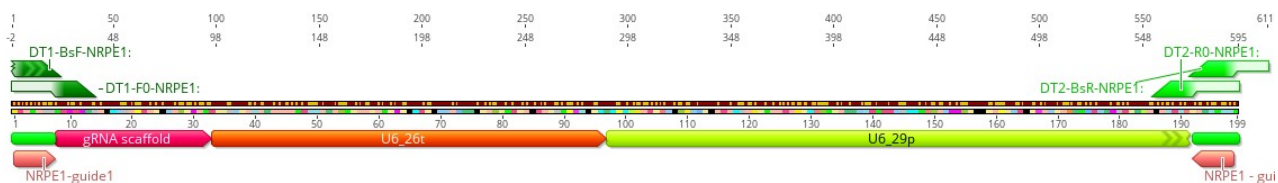
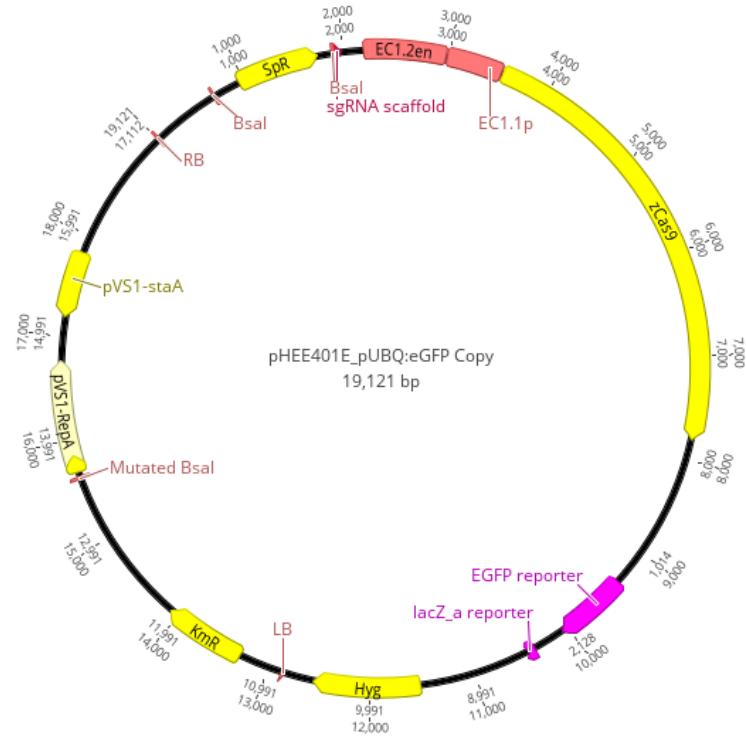


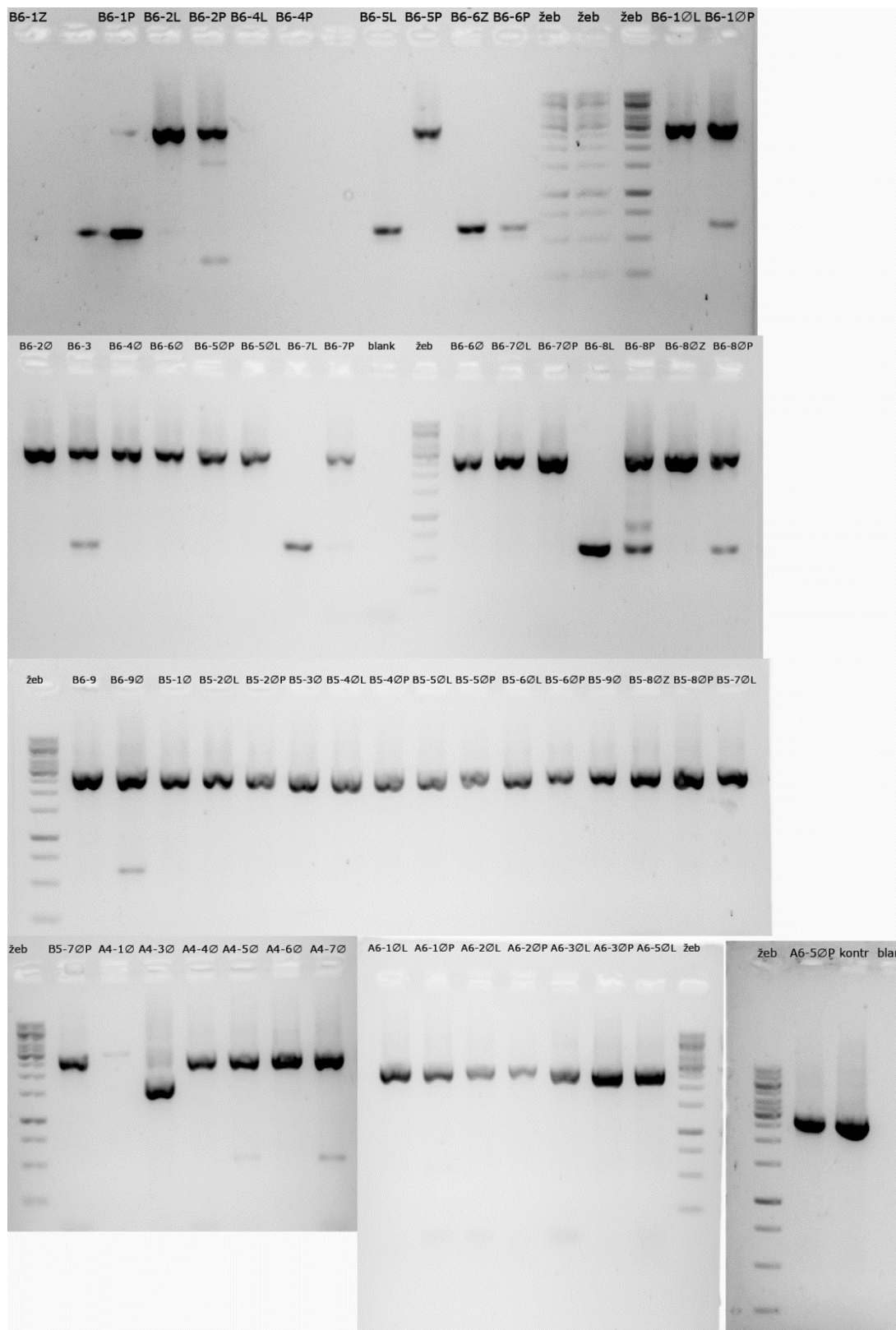
Obr. 1: plasmid pCBC-DT1T2 sloužící k sestavení CRISPR kazety s gRNA. V plasmidu se nacházejí místa odpovídající sekvencím v DT1-F0 a DT2-R0 primerech, tato místa ohraničují U6_29 promotor, U6_26 terminátor a gRNA scaffold. Plasmid dále obsahuje gen pro kanamycinovou a chloramfenicolovou rezistenci.



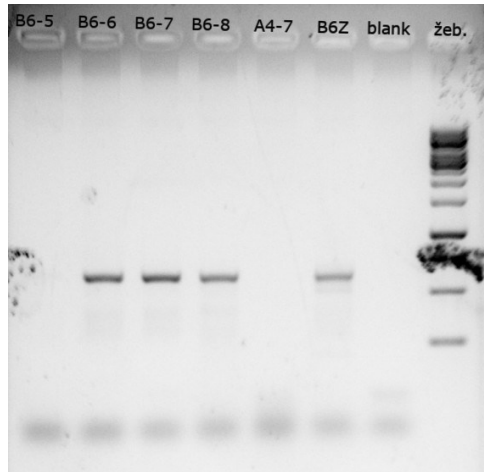
Obr. 2: detail CRISPR kazety s gRNA, PCR produkt získaný in silico na základě testovaných primerů. Primery ohraničují U6_29 promotor, U6-26 terminátor a gRNA scaffold.



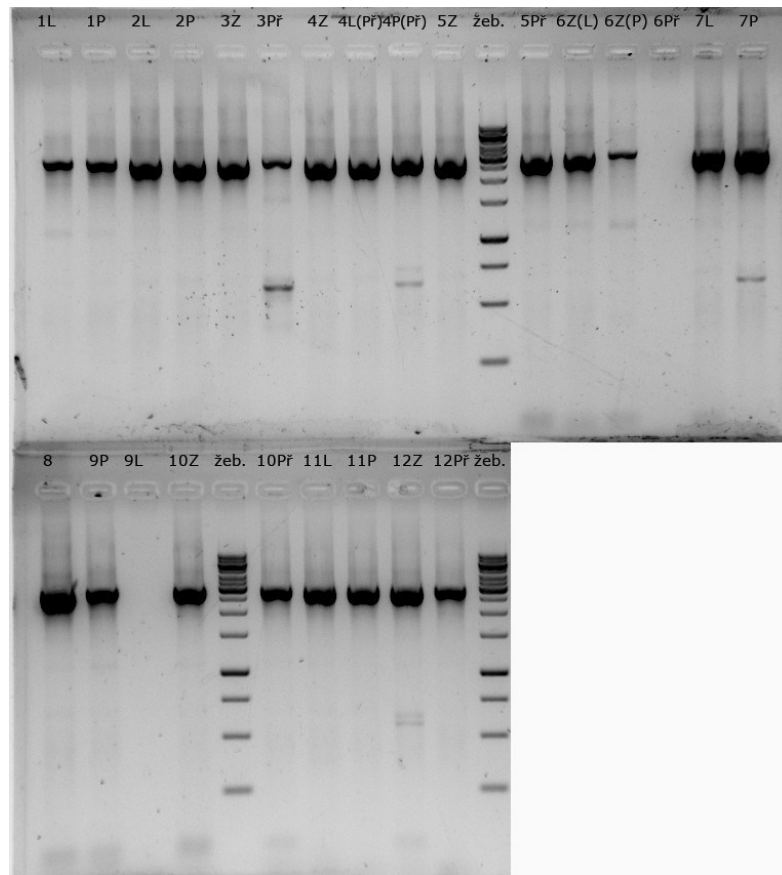
Obr. 3: plasmid pHEE401E_pUBQ:eGFP. V plasmidu se nacházejí místa štěpná BsaI odpovídající sekvencím v DT1-BsF a DT2-BsR primerech. Plasmid dále obsahuje gen pro kanamycinovou a hygromycinovou rezistenci. V místě, do kterého se CRISPR kazeta vkládá je spektinomycinová rezistence, která slouží pro kontrolu vložení. Cas9 je pod promotorem EC1.1 a enhancerem EC1.2, což umožňuje specifickou expresi ve vaječné buňce. V plasmidu je GFP reportérový gen umožňující kontrolu na přítomnost CRISPR kazety v transformovaném organismu.



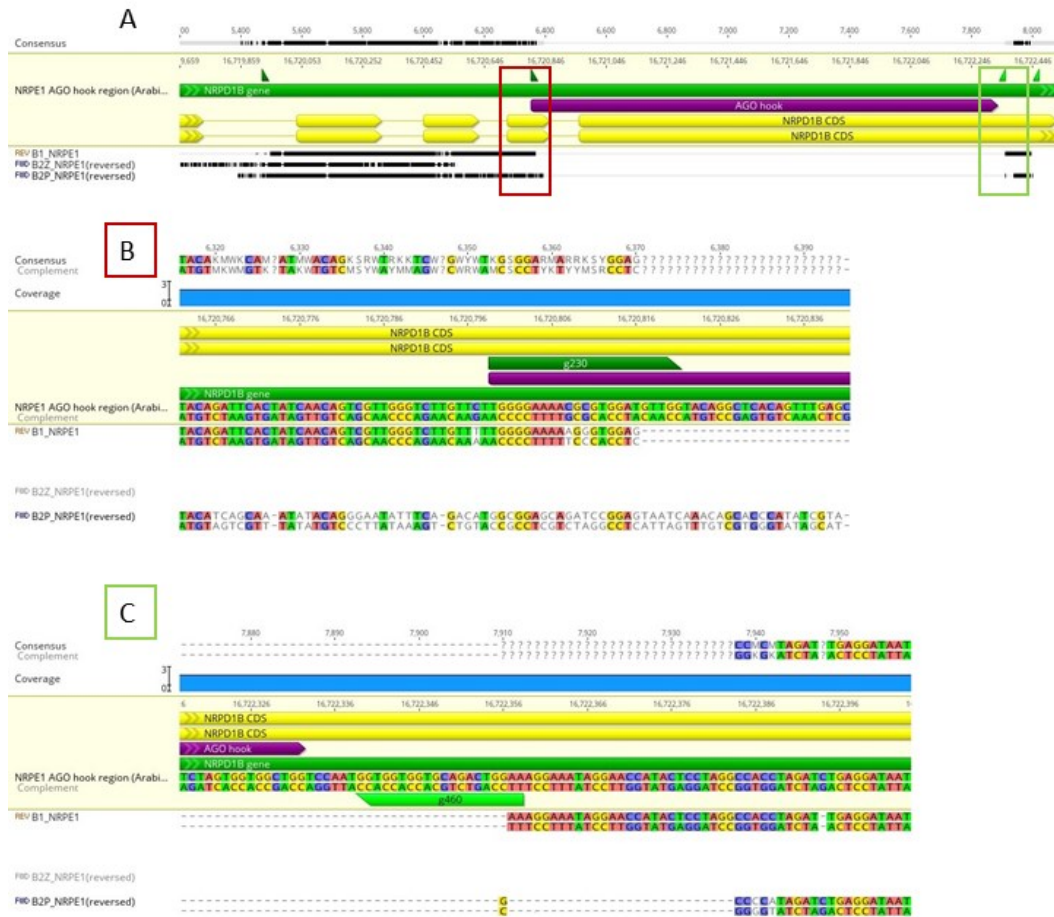
Obr. 4: Gel všech vyizolovaných DNA rostlin *spt5l* v T2 generaci (druhý pokus) dokazující přítomnost homozygotních variant (B6-5L, B6-6Z, B6-6P, B6-7L, B6-8L) a heterozygotních variant bez CRISPR kazety (B6-1ØP, B6-8ØP, B6-PØ, A4-5Ø, A4-7Ø). Použitý je Ikbp žebříček. Ø symbolizuje nesvitící rostliny.



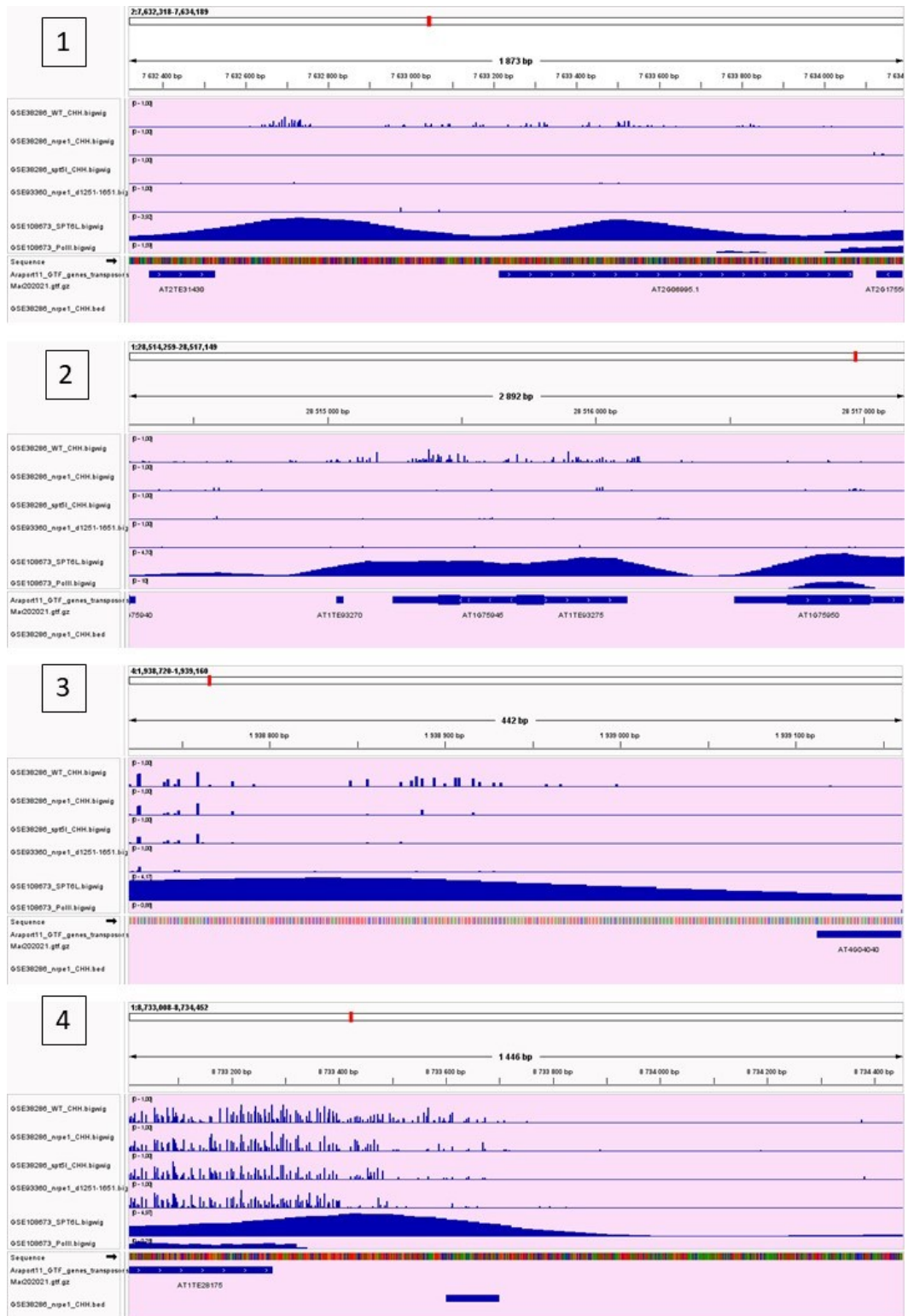
Obr. 5: Gel s DNA *spt5l* rostlin v T2 generaci (druhý pokus), které byly vybrány na základě první PCR pro druhou zkrácenou verzi PCR. Došlo k potvrzení specifických produktů pouze u vzorků B6-6, B6-7 a B6-8, kontrola je rostlina B6Z z T1 generace, žebříček je 1 kbp.



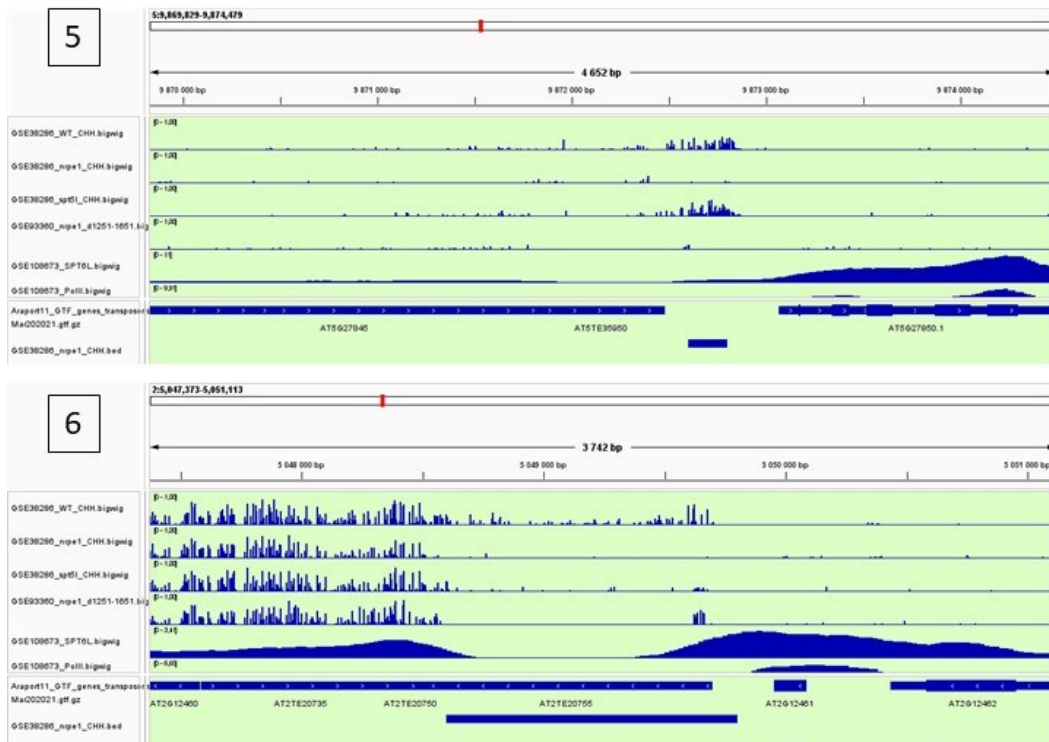
Obr. 6: Gel všech vyizolovaných DNA rostlin *spt5l* v T3 generaci (první pokus) dokazující, že žádná rostlina není homozygotní v mutantní alele (všechny rostliny jsou potomkem B6-8 \emptyset). Použitý je 1kbp žebříček.



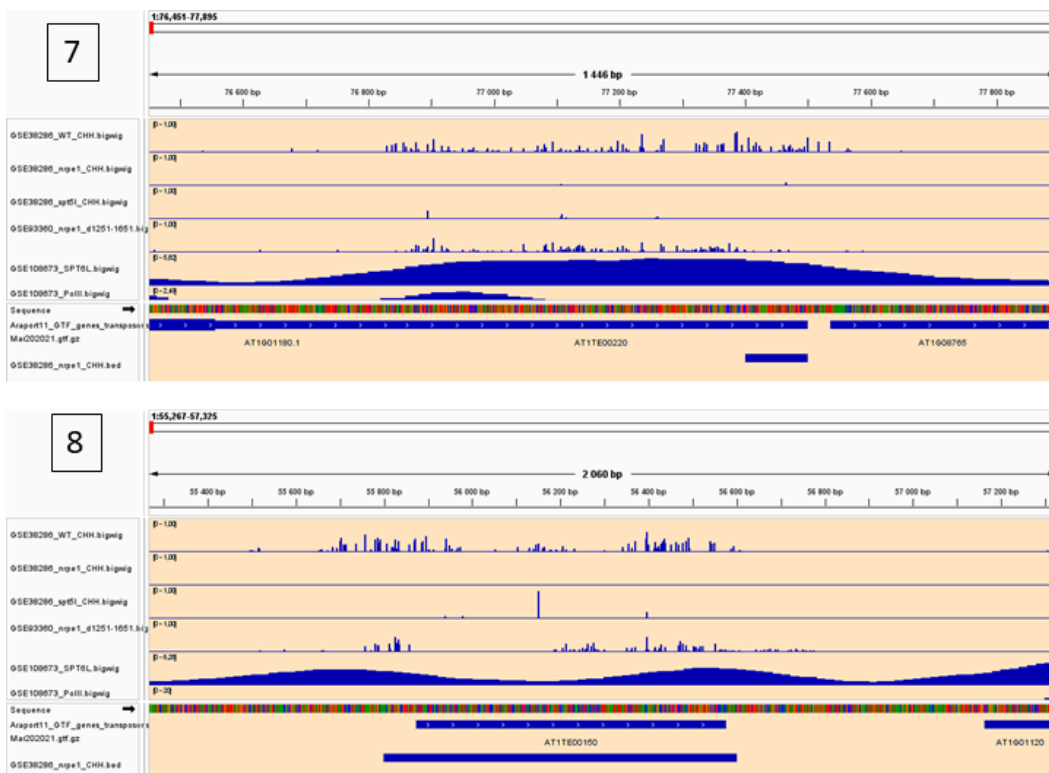
Obr. 7: Sekvence B rostlin s NRPE1 kazetou, nekvalitní vzorky. A – souhrnný obrázek vzorků B1, B2P, B2Z, na světležlutém poli referenční genom *A. thaliana*, B – detail mutace vlevo (5' konec delece), C – detail mutace vpravo (3' konec delece).



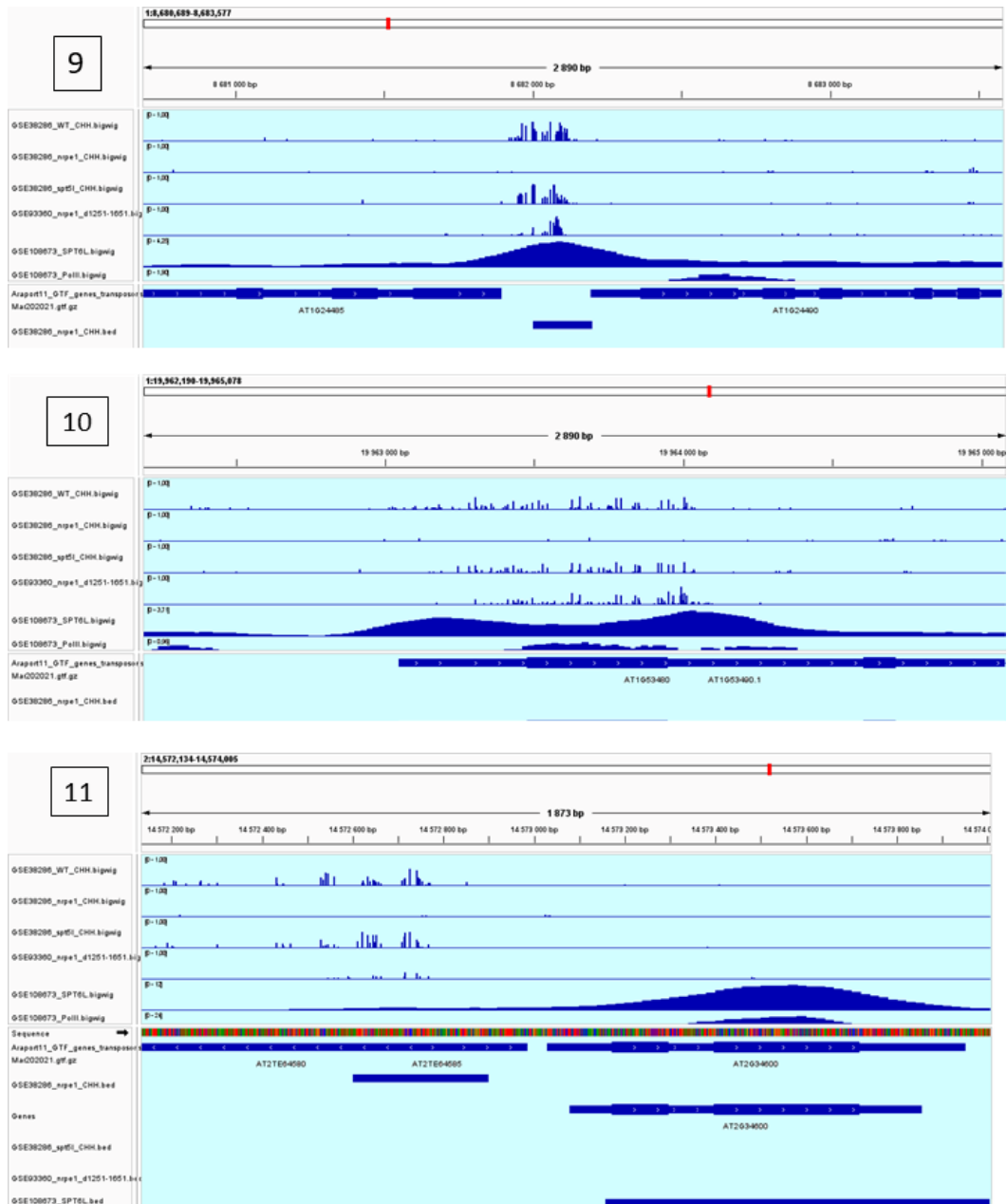
Obr. 8: vybrané lokusy v kontextu *A* (metylace přítomná pouze ve WT). 1- lokus AT2G06995, 2 – lokus AT1TE93275, 3 – lokus AT4G04040, 4 – lokus AT1TE28175. Pořadí řádků: WT, nrpe1, nrpe1ΔAh, SPT6L pokrytí, genom *Arabidopsis thaliana*, nrpe1 DMR hypoCHH



Obr. 9: vybrané lokusy v kontextu B (metylace přítomna ve WT a *spt5l*), 5 - lokus AT5TE35950, 6 – lokus AT2TE20755. Pořadí řádků: WT, *nrpe1*, *spt5l*, *nrpe1ΔAh*, SPT6L pokrytí, genom *Arabidopsis thaliana*, *nrpe1* DMR *hypoCHH*



Obr. 10: vybrané lokusy v kontextu C (metylace přítomna ve WT a *nrpe1ΔAh*), 7- lokus ATITE00220, 8 – lokus ATITE00150. Pořadí řádků: WT, *nrpe1*, *spt5l*, *nrpe1ΔAh*, SPT6L pokrytí, genom *Arabidopsis thaliana*, *nrpe1* DMR *hypoCHH*



Obr. 11: vybrané lokusy v kontextu D (metylace přítomna ve WT, *spt5l* a *nrpe1ΔAh*). 9 – lokus AT1G24490, 10 – lokus AT1G53480, 11 – lokus AT2TE64585. Pořadí řádků: WT, *nrpe1*, *spt5l*, *nrpe1ΔAh*, SPT6L pokrytí, genom *Arabidopsis thaliana*, *nrpe1* DMR hypoCHH