranje pomoću početnice M13-up. Jedan plazmid je imao veliki broj preklapajućih signala na

elektroferogramu pa nije korišten za daljnje eksperimente. Sa sekvencom drugog plazmida napravljeno je poravnanje na fizičku mapu plazmida pMR396+218, prikazano na slici 4.2.2.3 s potpunim poklapanjem, čime je potvrđena uspješnost kloniranja.



Slika 4.2.2.3. Provjera uspješnosti pripreme plazmida pMR396+218 poravnanjem sekvencirane regije (označena crveno u žutom pravokutniku) plazmida, dobivenog kloniranjem *In-Fusion*, na fizičku mapu plazmida pMR396+218. Slika je dobivena u programu *SnapGene*.

Na taj način pripremljen je plazmidni vektor pMR396+218 koji je u jednom koraku restrikcije s enzimom *BbsI* te reakcije *NEBuilder* s gRNA od interesa, spreman za genomsko editiranje. Ispitana je funkcionalnost strategije s novom gRNA specifičnom za gen *VvMybA1*. Vektor je tretiran restrikcijskom endonukleazom *BbsI*, a zatim je provedeno kloniranje *NEBuilder*. Izolirana je plazmidna DNA, a ugradnja je potvrđena restrikcijskim enzimom. Plazmid u kojem nije došlo do ugradnje gRNA-*VvMybA1* posjeduje samo jedno *PagI* mjesto, pa nakon restrikcije se linearizira (15 081 bp), dok se u plazmidu s ugradnjom nalazi još jedno *PagI* mjesto pa nakon restrikcije očekuju se fragmenti duljine 13 376 bp i 1 705 bp. Prisustvo manjeg fragmenta, tj. ugradnja gRNA-*VvMybA1*, utvrđena je u plazmida 2 i 4 (slika 4.2.2.4).



Slika 4.2.2.4. Restrikcijska provjera uspješnosti kloniranja *NEBuilder*. Redom su nanoseni: marker (M); negativna kontrola (NK) – linearizirani pMR396+218, plazmidi izolirani iz četiriju kolonija nastalih iz

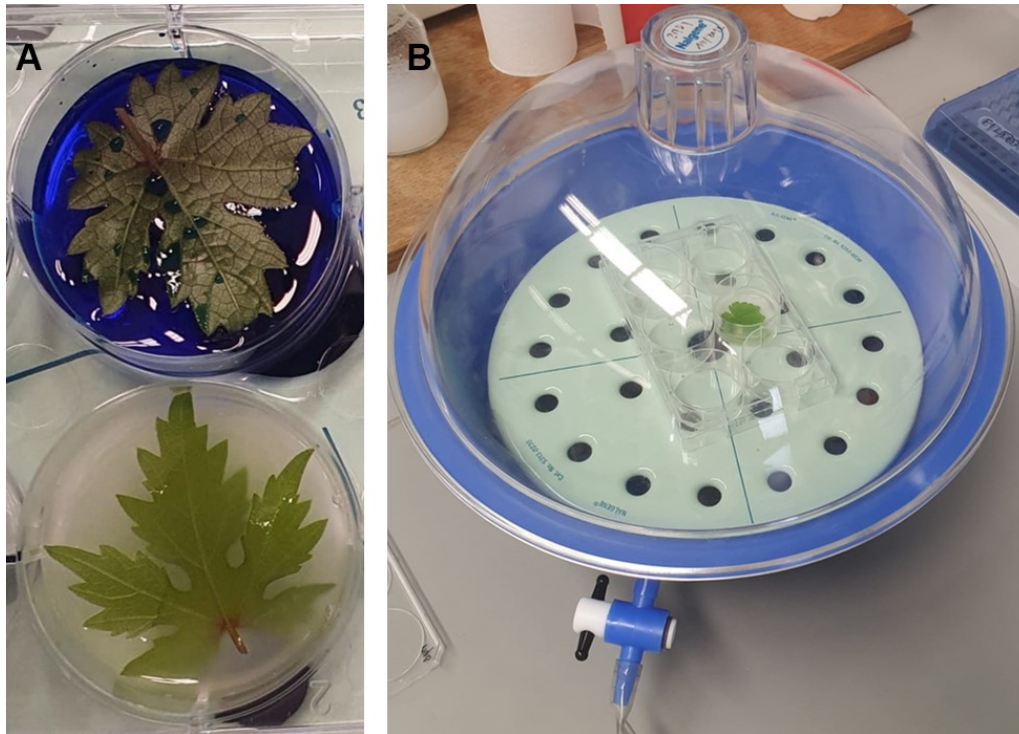
bakterija transformiranih produktom kloniranja *NEBuilder*, inkubirani s enzimom *PagI* (1-4 + *PagI*). Označene su veličine fragmenata markera te dobivenih fragmenata.

Dobiveni plazmid, pMR396+219+VvMybA1, nismo dospjeli dalje koristiti u ovom radu s obzirom na ograničeno vrijeme koje smo imali na raspolaganju. Istom strategijom je kasnije, za biolistiku, konstruiran plazmid pMR396+218+VvPDS2 s gRNA specifičnom za alel gena *VvPDS* bez *Ddel* mjesta.

4.3. Vakuumska agroinfiltracija na plavcu malom sivom

U svrhu provjere dobivenih vektora radili smo vakuumsku agroinfiltraciju. Prvu vakuumsku agroinfiltraciju provodili smo na mladim listovima biljke dobivene zigotnom embriogenezom (klasičnom samooplođnjom) kultivara PMS s obzirom da nam je taj biljni materijal prvi bio na raspolaganju.

Listovi se uranjaju u suspenziju agrobakterija transformiranih plazmidom pMR396+218+VvPDS1 i pCB301-p19 kao što je prikazano na slici 4.3.1A. List uronjen u otopinu bromfenol-plavog kontrola je ulaska tekućine u međustanične prostore. Listovi se smještaju u vakuumsko zvono (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Njemačka) u kojem se provodi agroinfiltracija (slika 4.3.1B).



Slika 4.3.1. Postavljanje vakuumske agroinfiltracije. Listovi kultivara PMS smješteni u otopinu agrobakterija transformiranih plazmidima pMR396+218+VvPDS1 i pCB301-p19 uoči vakuumske agroinfiltracije. List smješten u otopinu bromfenol-plavog kontrola je ulaska tekućine u međustanične prostore pri apliciranom vakuumu (A). Agroinfiltracija se provodi u staklenom zvonu koje se spaja na vakuum (B).

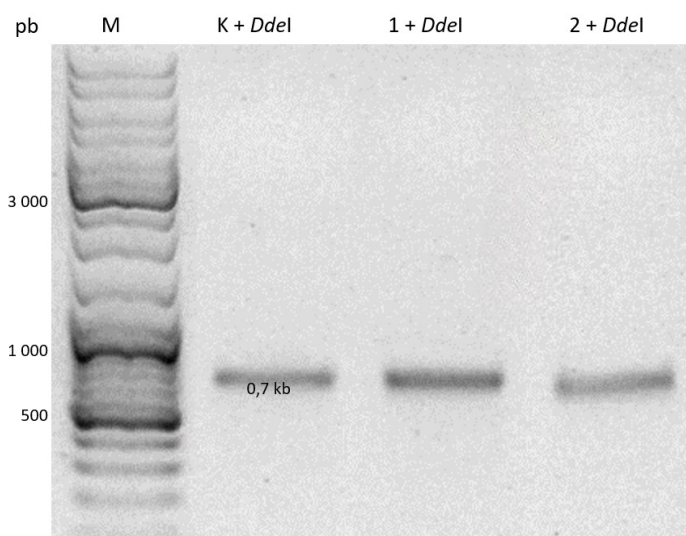
Primjenom vakuuma uočili smo pojavu mjehurića u području listova koji su znak otpuštanja zraka iz međustaničnih prostora koje je, nakon ponovnog puštanja zraka nadomjestila suspenzija agrobakterija. Listovi su nakon agroinfiltracije inkubirani u uvjetima visoke vlage 2-5 dana kako bi došlo do transformacije biljnih stanica, ekspresije i djelovanja gena sastava CRISPR-Cas9, ali i dijeljenja biljnih stanica čime bi se povećao broj stanica s modifikacijom gena *VvPDS*. Iako mutacije gena za fitoen desaturazu uzrokuju gubitak pigmentacije u listovima (Nakajima i sur., 2017), nismo uočili bijele sektore na listovima (slika 4.3.2). To je i u skladu s očekivanjima s obzirom da u periodu od 2-5 dana, na otkinutim listovima, nije moglo doći do dijeljenja stanica u mjeri koja bi bila vidljiva golim okom. Potom, uslijedila je genotipska detekcija targetinga.



Slika 4.3.2. Listovi kultivara PMS tri dana nakon vakuumske agroinfiltracije plazmidom pMR396+218+VvPDS1.

4.3.1 Genotipska analiza targetinga vakuumske agroinfiltracije na plavcu malom sivom

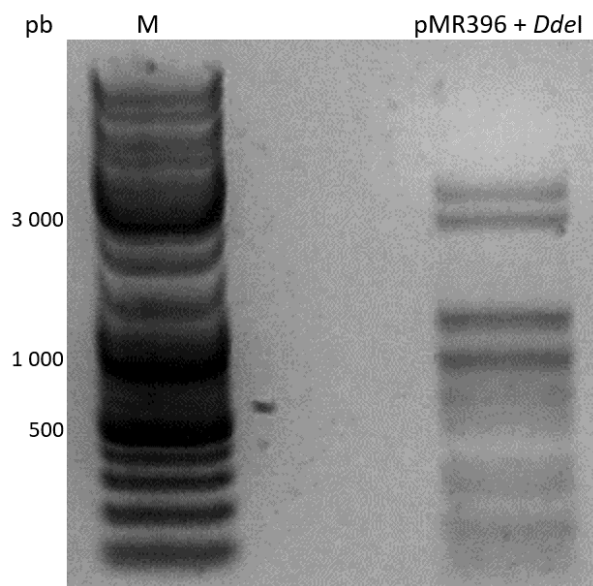
Iz listova je najprije izolirana genomska DNA. Zatim, proveden je PCR s početnicama VvPDS2-up i VvPDS2-dn kojima je umnožena regija gena VvPDS (738 pb) unutar koje se očekuje djelovanje sustava CRISPR-Cas9. Dobiveni fragmenti tretirani su restrikcijskim enzimom *DdeI* i analizirani agaroznom gel-elektroforezom (slici 4.3.1.2).



Slika 4.3.1.2. Analiza uspješnosti genomskog editinga gena VvPDS sustavom CRISPR-Cas9 u okviru vakuumske agroinfiltracije na kultivaru PMS kojom je pokazano da je potrebno mijenjati postavke

eksperimenta s obzirom da izabrani biljni materijal ne posjeduje mjesto prepoznavanja enzima *Ddel*. PCR-om je prvo umnožena regija gena *VvPDS* u kojoj se trebao dogoditi editing, a dobiveni fragmenti su zatim inkubirani s enzimom *Ddel* pa analizirani elektroforezom. Nakon markera (M), redom je nanesen uzorak netretirane biljke - negativna kontrola (K + *Ddel*) te uzorci iz dvaju listova podvrgnutih agroinfiltraciji (1, 2 + *Ddel*).

U scenariju pozitivnog ishoda, kod netretirane kontrole očekivali smo potpunu digestiju, a kod tretiranih uzoraka očekivali smo da veći udio PCR fragmenta bude podložan cijepanju, ali i da određeni dio fragmenta bude rezistentan na cijepanje. Naime, uslijed DSB nastalog djelovanjem nukleaze Cas9 te nepreciznog popravka DNA mehanizmom NHEJ koji slijedi, narušava se palindromski slijed koji prepoznaje enzim *Ddel*. Ipak, nismo uspjeli detektirati cijepanje, a objašnjenje da je riječ o nefunkcionalnom alikvotu enzima isključeno je cijepanjem kontrolne DNA (plazmid pMR396 sa 67 *Ddel* mjesta) koje je bilo uspješno (slika 4.3.1.3).

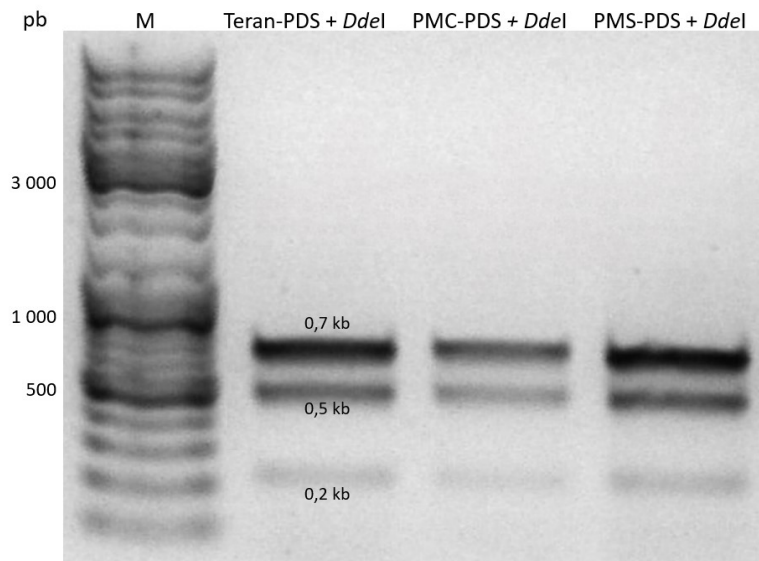


Slika 4.3.1.3. Provjera aktivnosti alikvota enzima *Ddel* cijepanjem kontrolnog vektora pMR396 koji sadrži 67 mjesta prepoznavanja enzima.

4.4. Genotipizacija kultivara vinove loze s obzirom na *Ddel* mjesto u regiji targetinga

Ustanovili smo da ne dolazi do cijepanja s *Ddel* jer biljka koju smo tretirali (nastala samooplodnjom roditeljske biljke PMS) vjerojatno u jednom alelu (ili oba) nosi polimorfizam u *Ddel* mjestu. Stoga je izolirana genomska DNA iz listova roditeljske biljke PMS, terana i PMC te proveden je isti PCR. Kod svih triju sorti dobiveno je polovično cijepanje gdje je otprilike pola

fragmenata pocijepano na dva manja fragmenta očekivane veličine, a druga polovina ostala intaktna (slika 4.4.1).



Slika 4.4.1. Genotipizacija kultivara teran, PMC i PMS (roditeljska biljka) s obzirom na postojanje restriktijskog mjesta za enzim *Ddel* u ciljnoj regiji gena *VvPDS*. PCR-om je prvo umnožena spomenuta regija gena *VvPDS*, a dobiveni fragmenti su zatim pocijepani enzimom *Ddel* pa analizirani elektroforezom.

Ti rezultati ukazali su na zaključak da su sve tri sorte u startu heterozigotne za *Ddel* mjesto, a da je samooplodnjom roditeljske biljke PMS došlo do spajanja gameta s dva alela bez *Ddel* mjesta. To je i provjereno: provedeno je TA kloniranje s PCR fragmentima kultivara PMC i teran. Plazmidi iz 6 bakterijskih kolonija poslani su na Sangerovo sekvenciranje. Rezultati sekvenciranja kultivara PMC prikazani su na slici 4.4.2., a ista ovisnost bila je vidljiva i kod terana. Uočavamo kako je upravo u *Ddel* slijedu (5' CTNAG 3') došlo do točkaste zamjene (G → A) čime su naše pretpostavke i potvrđene.

```

AATAGCAAAC TTGATTTTCTCCGGCCAAGTCAGCATTTCATTATTCCTCAGGATGGCCCATATCCCTGTCAATCATGTTTACAAGAAATATGCATTAAAAC
AATAGCAAAC TTGATTTTCTCCGGCCAAGTCAGCATTTCATTATTCCTCAGGATGGCCCATATCCCTGTCAATCATGTTTACAAGAAATATGCATTAAAAC
AATAGCAAAC TTGATTTTCTCCGGCCAAGTCAGCATTTCATTATTCCTCAGGATGGCCCATATCCCTGTCAATCATGTTTACAAGAAATATGCATTAAAAC
AATAGCAAAC TTGATTTTCTCCGGCCAAGTCAGCATTTCATTATTCCTCAGGATGGCCCATATCCCTGTCAATCATGTTTACAAGAAATATGCATTAAAAC
AATAGCAAAC TTGATTTTCTCCGGCCAAGTCAGCATTTCATTATTCCTCAGGATGGCCCATATCCCTGTCAATCATGTTTACAAGAAATATGCATTAAAAC
AATAGCAAAC TTGATTTTCTCCGGCCAAGTCAGCATTTCATTATTCCTCAGGATGGCCCATATCCCTGTCAATCATGTTTACAAGAAATATGCATTAAAAC
AATAGCAAAC TTGATTTTCTCCGGCCAAGTCAGCATTTCATTATTCCTCAGGATGGCCCATATCCCTGTCAATCATGTTTACAAGAAATATGCATTAAAAC

```

Slika 4.4.2. Genotipizacija ciljne regije gena *VvPDS* Sangerovim sekvenciranjem u kultivaru PMC na šest klonova dobivenih PCR-om.

S obzirom na *mismatch* u prepoznavanju gRNA-*VvPDS1* i regije neposredno uz slijed PAM, u eksperimentu s kultivarom PMS nije moglo doći do ispravnog vezanja kompleksa Cas9:gRNA na ciljnu DNA, a onda ni cijepanja, pa je bilo nužno promijeniti biljni materijal na

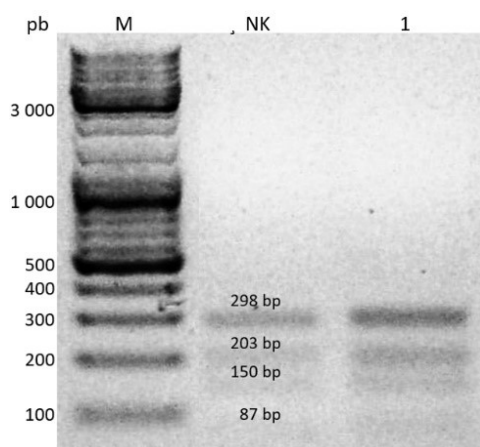
kojem radimo. Stoga smo nadalje umjesto PMS, koristili malvaziju istarsku (za vakuumsku agroinfiltraciju) i teran (za biolistiku) jer su heterozigoti za *Ddel* mjesto u ciljnoj regiji.

4.5. Vakuumska agroinfiltracija na malvaziji istarskoj

Budući da je malvazija istarska heterozigot za *Ddel* restrikcijsko mjesto, modifikacijom samo jednog alela nismo mogli očekivati fenotipsku detekciju djelovanja našeg sustava, već samo genotipsku, pa su i rezultati na fenotipskoj razini isti kao i za agroinfiltraciju na kultivaru PMS (vidi 4.3).

Unatoč tome što je mutageneza moguća i u heterozigotnim biljkama s obzirom na *Ddel* mjesto, detekcija targetinga s enzimom *Ddel* - nije, pa je bilo nužno izabrati novi način detekcije ili pronaći restrikcijsku endonukleazu koja u interesnom području cijepa neovisno o polimorfizmu dva alela u ciljnoj regiji. Mi smo učinili potonje te daljnje detekcije provodili koristeći enzim *Hpy188III*, koji prepoznaje palindromski slijed 5' TCNNGA 3'. S obzirom da je polimorfni nukleotid na četvrtoj poziciji palindroma, cijepanje tog enzima ne ovisi o tome koji se nukleotid nalazi na mjestu polimorfizma.

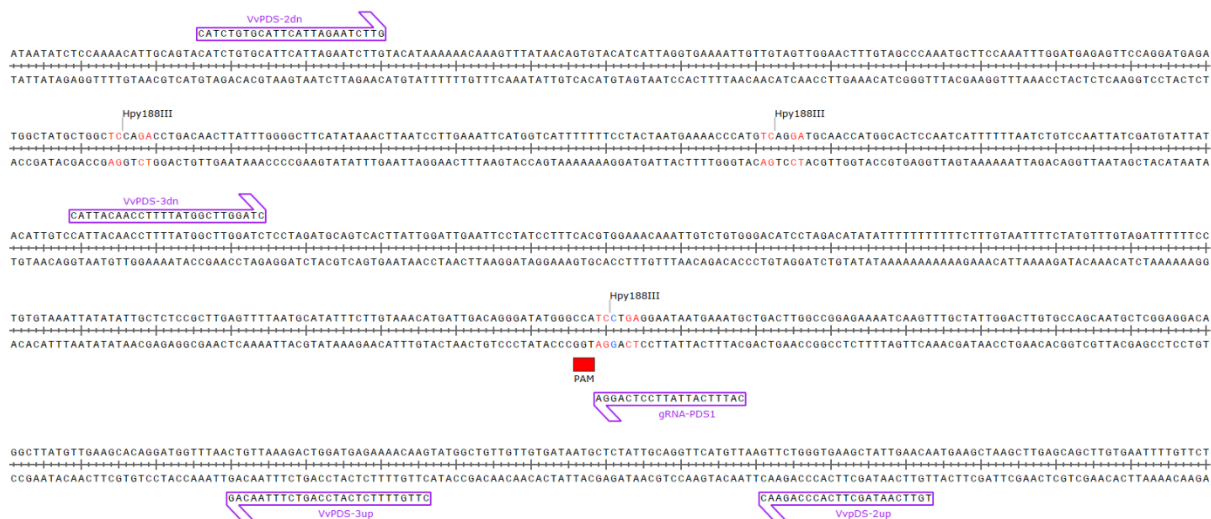
Proveden je isti protokol detekcije kao onaj opisan u poglavlju 4.3.1 uz jednu promjenu: upotreba enzima *Hpy188III* umjesto *Ddel*. Ipak, unutar regije umnažanja, ne nalazi se samo jedno *Hpy188III* restrikcijsko mjesto, kao u slučaju enzima *Ddel*, već tri restrikcijska mjesta. Stoga, na agaroznom gelu, kod negativne kontrole (netretirane), očekuju se fragmenti od 298, 203, 150 i 87 pb. U slučaju tretiranog biljnog materijala, očekuju se svi ti fragmenti plus određen udio fragmenta rezistentnog na cijepanje veličine 501 pb. Na naše iznenađenje, nakon provedene digestije, nismo uspjeli detektirati fragment rezistentan na cijepanje (slika 4.5.1).



Slika 4.5.1. Analiza uspješnosti genomskeg editinga gena *VvPDS* sustavom CRISPR-Cas9 u okviru vakuumske agroinfiltracije na kultivaru malvazija istarska enzimom *Hpy188III*. PCR-om je prvo

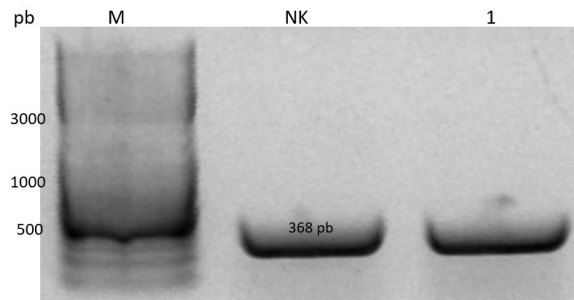
umnožena regija gena *VvPDS* u kojoj se trebao dogoditi editing, a dobiveni fragmenti su najprije inkubirani s enzimom *Hpy188III* čije je mjesto prepoznavanja, uslijed editinga, trebalo biti narušeno, pa analizirani elektroforezom. Nakon markera (M), redom je nanesen uzorak netretirane biljke - negativna kontrola (NK) te uzorak iz listova podvrgnutih agroinfiltraciji (1).

Ti rezultati ukazivali su nam na mogući nizak udio stanica s modifikacijom pa smo proveli korak obogaćivanja modificirane DNA, restrikcijom genomske DNA uzorka enzimom *Hpy188III* koja prethodi PCR-u. Na taj način onemogućuje se umnažanje nemodificirane DNA, koja posjeduje *Hpy188III* mjesto. No, korištenjem istih početnica to ne bi bilo moguće s obzirom da se unutar regije umnažanja nalaze tri restrikcijska mjesta. Stoga, dizajnirane su i naručene početnice *VvPDS3-up* i *VvPDS3-dn* koje omeđuju manju regiju (368 bp) koja sadrži samo jedno *Hpy188III* restrikcijsko mjesto. Pozicija *Hpy188III* restrikcijskog slijeda, te starih (*VvPDS2-up* i *-dn*) i novih (*VvPDS3-up* i *-dn*) početnica, prikazana je na slici 4.5.2.



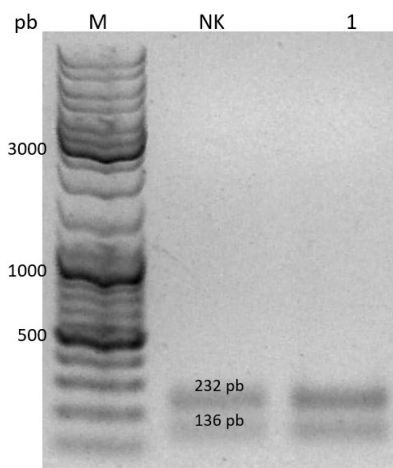
Slika 4.5.2. Regija sedmog eksona gena *VvPDS* u vinovoj lozi s označenom sekvencom PAM (crveno), palindromima koje prepoznaje restrikcijska endonukleaza *Hpy188III* (crveno), nukleotidom za koji je pokazano da je varijabilan u kultivarima PMC, teran, PMS i malvazija istarska (plavo), mjestom vezanja gRNA-*VvPDS1* te početnicama koje su korištene za direktnu analizu (*VvPDS2-up* i *-dn*) ili za analizu kojoj prethodi cijepanje genomske DNA (*VvPDS3-up* i *-dn*). Slika je izrađena u programu *SnapGene*.

Prvotno je, dakle, provedeno cijepanje genomske DNA tretirane biljke, a netretirana biljka poslužila je kao negativna kontrola (restrikcija A). Nakon restrikcije A, proveden je PCR čiji su produkti analizirani na agaroznom gelu (slika 4.5.3).



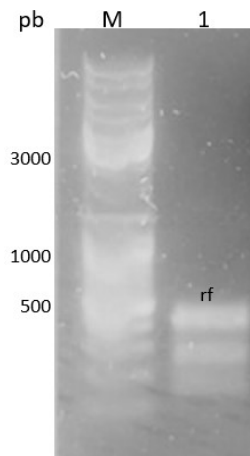
Slika 4.5.3. Analiza uspješnosti *enrichment* PCR-a. Kao kalup za umnažanje regije u kojoj se trebao dogoditi editing poslužila je genomska DNA iz listova netretirane (NK) i vakuum-agroinfiltrirane malvazije istarske (1) pocijepane enzimom *Hpy188III*, čije je mjesto prepoznavanja u ciljnoj regiji gena *VvPDS*, uslijed editinga, trebalo biti narušeno. M – marker.

Dobiven je amplikon kod tretiranog uzorka, ali i kod netretirane kontrole što je sugeriralo da, unatoč prekonočnoj restrikciji, određeni udio *Hpy188III* restrikcijskih mjesta ostaje intaktan. Proveli smo digestiju dobivenih PCR produkata (restrikcija B) očekujući potpunu restrikciju u netretiranoj kontroli te određeni udio rezistentnog fragmenta u tretiranom uzorku. No, ipak je u oba slučaja došlo do potpune restrikcije (slika 4.5.4).



Slika 4.5.4. Analiza uspješnosti genomskeg editinga gena *VvPDS* sustavom CRISPR-Cas9 u okviru vakuumske agroinfiltracije na kultivaru malvazija istarska enzimom *Hpy188III*. Produkti *enrichment* PCR-a (prema opisu slike 4.5.3) pocijepani su enzimom *Hpy188III* pa analizirani elektroforezom. M – marker.

Konačni pokušaj detekcije fragmenta rezistentnog na cijepanje bilo je provođenje PCR-a s restrikcijskom smjesom B kao kalupom te cijepanje dobivenog PCR produkta s enzimom *Hpy188III* (restrikcija C). Smatrali smo da, ukoliko u restrikcijskoj smjesi B postoji rezistentni fragment u frekvenciji koja se ne može detektirati na agaroznom gelu, novim PCR-om će se jače umnožiti. Nakon PCR reakcije i *Hpy188III* digestije zaista je detektiran rezistentan fragment (slika 4.5.5).



Slika 4.5.5. Analiza uspješnosti genomskog editinga gena *VpPDS* sustavom CRISPR-Cas9 u okviru vakuumske agroinfiltracije na kultivaru malvazija istarska enzimom *Hpy188III*. Produkti restrikcije uzoraka *enrichment* PCR-a, prema opisu slike 4.5.4, poslužili su kao kalup za novu PCR reakciju, a dobiveni fragmenti pocijepani su enzimom *Hpy188III* pa analizirani elektroforezom (uzorak 1). M – marker, rf – rezistentni fragment.

Kako bismo provjerili je li uzrok izostanka cijepanja rezultat mutageneze uslijed djelovanja sustav CRISPR-Cas9, nepocijepani fragment izrezali smo iz gela, pročistili te uklonirali u plazmid pGEM TA-kloniranjem. Plazmidna DNA iz šest kolonija poslana je na Sangerovo sekvenciranje. Dobivene sekvence poravnane su u programu *Snappgene*, a regija od interesa priložena je na slici 4.5.6.



Slika 4.5.6. Analiza uspješnosti genomskog editinga gena *VpPDS* sustavom CRISPR-Cas9 u okviru vakuumske agroinfiltracije na kultivaru malvazija istarska Sangerovim sekvenciranjem na šest klonova dobivenih PCR-om. Dobivene sekvence poravnane su na referentnu sekvencu. Na klonovima su crveno označeni nukleotidi koji se razlikuju od referentne sekvence, a na referentnoj sekvenci crveno je

označena sekvenca PAM, plavo mjesto prepoznavanja enzima *Hpy188III* i ljubičasto mjesto vezanja gRNA. Slika je izrađena u programu *SnapGene*.

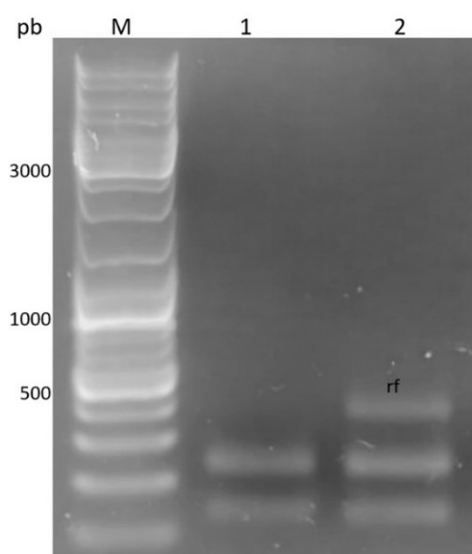
Prvo što možemo uočiti je da svih 6 klonova odgovara samo jednom od dva alela (onom bez *Ddel* mjesta) na koji se korištena gRNA, specifična za alel s *Ddel* mjestom, u teoriji ne može vezati, tj. posredovati stvaranju DSB. Zatim, tri klona (4, 5 i 6) imaju očuvano *Hpy188III* restrikcijsko mjesto što ne očekujemo u slučaju fragmenta rezistentnog na digestiju s *Hpy188III*. Moguće je kako, unatoč dugoj restrikciji, cijepanje genomske DNA ipak nije bilo potpuno. Kod preostalih klonova (1, 2 i 3) restrikcijsko mjesto je narušeno točkastim mutacijama što nisu tipična obilježja popravka DNA nakon DSB-a te u tom pogledu ovaj rezultat nije potpuno uvjerljiv.

4.6. Biolistika na teranu

Biolistiku smo provodili na globularnim embrijima terana netom prebačenim s medija X1 (slika 4.6.1A) za indukciju somatske embriogeneze na medij X6 za multiplikaciju somatskih embrija. Embriji za biolistiku tijekom presađivanja na medij X6 smještaju se na sredinu Petrijeve zdjelice, gdje će dospjeti najveći dio čestica zlata s DNA tijekom bombardiranja (slika 4.6.2.). Bombardirane biljke regenerirane su metodama somatske embriogeneze. Na mediju X6 biljke su napredovale kroz ostale stadije embriogeneze: srcoliki, torpedo i kotiledonarni kod kojeg se mogu uočiti jasno definirani hipokotil i kotiledoni (4.6.1B). Klijanje embrija inducira se na mediju EG, u prisustvu svjetlosti, zbog čega dolazi i do ozelenjivanja biljčice (4.6.1C). Presađivanjem biljaka u EG medij u epruvetu, biljka dobiva potreban prostor za rast u visinu pa se uočava značajno produljivanje stabljike i rast korijena i pojava novih listova (4.6.1.D). Biljke se nakon 3-4 tjedna prebacuju u *Magenta Box* sa zemljom u kojoj se prilagođavaju na uvjete *in vivo* s postupnim smanjenjem vlage. Na odraslim biljkama (slika 4.6.1E) provodili smo analizu targetinga.

4.6.1 Genotipska analiza targetinga biolistike na teranu

Iz listova i stabiljike biljke prvo je izolirana genomska DNA. Zatim, proveden je korak obogaćivanja modificirane DNA, restrikcijom genomske DNA enzimom *Hpy188III* koja prethodi PCR-u, kao i u analizi targetinga vakuumske agroinfiltracije na malvaziji istarskoj (vidi 4.5). Produkti PCR-a su pocijepani enzimom *Hpy188III* i analizirani agaroznom gel- elektroforezom. Očekivali smo određeni udio DNA rezistentne na cijepanje kod tretirane biljke te potpuno cijepanje netretirane kontrole što je i dobiveno (slika 4.6.1.1).



Slika 4.6.1.1. Analiza uspješnosti genomskog editinga gena *VvPDS* sustavom CRISPR-Cas9 u okviru biolistike na kultivaru teran enzimom *Hpy188III*. Prikazani su produkti restrikcije uzoraka *enrichment* PCR-a. M – marker; 1 – netretirana kontrola; 2 – uzorak iz biljke podvrgnute biolistici; rf – rezistentni fragment.

Naime, indukcijom DSB nukleazom Cas9 na ciljnom mjestu, dolazi do nepreciznog popravka DNA na mjestu loma što narušava sekvencu koju prepoznaje restrikcijski enzim. Kako bismo provjerili je li pojava fragmenta rezistentnog na cijepanje posljedica djelovanja sustava CRISPR-Cas9, fragment je izrezan iz gela te ukloniran u plazmid pGEM TA kloniranjem. Plazmidna DNA iz devet kolonija poslana je na Sangerovo sekvenciranje. Dobivene sekvence poravnane su u programu *Snapgene*, a regija od interesa priložena je na slici 4.6.1.2.



Slika 4.6.1.2. Analiza uspješnosti genomskog editinga gena *VvPDS* sustavom CRISPR-Cas9 u okviru biolistike na kultivaru teran Sangerovim sekvenciranjem na devet klonova dobivenih PCR-om. Dobivene sekvence poravnane su na referentnu sekvencu. Na klonovima su crveno označeni nukleotidi koji se razlikuju od referentne sekvence, a na referentnoj sekvenci crveno je označena sekvenca PAM, plavo mjesto prepoznavanja enzima *Hpy188III* i ljubičasto mjesto vezanja gRNA-*VvPDS1* i gRNA-*VvPDS2*. Slika je izrađena u programu *SnapGene*.

U pet klonova (1, 2, 6, 7 i 9) primjećujemo jednostruku supstituciju, a u jednome dvostruku (3). U tri klona (4, 5 i 8) moguće je i da nije došlo do editinga, s obzirom da je adenin koji se razlikuje od referentne sekvence u tim klonovima polimorfizam koji definira alel bez *Ddel* mjesta. No, budući da se taj alel nalazi u čak 7 od 9 klonova, postoji mogućnost da je uslijed editinga došlo do supstitucije iz gvanina u adenin u alelu s *Ddel* mjestom. Točkaste mutacije uzvodno od ciljne sekvence koje se pojavljuju u 4 klona (2, 6, 7 i 9) vjerojatno su nastale tijekom PCR umnožavanja ciljne sekvence.

5. Rasprava

Jedan od ciljeva ovog rada bio je i razviti sustav za konstrukciju plazmida za ciljano uređivanje genoma (od eng. *genome editing*) vinove loze sustavom CRISPR-Cas9 u jednom koraku kloniranja. Dobivanje CRISPR-Cas9 plazmida obično uključuje jednu ili više PCR reakcija, više koraka kloniranja, a sukladno i transformacija (Wenderoth i sur., 2017, Tashkandi i sur., 2018, Martin-Pizzaro i sur., 2019, Donovan i sur., 2020). Standardni postupak kloniranja koji smo proveli za konstrukciju plazmida pMR396+218+VvPDS1 uključivao je: linearizaciju plazmida pMR218, ugradnju gDNA u linearizirani plazmid (*NEBuilder*), umnažanje dobivenog U6-26::gRNA konstrukta PCR-om, linearizaciju plazmida pMR396 inverznim PCR-om i ugradnju umnoženog konstrukta u linearizirani pMR396 (*In-Fusion*).

Za pripremu plazmida pMR396+218+VvPDS2 pak uspostavili smo strategiju dodavanja gDNA u binarni vektor s Cas9 nukleazom u jednom koraku koristeći *NEBuilder* kloniranje. Korištenjem ove strategije za čitav postupak potrebna je jedna *BbsI* restrikcijska reakcija za linearizaciju plazmida pMR396+218, jedna *NEBuilder* reakcija za ugradnju željene gDNA te jedna transformacija. Nije potrebno umnažanje i linearizacija plazmida pMR396 inverznim PCR-om koji rezultira smanjenim prinosom s obzirom na zahtjevnu veličinu PCR produkta (14,5 kb), ali i potrebu pročišćavanja PCR produkta iz agaroznog gela. Ovakav pristup isključuje i upotrebu plazmida pMR218 kao posredničkog vektora za korak *NEBuilder* kloniranja s obzirom da je u polaznom plazmidu već prisutan promotor U6-26. Posljedično, prestaje potreba i za *InFusion* kloniranjem. Ova strategija posebno je pogodna za eksperimente u kojima je nužda za konstrukcijom većeg broja CRISPR-Cas9 plazmida: primjerice, kod ciljanja većeg broja gena i alela.

Iako strategija funkcionira, postoji prostor za napredak. Naime, u plazmidu pMR396+218 postoji još jedno *BbsI* mjesto osim onog predviđenog za kloniranje gDNA od interesa. Ustanovili smo kako uz skraćeno vrijeme restrikcije enzimom *BbsI*, ostaje dovoljna količina plazmida pocijepanog samo na *BbsI* mjestu predviđenom za kloniranje za uspješnu *In-Fusion* reakciju. Ipak, učinkovitost kloniranja mogla bi se povećati uklanjanjem drugog *BbsI* mjesta mutagenim inverznim PCR-om (Elion i sur., 2007) što ne bi trebalo narušiti funkciju plazmida s obzirom da se restrikcijski palindrom nalazi u nekodirajućem dijelu plazmida.

Vinova loza je visoko heterozigotna vrsta (Locco i sur. 2001) te iako je genom vinove loze sekvenciran još 2007. godine (*The French–Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization*), ovo istraživanje je pokazalo kako eksperimenti na vinovoj lozi zahtijevaju preliminarnu genotipizaciju odabranih ciljnih sekvenci na oba alela, direktno sekvenciranjem ili indirektno upotrebom restrikcijskih enzima. Ekson 7 gena *PDS* već je u

nekoliko istraživanja izabran kao meta targetinga sustava CRISPR-Cas9: primjerice na jagodi (Wilson i sur., 2019) i jabuci (Nishitani i sur., 2016), koje su bile homozigoti za ciljnu regiju eksona 7. S druge strane, naši rezultati pokazali su kako u vinovoj lozi, u svakom ispitanom kultivaru (teran, malvazija istarska, PMC, PMS), uz prisustvo u bazama dostupnog alela „divljeg tipa“ (s *Ddel* mjestom), prisutan je i polimorfni alel (bez *Ddel* mjesta) gena *VvPDS*. Povrh toga, korištena biljka nastala samooplodnjom kultivara PMS, a na kojoj smo provodili prvu vakuumsku agroinfiltraciju, čak je homozigotna za alel bez *Ddel* mjesta. Takva biljka fenotipski se nije razlikovala od roditeljske biljke (bila je zelena) pa se može zaključiti da proteinski produkt tog alela jest funkcionalan. No, zbog točkaste zamjene u polimorfnom alelu ne dolazi do vezanja gRNA-*VvPDS1*, a time je i onemogućena detekcija restrikcijским enzimom *Ddel* jer je taj polimorfizam dijelom palindroma koji enzim prepoznaje. Korištenjem kultivara koji posjeduju jedan alel s *Ddel* mjestom, omogućeno je vezanje gRNA1-*VvPDS*, a upotrebom enzima *Hpy188III* uspostavili smo sustav detekcije neovisan o spomenutom polimorfizmu koji je sada dostupan i za buduća istraživanja. Naime, polimorfizam alela bez *Ddel* mjesta nalazi se u dijelu sekvence prepoznavanja enzima *Hpy188III* na kojoj se može nalaziti bilo koja baza (5' TCNNGA 3'). Nadalje, konstrukcijom vektora pMR396+218+*VvPDS2*, koji kodira za gRNA specifičnu za alel bez *Ddel* mjesta, omogućili smo targeting i drugog alela. U daljnjim eksperimentima u kojima bi se provodilo bombardiranje s dva plazmida, specifična za različite alele gena *VvPDS*, mogao bi se za jedan alel dizajnirati plazmid koji nosi reporterski gen (npr. GUS) kako bi se omogućila detekcija embrija koji su primili oba plazmida što je već isprobano u istraživanjima na kukuruzu (Prakash i sur., 2009) i riži (Mukhtar, 2018). Samo embriji koji su transformirani obama plazmidima rastu na podlozi s antibiotikom te u histokemijskom bojanju pokazuju aktivnost GUS-a.

Uređivanje genoma korištenjem sustava CRISPR-Cas9 uspješno je provedeno na mnogim biljkama kao što su uročnjak (Li i sur., 2013), pšenica (Shan i sur., 2014), pamuk (Gao i sur., 2017), jagoda (Wilson i sur., 2019), kukuruz (Liang i sur., 2014), rajčica (Brooks i sur., 2014), uključujući i vinovu lozu (Nakajima i sur., 2017). Ipak, manja je količina takvih studija na drvenastim biljkama kakva je i vinova loza, uglavnom zbog niske transformacijske uspješnosti (Tu i sur., 2022). Povrh toga, učinkovitost transformacije vinove loze uvelike ovisi i o genotipu biljke, a time i kultivaru (Saporta i sur., 2017). Primjerice, Zottini i suradnici (2008) razvili su protokol za tranzijentnu agroinfiltraciju vinove loze koji se pokazao uspješnim za kultivare sugraone i aleatico, a neuspješnim za žuti muškat i aglianico. Pojedini kultivari posjeduju različit stupanj osjetljivosti na različite sojeve agrobakterija (Saporta i sur., 2017). S druge strane, mnogo je faktora koji mogu utjecati i na uspješnost biolistike. Primjerice, u riži je pokazana veća uspješnost transformacije bombardiranjem s minimalnom linearnom ekspresijskom kazetom (promotor + otvoreni okvir čitanja + terminator) nego s plazmidnom

DNA u cirkularnom ili lineariziranom obliku (Fu i sur., 2000). Problematika postoji i kod regeneracije bombardiranog tkiva: teško je uspostaviti optimalnu koncentraciju kanamicina koja bi dozvolila nesmetani razvoj bombardiranih embrija (Saporta i sur., 2017.), a odsustvom antibiotika, kao što je bio slučaj u našem istraživanju, otežava se pretraživanje biljaka sa željenom modifikacijom, posebice u slučajevima kada izostaju fenotipske razlike između modificiranih i nemodificiranih biljaka/ stanica. Protokol bi se za buduće eksperimente morao preinačiti varirajući pojedine parametre kako bi se povećala frekvencija stanica s modifikacijom. Mogla bi se isprobati agroinfiltracija s drugim bakterijskim sojem, kao što je EHA105, koji je najčešće upotrebljavani soj u transformacijama vinove loze (Saporta i sur., 2017). Nadalje, s obzirom da je pMR218+396 velik plazmid (15 kb), preporučljivo bi bilo bombardiranje linearne DNA s minimalnom ekspresijskom kazetom, a trebalo bi ispitati varijaciju u veličini čestica zlata (0,6, 1 i 1,6 μm u promjeru) i primjenu nižeg tlaka helija od one koje smo koristili (1350 psi) koja se pokazala uspješnom kod riže (900 psi) (Molina-Risco i sur., 2021) i pšenice (650 i 900 psi) (Sparks i Jones, 2009). Na povećanje učinkovitosti sustava mogla bi utjecati i promjena promotora za ekspresiju gRNA s obzirom da su nedavno identificirani promotori RNA polimeraze III specifični za vinovu lozu koji su pokazali veću ekspresiju od promotora U6-26 iz uročnjaka (Ren i sur., 2021) koji je korišten i u ovom radu.

Kod vakuum-agroinfiltriranog tkiva nismo uspjeli detektirati događaje koji bi ukazivali na indukciju dvolančanog loma. Detektirali smo fragmente rezistentne na digestiju, no sekvenciranjem smo utvrdili kako se uočene točkaste mutacije nalaze u alelu bez *Ddel* mjesta koji nije ni mogao biti kalup za editing s obzirom da je u vakuumskoj agroinfiltraciji korištena samo gRNA-*VvPDS1*, specifična za alel s *Ddel* mjestom. Moguće je da su, uslijed nekoliko serija cijepanja i umnažanja DNA, obogaćene inače malobrojne mutacije, nastale tijekom samog PCR-a ili pak već u biljnom tkivu prije uzorkovanja.

S druge strane, u bombardiranom tkivu oba alela bila su podložna editingu budući da su u biolistici korištene gRNA specifične za oba alela (gRNA-*VvPDS1* i gRNA-*VvPDS2*). Od devet analiziranih klonova registrirali smo pet jednostrukih i jednu dvostruku supstituciju. Moguće je da je broj supstitucija i viši: budući da je visoka pojavnost alela bez *Ddel* mjesta, postoji mogućnost da je adenin koji razlikuje dva alela nastao supstitucijom gvanina u alelu s *Ddel* mjestom, uslijed editinga. S obzirom da nijedna dobivena mutacija nije uzrokovala pomak u okviru čitanja, nismo mogli očekivati fenotipsku detekciju editinga u vidu bijelih sektora na listovima biljke.

Najčešći ishod NHEJ jesu manje adicije i delecije (Nidhi i sur., 2021) pa u skladu s tim se taj tip mutacija obično i detektira u istraživanjima. Primjerice, u istraživanju na jagodi u kojem je ciljani gen bio također *PDS*, najčešće detektirane mutacije bile su delecije od 1, 2 ili 3 bp

(Wilson i sur., 2019). U drugom istraživanju, na vinovoj lozi, gdje je ciljan gen *MLO*, insercije i delecije od 1 bp bile su prisutne u najvećoj frekvenciji (Wan i sur., 2020). Ipak, mehanizam NHEJ dopušta i nastajanje supstitucija (Lieber 2010). Visoka frekvencija supstitucijskih mutacija nakon intervencije sustavom CRISPR-Cas9 zabilježena je u istraživanju na dinji, u kojem je ciljni gen također bio *PDS* (Hooghvorst i sur., 2019), ali i vinovoj lozi gdje je proveden editing gena *VvEPFL9* (Clemens i sur., 2022). U spomenutom targetingu dinje, čak 91% detektiranih mutacija bile su supstitucije. Autori istraživanja na protoplastima soje, gdje su isključivo dobivene supstitucijske mutacije, kao i u našem istraživanju, predložili su da se u navedenim biljkama popravak DSB, umjesto procesom NHEJ, odvio putem HDR (Sun i sur., 2015). U prilog našem istraživanju svakako ide i činjenica da u uzorku netretirane biljke nismo detektirali fragment rezistentan na cijepanje enzimom *Hpy188III*, a i mutacije su koncentrirane u regiji 5-6 nukleotida uzvodno od slijeda PAM, gdje se i zbiva cijepanje DNA nukleazom Cas9 (Gleditsch sur. 2019).

U budućim istraživanjima bilo bi uputno analizirati veći broj biljaka te sekvencirati više klonova kako bi se detektirale i delecije ukoliko se nalaze u niskoj frekvenciji kao što je bio slučaj u spomenutom editingu dinje, ali i pamuka (Chen i sur., 2017) te pšenice (Zhang i sur., 2018). Također, s ciljem dobivanja biljke s fenotipskim značajkama editinga, moglo bi se dizajnirati više gRNA specifičnih za različite regije gena s obzirom da je na genu *VvPDS* prethodno pokazana značajna razlika u frekvenciji indel mutacija za različite gRNA (Ren i sur. 2019).

Ostaje prostor za potvrdu rezultata alternativnim metodama detekcije uspješnog editinga. Često su korištene metode koje se temelje na detekciji *mismatcha* kao što su *T7 Endonuclease Assay* i HRMA. Obično se sastoje od tri koraka: umnažanje ciljane regije PCR-om (1), denaturacija i renaturacija amplikona kako bi došlo do formiranja heterodupleksa između editirane i intaktne DNA (2) i detekcija heterodupleksa (3) (Zischewski i sur., 2017). *T7 Endonuclease assay* temelji se detekciji *mismatcha* pomoću *T7* endonukleaze koja ih prepoznaje i cijepa. Metoda je primjenjiva kada su mutacije prisutne u većoj frekvenciji i za indele veće od 2 bp (Denbow i sur., 2017). Budući da *T7* ne prepoznaje SNP-ove (Zischewski i sur., 2017), metoda je primjenjiva za naš sustav u kojem se dva alela razlikuju u jednom nukleotidu. Povrh toga, zbog tog svojstva *T7* endonukleaze, u analizi targetinga ne bi bile detektirane jednostruke supstitucije, čime bi došlo do povećanja udjela detektiranih indel mutacija, ukoliko su one prisutne u niskoj frekvenciji. Druga metoda koja se temelji na detekciji *mismatcha* jest HRMA. Riječ je o kvantitativnom PCR-u s fluorescentnom bojom koja interkalira u dvolančanu, ali ne i jednolančanu DNA, nakon kojeg slijedi analiza krivulja taljenja amplikona na temelju gubitka fluorescencije tijekom denaturacije DNA (Dahlem i sur., 2012). Krivulje taljenja pojedinih heterodupleksa i homodupleksa međusobno se razlikuju. Osim

visoke osjetljivosti i kvantitativnosti, jedna od prednosti metode jest i mogućnost distinkcije različitih mutacijskih događaja (Thomas i sur., 2014). Moglo bi se pristupiti i analizi dobivenih amplikona ciljane regije genoma metodama sekvenciranja sljedeće generacije (NGS) kao što je Illumina. NGS-om se mogu detektirati događaji u frekvenciji i do 0,01% (Hendel i sur., 2015) uz direktan uvid u učestalost mutacijskih događaja.

6. Zaključak

Nakon provedenog istraživanja možemo donijeti sljedeće zaključke:

1. Uspješno je razvijen je protokol za konstrukciju plazmida za ciljano uređivanje genoma (od eng. *genome editing*) vinove loze sustavom CRISPR-Cas9 u jednom koraku kloniranja.
2. Uspješno su konstruirani plazmidi za ciljano inaktivaciju lokusa *VvPDS* i istovremenu inaktivaciju triju funkcionalno srodnih lokusa *VvMybA1*, *VvMybA2* i *VvMybA3* (koji nisu testirani u okviru ovog rada)
3. Provedena je metoda za preliminarno ispitivanje funkcionalnosti sustava za ciljano inaktivaciju gena vakuumskom agroinfiltracijom na mladim listovima vinove loze, no nije detektiran editing u ciljnome genu.
4. Biolistikom somatskih embrija vinove loze na ciljnom genu *VvPDS* dobivene su kimerne biljke na genotipskoj razini, no detektirane mutacije nisu rezultirale gubitkom pigmentacije u listovima uslijed izostanka insercija i/ ili delecija nukleotida.

7. Zahvale

Zahvaljujemo našem mentoru izv. prof. dr. sc. Nenadu Malenici na prihvaćanju mentorstva te za sve savjete, podršku i pomoć tijekom laboratorijskog rada i pisanja.

Zahvaljujemo prof. dr. sc. Dunji Leļjak Levanić na savjetima za dio laboratorijskog rada.

Također, zahvaljujemo svim djelatnicima Zavoda za molekularnu biologiju na ustupanju laboratorijske opreme te ugodnoj radnoj atmosferi.

8. Literatura

Ahmad, M. (2023). Plant breeding advancements with “CRISPR-Cas” genome editing technologies will assist future food security. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1133036>

Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 233-249.

Bakshi, S., Sadhukhan, A., Mishra, S., & Sahoo, L. (2011). Improved Agrobacterium-mediated transformation of cowpea via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Reports*, 30(12), 2281–2292. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1133-8>

Bhatia, S., & Bera, T. (2015). Somatic Embryogenesis and Organogenesis. In *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences* (pp. 209-230). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802221-4.00006-6>

Bouquet, A., Torregrosa, L., Iocco, P., & Thomas, M. R. (2006). Grapevine (*Vitis vinifera* L.). In *Agrobacterium Protocols Volume 2* (pp. 273–285). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59745-131-2:273>

Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z. B., & Van Eck, J. (2014). Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant Physiology*, 166(3), 1292–1297. <https://doi.org/10.1104/pp.114.247577>

Bullock, W. (1987). XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques*, 5, 376.

Campos, G., Chialva, C., Miras, S., & Lijavetzky, D. (2021). New Technologies and Strategies for Grapevine Breeding Through Genetic Transformation. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.767522>

Charrier, A., Vergne, E., Dousset, N., Richer, A., Petiteau, A., & Chevreau, E. (2019). Efficient Targeted Mutagenesis in Apple and First Time Edition of Pear Using the CRISPR-Cas9 System. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00040>

Chen, X., Lu, X., Shu, N., Wang, S., Wang, J., Wang, D., Guo, L., & Ye, W. (2017). Targeted mutagenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) using the CRISPR/Cas9 system. *Scientific reports*, 7, 44304. <https://doi.org/10.1038/srep44304>

Clemens, M., Faralli, M., Lagreze, J., Bontempo, L., Piazza, S., Varotto, C., Malnoy, M., Oechel, W., Rizzoli, A., & Dalla Costa, L. (2022). VvEPFL9-1 Knock-Out via CRISPR/Cas9 Reduces Stomatal Density in Grapevine. *Frontiers in plant science*, 13, 878001. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.878001>

Cui, Y., Xu, J., Cheng, M., Liao, X., & Peng, S. (2018). Review of CRISPR/Cas9 sgRNA design tools. *Interdisciplinary Sciences, Computational Life Sciences*, 10(2), 455–465. <https://doi.org/10.1007/s12539-018-0298-z>

Dahlem, T. J., Hoshijima, K., Jurynech, M. J., Gunther, D., Starker, C. G., Locke, A. S., Weis, A. M., Voytas, D. F., & Grunwald, D. J. (2012). Simple methods for generating and detecting locus-specific mutations induced with TALENs in the zebrafish genome. *PLoS Genetics*, 8(8), e1002861. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002861>

Denbow, C., Ehivet, S. C., & Okumoto, S. (2018). High resolution melting temperature analysis to Identify CRISPR/Cas9 mutants from Arabidopsis. *Bio-Protocol*, 8(14), e2944. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2944>

Donovan, S., Mao, Y., Orr, D. J., Carmo-Silva, E., & McCormick, A. J. (2020). CRISPR-Cas9-Mediated Mutagenesis of the Rubisco Small Subunit Family in *Nicotiana tabacum*. *Frontiers in Genome Editing*, 2, 605614. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2020.605614>

Elion, E. A., Marina, P., & Yu, L. (2007). Constructing recombinant DNA molecules by PCR. Et al [Current Protocols in Molecular Biology], Chapter 3(1), Unit 3.17. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0317s78>

Ferreira, V., Matus, J. T., Pinto-Carnide, O., Carrasco, D., Arroyo-García, R., & Castro, I. (2019). Genetic analysis of a white-to-red berry skin color reversion and its transcriptomic and metabolic consequences in grapevine (*Vitis vinifera* cv. 'Moscatel Galego'). *BMC Genomics*, 20(1), 952. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6237-5>

Fournier-Level, A., Le Cunff, L., Gomez, C., Doligez, A., Ageorges, A., Roux, C., Bertrand, Y., Souquet, J.-M., Cheynier, V., & This, P. (2009). Quantitative genetic bases of anthocyanin variation in grape (*Vitis vinifera* L. ssp. sativa) berry: a quantitative trait locus to quantitative trait nucleotide integrated study. *Genetics*, 183(3), 1127–1139. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.103929>

Frugis, G. (2019). Plant Development and Organogenesis: From Basic Principles to Applied Research. *Plants*, 8(9), 299. <https://doi.org/10.3390/plants8090299>

Fu, X., Duc, L. T., Fontana, S., Bong, B. B., Tinjuangjun, P., Sudhakar, D., Twyman, R. M., Christou, P., & Kohli, A. (2000). Linear transgene constructs lacking vector backbone

- sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. *Transgenic research*, 9(1), 11–19. <https://doi.org/10.1023/a:1008993730505>
- Gao, W., Long, L., Tian, X., Xu, F., Liu, J., Singh, P. K., Botella, J. R., & Song, C. (2017). Genome editing in cotton with the CRISPR/Cas9 system. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1364. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01364>
- Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium* -Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16–37. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003>
- Gjajić, L. (2021). Primjena GIS tehnologije u vinogradarstvu i proizvodnji vrhunskih vina.
- 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>
- Gordon, J. E., & Christie, P. J. (2014). The *Agrobacterium* Ti Plasmids. *Microbiology Spectrum*, 2(6). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0010-2013>
- Grassi, F., & de Lorenzis, G. (2021). Back to the Origins: Background and Perspectives of Grapevine Domestication. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4518. <https://doi.org/10.3390/ijms22094518>
- Hendel, A., Fine, E. J., Bao, G., & Porteus, M. H. (2015). Quantifying on- and off-target genome editing. *Trends in Biotechnology*, 33(2), 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.12.001>
- Hichri, I., Heppel, S. C., Pillet, J., Léon, C., Czempli, S., Delrot, S., Lauvergeat, V., & Bogs, J. (2010). The Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor MYC1 Is Involved in the Regulation of the Flavonoid Biosynthesis Pathway in Grapevine. *Molecular Plant*, 3(3), 509–523. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp118>
- Hofmann, N. R. (2016). A Breakthrough in Monocot Transformation Methods. *The Plant Cell*, 28(9), 1989–1989. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00696>
- Hooghvorst, I., López-Cristoffanini, C., & Nogués, S. (2019). Efficient knockout of phytoene desaturase gene using CRISPR/Cas9 in melon. *Scientific Reports*, 9(1), 17077. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53710-4>
- Iocco, P., Franks, T., & Thomas, M. R. (2001). Genetic transformation of major wine grape cultivars of *Vitis vinifera* L. *Transgenic Research*, 10(2), 105–112. <https://doi.org/10.1023/A:1008989610340>

- Jiang, F., & Doudna, J. A. (2017). CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics*, 46(1), 505–529. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>
- Joubert, D. A., de Lorenzo, G., & Vivier, M. A. (2013). Regulation of the grapevine polygalacturonase-inhibiting protein encoding gene: expression pattern, induction profile and promoter analysis. *Journal of Plant Research*, 126(2), 267–281. <https://doi.org/10.1007/s10265-012-0515-5>
- Kaur, M., Manchanda, P., Kalia, A., Ahmed, F. K., Nepovimova, E., Kuca, K., & Abd-Elsalam, K. A. (2021). Agroinfiltration Mediated Scalable Transient Gene Expression in Genome Edited Crop Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10882. <https://doi.org/10.3390/ijms221910882>
- Keshavareddy, G., Kumar, A. R. V., & S. Ramu, V. (2018). Methods of Plant Transformation-A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(07), 2656–2668. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.707.312>
- Kobayashi, S., Goto-Yamamoto, N., & Hirochika, H. (2004). Retrotransposon-Induced Mutations in Grape Skin Color. *Science*, 304(5673), 982–982. <https://doi.org/10.1126/science.1095011>
- Koncz, C., & Schell, J. (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics MGG*, 204, 383-396.
- Koschmieder, J., Fehling-Kaschek, M., Schaub, P., Ghisla, S., Brausemann, A., Timmer, J., & Beyer, P. (2017). Plant-type phytoene desaturase: Functional evaluation of structural implications. *PLOS ONE*, 12(11), e0187628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187628>
- Kurmi, U. S., Sharma, D.K., Tripathi, M.K., Tiwari, R., Baghel, B.S., Tiwari, S. (2011). Plant regeneration of *Vitis vinifera* (L) via direct and indirect organogenesis from cultured nodal segments. *Journal of Agricultural Technology* , 7(3), 721–737.
- Lacroix, B., & Citovsky, V. (2020). Biolistic Approach for Transient Gene Expression Studies in Plants (pp. 125–139). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0356-7_6
- Li, J.-F., Norville, J. E., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., Bush, J., Church, G. M., & Sheen, J. (2013). Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*, 31(8), 688–691. <https://doi.org/10.1038/nbt.2654>

- Liang, Z., Zhang, K., Chen, K., & Gao, C. (2014). Targeted Mutagenesis in *Zea mays* Using TALENs and the CRISPR/Cas System. *Yi Chuan Xue Bao [Journal of Genetics and Genomics]*, 41(2), 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2013.12.001>
- Lieber M. R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual review of biochemistry*, 79, 181–211.
- Ma, Y., Zhang, L., & Huang, X. (2014). Genome modification by CRISPR/Cas9. *FEBS Journal*, 281(23), 5186–5193. <https://doi.org/10.1111/febs.13110>
- Mahmoudian, M., Yucel, M., & Oktem, H. A. (2002). Transformation of lentil (*Lens culinaris* M.) cotyledonary nodes by vacuum infiltration of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20(3), 251-258.
- Malenica, N., Leljak Levanić, D., Zdunić, G., Vončina, D., Bauer, N., Pavletić, B., & Jagić, M. (2020). Somatic embryogenesis as a tool for virus elimination in Croatian indigenous grapevine cultivars. *Acta Botanica Croatica*, 79(1), 26–34. <https://doi.org/10.37427/botcro-2020-008>
- Maletić E., Kontić J.K. , Preiner D., Šimon S., Staver M., Pejić I. (2014). Ampelographic and genetic studies into “Teran”/“Refošk” grapes in Istria (Croatia) – one or two varieties? *Mitteilungen Klosterneuburg* , 64, 54–62.
- Maletić, E., Pejić, I., Kontić, J. K., Piljac, J., Dangl, G. S., Vokurka, A., Lacombe, T., Mirošević, N., & Meredith, C. P. (2004). Zinfandel, Dobričić, and Plavac mali: The Genetic Relationship among Three Cultivars of the Dalmatian Coast of Croatia. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55(2), 174–180
- Mariashibu, T. S., Subramanyam, K., Arun, M., Mayavan, S., Rajesh, M., Theboral, J., Manickavasagam, M., & Ganapathi, A. (2013). Vacuum infiltration enhances the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in Indian soybean cultivars. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(1), 41–54. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1046-3>
- Martín-Pizarro, C., Triviño, J. C., & Posé, D. (2019). Functional analysis of the TM6 MADS-box gene in the octoploid strawberry by CRISPR/Cas9-directed mutagenesis. *Journal of Experimental Botany*, 70(3), 885–895. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery400>
- Martinelli, L., & Gribaudo, I. (2001). Somatic Embryogenesis in Grapevine. In *Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine* (pp. 327–351). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2308-4_13
- Molina-Risco, M., Ibarra, O., Faion-Molina, M., Kim, B., Septiningsih, E. M., & Thomson, M. J. (2021). Optimizing *Agrobacterium*-Mediated Transformation and CRISPR-Cas9 Gene Editing

in the tropical japonica Rice Variety Presidio. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 10909. <https://doi.org/10.3390/ijms222010909>

Mukhtar, Z. (2018). OPTIMIZATION OF PARTICLE BOMBARDMENT CONDITIONS FOR RICE (*Oryza sativa* L.) TRANSFORMATION. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 55(02), 271–278. <https://doi.org/10.21162/pakjas/18.3678>

Nakajima, I., Ban, Y., Azuma, A., Onoue, N., Moriguchi, T., Yamamoto, T., Toki, S., & Endo, M. (2017). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in grape. *PLOS ONE*, 12(5), e0177966. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177966>

Nidhi, S., Anand, U., Oleksak, P., Tripathi, P., Lal, J. A., Thomas, G., Kuca, K., & Tripathi, V. (2021). Novel CRISPR-Cas Systems: An Updated Review of the Current Achievements, Applications, and Future Research Perspectives. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3327. <https://doi.org/10.3390/ijms22073327>

Nishitani, C., Hirai, N., Komori, S., Wada, M., Okada, K., Osakabe, K., Yamamoto, T., & Osakabe, Y. (2016). Efficient Genome Editing in Apple Using a CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports*, 6(1), 31481. <https://doi.org/10.1038/srep31481>

Péros, JP., Launay, A., Berger, G. et al. *MybA1* gene diversity across the *Vitis* genus. *Genetica* 143, 373–384 (2015).

Raman, R. (2017). The impact of Genetically Modified (GM) crops in modern agriculture: A review. *GM Crops & Food*, 8(4), 195–208. <https://doi.org/10.1080/21645698.2017.1413522>

Ren, C., Liu, X., Zhang, Z., Wang, Y., Duan, W., Li, S., & Liang, Z. (2016). CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Scientific Reports*, 6(1), 32289. <https://doi.org/10.1038/srep32289>

Ren, C., Liu, Y., Guo, Y., Duan, W., Fan, P., Li, S., & Liang, Z. (2021). Optimizing the CRISPR/Cas9 system for genome editing in grape by using grape promoters. *Horticulture Research*, 8(1), 52. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00489-z>

Ren, F., Ren, C., Zhang, Z., Duan, W., Lecourieux, D., Li, S., & Liang, Z. (2019). Efficiency Optimization of CRISPR/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis in Grape. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00612>

Santarém, E. R., Trick, H. N., Essig, J. S., & Finer, J. J. (1998). Sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation of soybean immature cotyledons: optimization of transient expression. *Plant Cell Reports*, 17(10), 752–759. <https://doi.org/10.1007/s002990050478>

- Saporta, R., San Pedro, T., & Gisbert, C. (2017). Attempts at grapevine (*Vitis vinifera* L.) breeding through genetic transformation: The main limiting factors. <https://doi.org/10.5073/vitis.2016.55.173-186>
- Scorza, R., Cordts, J. M., Ramming, D. W., & Emershad, R. L. (1995). Transformation of grape (*Vitis vinifera* L.) zygotic-derived somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports*, 14(9). <https://doi.org/10.1007/BF00231944>
- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., & Gao, C. (2014). Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nature Protocols*, 9(10), 2395–2410. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.157>
- Shiva Prakash, N., Bhojaraja, R., Shivbachan, S. K., Hari Priya, G. G., Nagraj, T. K., Prasad, V., Srikanth Babu, V., Jayaprakash, T. L., Dasgupta, S., Spencer, T. M., & Boddupalli, R. S. (2009). Marker-free transgenic corn plant production through co-bombardment. *Plant Cell Reports*, 28(11), 1655–1668. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0765-4>
- Simmons, C. W., VanderGheynst, J. S., & Upadhyaya, S. K. (2009). A model of *Agrobacterium tumefaciens* vacuum infiltration into harvested leaf tissue and subsequent *in planta* transgene transient expression. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(3), 965-970.
- Somssich, Marc (2019). A Short History of Plant Transformation.
- Sparks, C. A., & Jones, H. D. (2009). Biolistics transformation of wheat. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 478, 71–92. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-379-0_4
- Stamp, J. A., Colby, S. M., & Meredith, C. P. (1990). Direct shoot organogenesis and plant regeneration from leaves of grape (*Vitis* spp.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 22(2), 127–133. <https://doi.org/10.1007/BF00043688>
- Subramanyam, K., Subramanyam, K., Sailaja, K. v., Srinivasulu, M., & Lakshmidivi, K. (2011). Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of banana cv. Rasthali (AAB) via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Reports*, 30(3), 425–436. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0996-4>
- Sun, X., Hu, Z., Chen, R., Jiang, Q., Song, G., Zhang, H., & Xi, Y. (2015). Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system. *Scientific Reports*, 5(1), 10342. <https://doi.org/10.1038/srep10342>

- Tashkandi, M., Ali, Z., Aljedaani, F., Shami, A., & Mahfouz, M. M. (2018). Engineering resistance against Tomato yellow leaf curl virus via the CRISPR/Cas9 system in tomato. *Plant Signaling & Behavior*, 13(10), e1525996. <https://doi.org/10.1080/15592324.2018.1525996>
- The French–Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization. (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, 449(7161), 463–467. <https://doi.org/10.1038/nature06148>
- This, P., Lacombe, T., Cadle-Davidson, M., & Owens, C. L. (2007). Wine grape (*Vitis vinifera* L.) color associates with allelic variation in the domestication gene *VvmybA1*. *Theoretical and Applied Genetics*, 114(4), 723–730. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0472-2>
- Thomas, H. R., Percival, S. M., Yoder, B. K., & Parant, J. M. (2014). High-throughput genome editing and phenotyping facilitated by high resolution melting curve analysis. *PloS One*, 9(12), e114632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114632>
- Tjokrokusumo, D., Heinrich, T., Wylie, S., Potter, R., & McComb, J. (2000). Vacuum infiltration of *Petunia hybrida* pollen with *Agrobacterium tumefaciens* to achieve plant transformation. *Plant Cell Reports*, 19(8), 792–797. <https://doi.org/10.1007/s002990050009>
- Tu, M., Fang, J., Zhao, R., Liu, X., Yin, W., Wang, Y., Wang, X., Wang, X., & Fang, Y. (2022). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of *VvbZIP36* promotes anthocyanin accumulation in grapevine (*Vitis vinifera*). *Horticulture Research*, 9. <https://doi.org/10.1093/hr/uhac022>
- Ueki, S., Magori, S., Lacroix, B., & Citovsky, V. (2013). Transient Gene Expression in Epidermal Cells of Plant Leaves by Biolistic DNA Delivery (pp. 17–26). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-110-3_2
- Vaia, G., Pavese, V., Moglia, A., Cristofori, V., & Silvestri, C. (2022). Knockout of phytoene desaturase gene using CRISPR/Cas9 in highbush blueberry. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1074541>
- van der Hoorn, R. A. L., Laurent, F., Roth, R., & de Wit, P. J. G. M. (2000). Agroinfiltration Is a Versatile Tool That Facilitates Comparative Analyses of Avr 9/ Cf-9 -Induced and Avr 4/ Cf-4 -Induced Necrosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 13(4), 439–446. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.4.439>
- Vezzulli, S., Leonardelli, L., Malossini, U., Stefanini, M., Velasco, R., & Moser, C. (2012). Pinot blanc and Pinot gris arose as independent somatic mutations of Pinot noir. *Journal of Experimental Botany*, 63(18), 6359–6369. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers290>
- Vidal, J. R., Kikkert, J. R., Wallace, P. G., & Reisch, B. I. (2003). High-efficiency biolistic co-transformation and regeneration of “Chardonnay” (*Vitis vinifera* L.) containing npt-II and

antimicrobial peptide genes. *Plant Cell Reports*, 22(4), 252–260.
<https://doi.org/10.1007/s00299-003-0682-x>

Vidal, J. R., Rama, J., Taboada, L., Martin, C., Ibañez, M., Segura, A., & González-Benito, M. E. (2009). Improved somatic embryogenesis of grapevine (*Vitis vinifera*) with focus on induction parameters and efficient plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96(1), 85–94. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9464-z>

Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., & Baulcombe, D. (2003). Retracted: An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal*, 33(5), 949–956. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01676.x>

von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 233–249. <https://doi.org/10.1023/A:1015673200621>

Walker, A. R., Lee, E., Bogs, J., McDavid, D. A. J., Thomas, M. R., & Robinson, S. P. (2007). White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes. *The Plant Journal*, 49(5), 772–785. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02997.x>

Wan, D.-Y., Guo, Y., Cheng, Y., Hu, Y., Xiao, S., Wang, Y., & Wen, Y.-Q. (2020). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of *VvMLO3* results in enhanced resistance to powdery mildew in grapevine (*Vitis vinifera*). *Horticulture Research*, 7(1), 116. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-0339-8>

Wang, X., Tu, M., Wang, D., Liu, J., Li, Y., Li, Z., Wang, Y., & Wang, X. (2018). CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in grape in the first generation. *Plant Biotechnology Journal*, 16(4), 844–855. <https://doi.org/10.1111/pbi.12832>

Wenderoth, M., Pinecker, C., Voß, B., & Fischer, R. (2017). Establishment of CRISPR/Cas9 in *Alternaria alternata*. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 101, 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.03.001>

Win, J., & Kamoun, S. (2004). pCB301-p19: A Binary Plasmid Vector to Enhance Transient Expression of Transgenes by Agroinfiltration. <http://www.KamounLab.net>

Wilson, F. M., Harrison, K., Armitage, A. D., Simkin, A. J., & Harrison, R. J. (2019). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of phytoene desaturase in diploid and octoploid strawberry. *Plant Methods*, 15(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0428-6>

Zhang, S., Zhang, R., Song, G., Gao, J., Li, W., Han, X., Chen, M., Li, Y., & Li, G. (2018). Targeted mutagenesis using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas9

system in common wheat. *BMC Plant Biology*, 18(1), 302. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1496-x>

Zhang X., Wu, Y., Li, Z., Song, C., Wang, X. (2021). Advancements in plant regeneration and genetic transformation of grapevine (*Vitis* spp.). *Journal of Integrative Agriculture*, 20(6), 1407–1434. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63586-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63586-9)

Zhou, Q., Dai, L., Cheng, S., He, J., Wang, D., Zhang, J., & Wang, Y. (2014). A circulatory system useful both for long-term somatic embryogenesis and genetic transformation in *Vitis vinifera* L. cv. Thompson Seedless. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 118(1), 157–168. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0471-y>

Zischewski, J., Fischer, R., & Bortesi, L. (2017). Detection of on-target and off-target mutations generated by CRISPR/Cas9 and other sequence-specific nucleases. *Biotechnology Advances*, 35(1), 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.12.003>

Zottini, M., Barizza, E., Costa, A., Formentin, E., Ruberti, C., Carimi, F., & Lo Schiavo, F. (2008). Agroinfiltration of grapevine leaves for fast transient assays of gene expression and for long-term production of stable transformed cells. *Plant Cell Reports*, 27(5), 845–853. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0510-4>

9. Sažetak

Tomislav Mamić i Filip Španić

Uređivanje gena *VvPDS* vinove loze (*Vitis vinifera L.*) sustavom CRISPR-Cas9 korištenjem vakuumske agroinfiltracije i biolistike

Vinova loza uzgaja se diljem svijeta na površini većoj od 7 milijuna hektara. Uslijed različitih klimatskih i ekonomskih pritisaka na povećanje proizvodnje, konvencionalno križanje u svrhu dobivanja novih kultivara nije isplativo ni vremenski ni ekonomski. Stoga, javlja se potreba za stvaranjem biljaka s boljim prinosom te svojstvima otpornosti na nepovoljne uvjete i patogene drugim metodama koje bi bile prihvatljive potrošačima i proizvođačima. Genetičke manipulacije otežane su na drvenastim biljkama kao što je vinova loza, stoga je nužno raditi na razvijanju novih protokola, pogotovo onih koji ne spadaju u klasično genetičko inženjerstvo. U ovom istraživanju provedena je ciljana mutageneza gena *VvPDS* vinove loze sustavom CRISPR-Cas9. Uspostavljen je protokol za pripremu CRISPR-Cas9 vektora u jednom koraku kloniranja što značajno skraćuje vrijeme kloniranja. Vinova loza je visoko heterozigotna vrsta, pa je i u ovom radu pokazana nužnost inicijalne genotipizacije ciljne genomske regije za uređivanje. Funkcionalnost sustava preliminarno je ispitana korištenjem vakuumske agroinfiltracije na listovima kultivara plavac mali i malvazija istarska, a genotipski kimerne biljke uspješno su dobivene regeneracijom somatskih embrija terana podvrgnutih biolistici. Iako nismo uspjeli dobiti bialelne mutante u genu *VvPDS* vinove loze s bijelim sektorima tkiva na listovima, ovaj rad je prvi ovakve vrste u Hrvatskoj i predstavlja temelj za buduća slična istraživanja uređivanja genoma na vinovoj lozi.

Ključne riječi: vinova loza, CRISPR-Cas9, *VvPDS*, biolistika, agroinfiltracija.

10. Summary

Tomislav Mamić and Filip Španić

CRISPR-Cas9 mediated editing of *VvPDS* gene in grapevine (*Vitis vinifera* L.) using vacuum agroinfiltration and biolistics

Grapevine is grown worldwide on an area of over 7 million hectares. Due to various climatic and economic pressures to increase production, conventional breeding for obtaining new cultivars is not cost-effective neither in terms of time nor economics. Therefore, there is a need to create plants with better yields and properties resistant to unfavorable conditions and pathogens using other methods that would be acceptable to consumers and producers. Genetic manipulation is difficult in woody plants such as grapevine, so it is necessary to work on developing new protocols, especially those that do not fall into classical genetic engineering. In this study, targeted mutagenesis of the *VvPDS* grapevine gene was carried out using the CRISPR-Cas9 system. A protocol for preparing CRISPR-Cas9 vectors in a one-step cloning was established, significantly reducing cloning time. Grapevine is a highly heterozygous species, so the necessity of initial genotyping of the target genomic region for editing was also shown in this study. The functionality of the system was preliminarily tested using vacuum agroinfiltration on leaves of the Plavac Mali and Malvazija Istarska cultivars, and genotypically chimeric plants were successfully obtained by regeneration of somatic embryos of Teran subjected to biolistics. Although we did not manage to obtain biallelic mutants in the *VvPDS* grapevine gene with white tissue sectors on the leaves, this study is the first of its kind in Croatia and represents the basis for future similar research on genome editing in grapevine.

Key words: grapevine, CRISPR-Cas9, *VvPDS*, biolistic, agroinfiltration.