

Supplementary Materials

Do DEEPER ROOTING 1 homologs regulate the lateral root slope angle in cucumber (*Cucumis sativus*)?

Alexey S. Kiryushkin, Elena L. Ilina, Tatyana Y. Kiikova, Katharina Pawlowski and Kirill N. Demchenko

The following Supplementary Material is available for this article:

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Figure S1. Alignment of AtqSOR1 (Kitomi et al., 2020) and AtNGR1/AtDRO3/AtLAZY2 (gene ID: AT1G17400.1) proteins. The sequences have 100% identity between each other.

Kitomi, Y., Hanzawa, E., Kuya, N., Inoue, H., Hara, N., Kawai, S., et al. (2020). Root angle modifications by the DRO1 homolog improve rice yields in saline paddy fields. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 117(35), 21242–21250. doi: 10.1073/pnas.2005911117

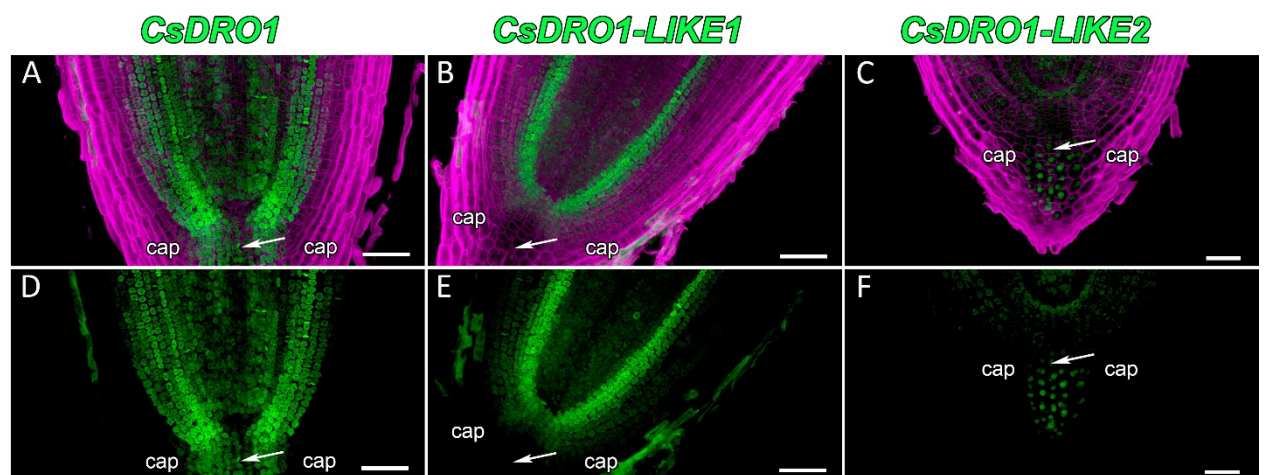


Figure S2. Localization of CsDRO1, CsDRO1-LIKE1, and CsDRO1-LIKE2 expression in the root cap of *Cucumis sativus* (*pCsDRO::mNeonGreen-H2B*). Confocal laser scanning microscopy of longitudinal vibratome sections. Expression of CsDRO1 (A,D) was active in the root cap columella (white arrow). (B,E) Activity of *pCsDRO1L1* was not observed in the root cap columella (white arrow). (C,F) Expression of CsDRO1L2 was maintained in the apical part of the root cap columella (white arrow). Green channel, fluorescence of mNeonGreen; magenta channel, SR2200-stained cell walls. Maximum intensity projection of z-series: of 12 optical sections, 8 µm in depth. Scale bars – (A,B,D,E), 100 µm; (C,F), 50 µm.

Figure S3. CsDRO1 (biallelic homozygous mutations)

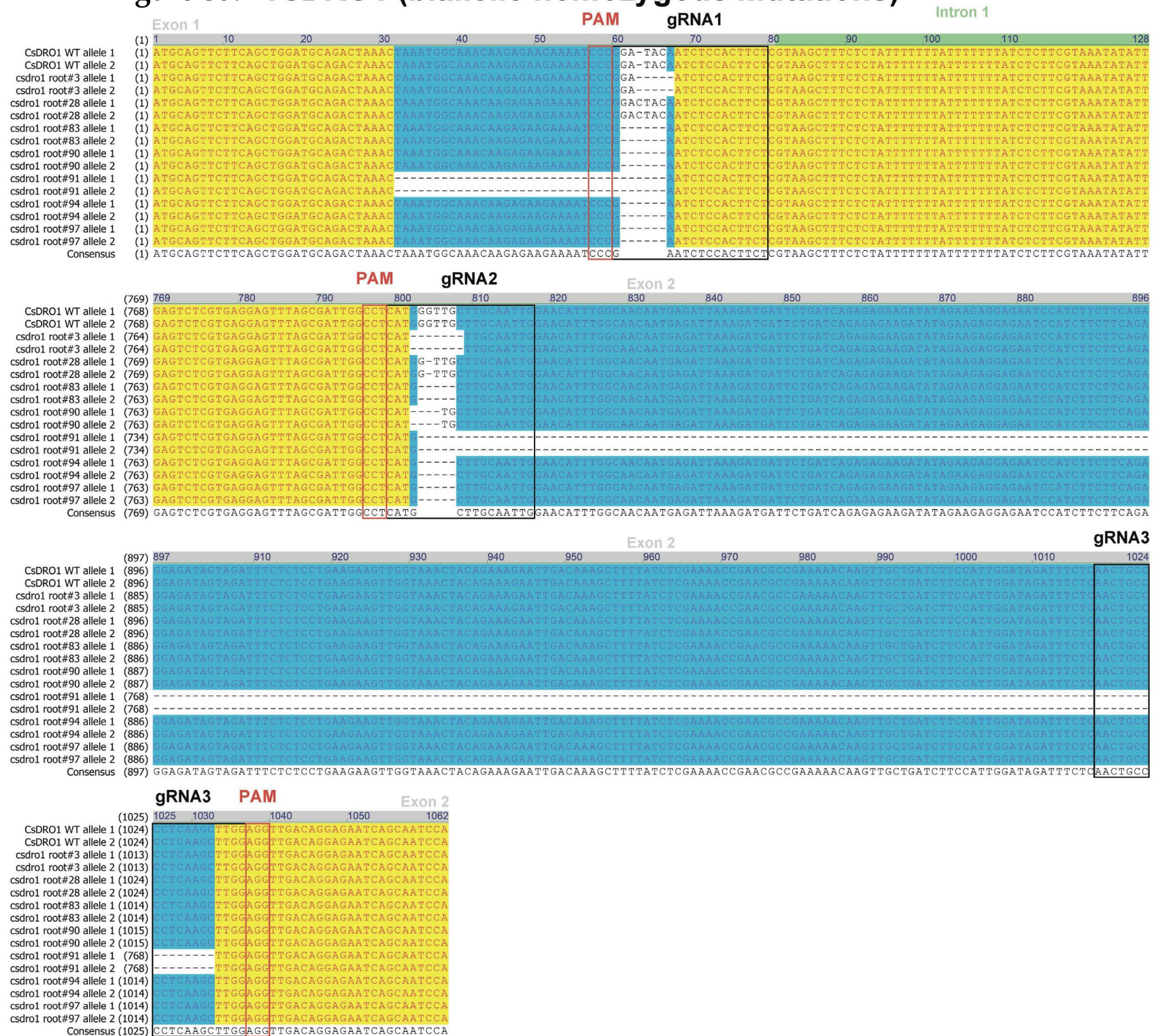
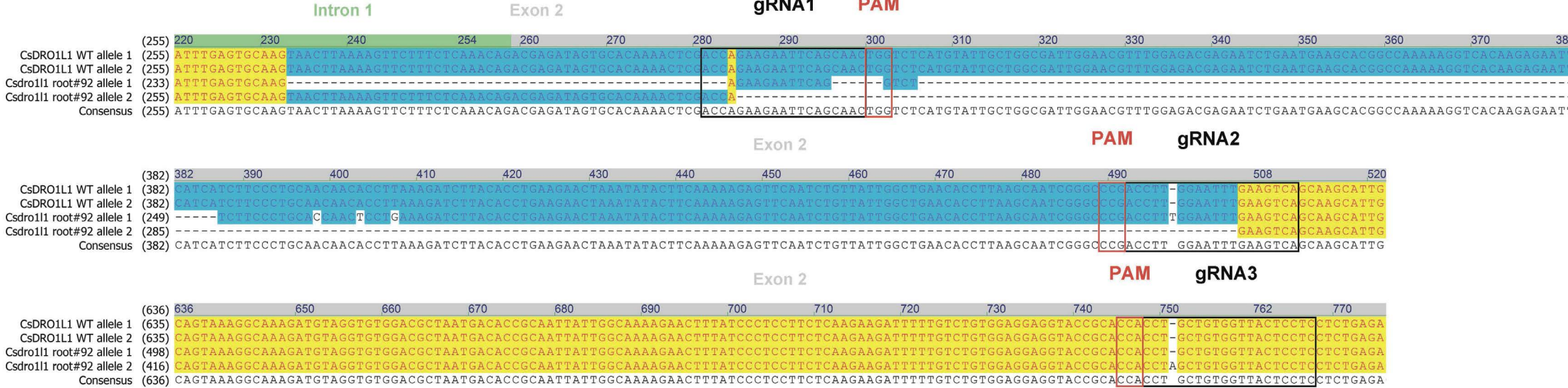


Figure S4. CsDRO1-LIKE1 (biallelic heterozygous mutations)



[illegible]

Figure S6. **CsDRO1-LIKE2** (biallelic heterozygous mutations)

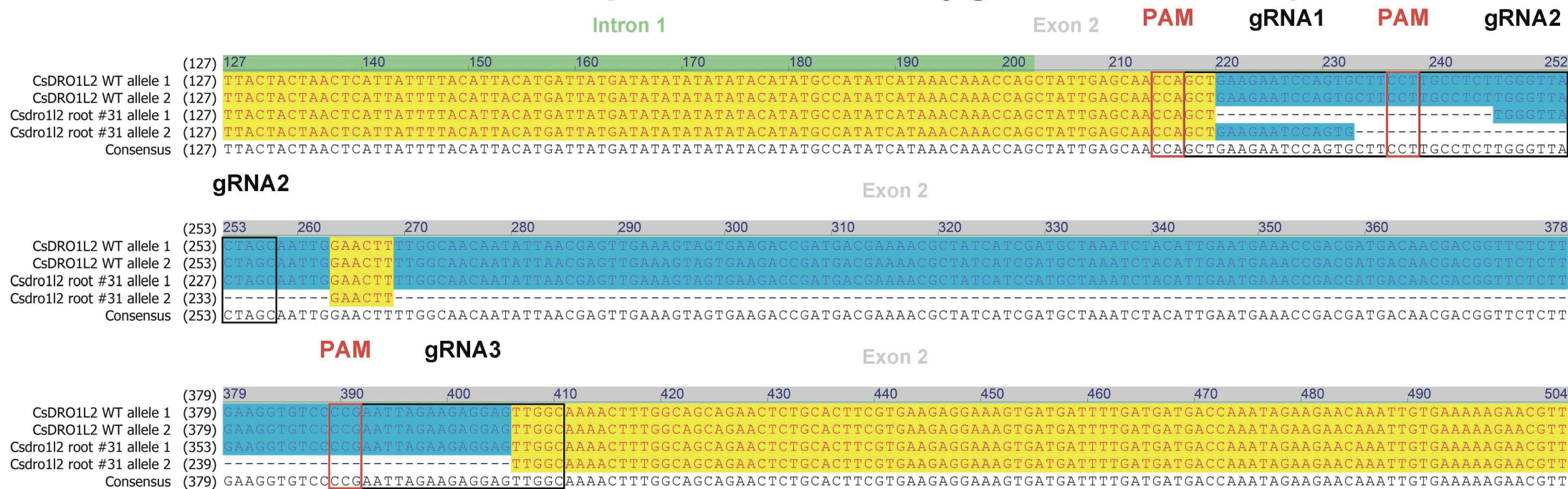
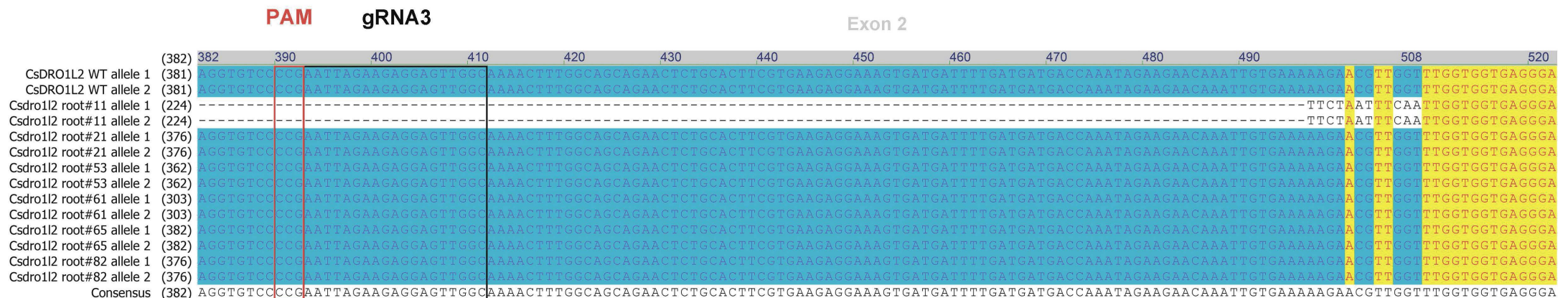
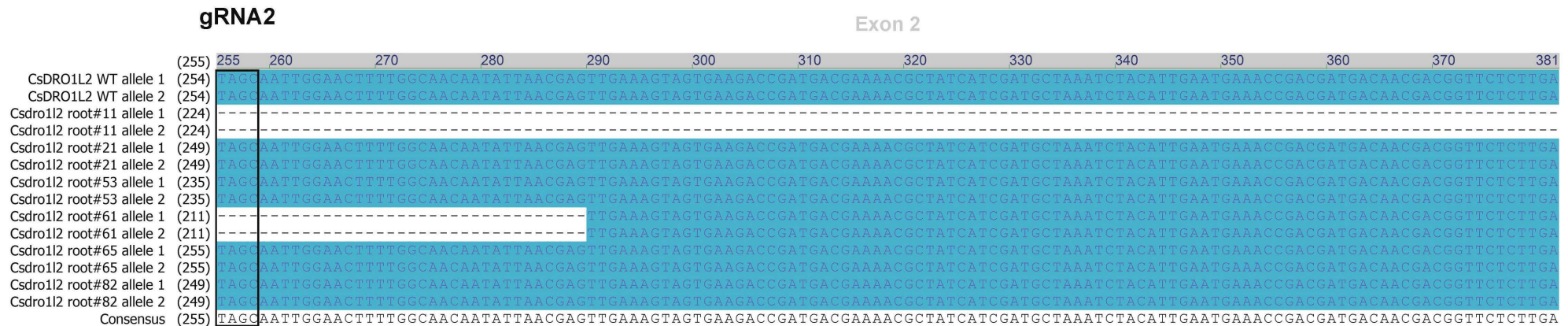
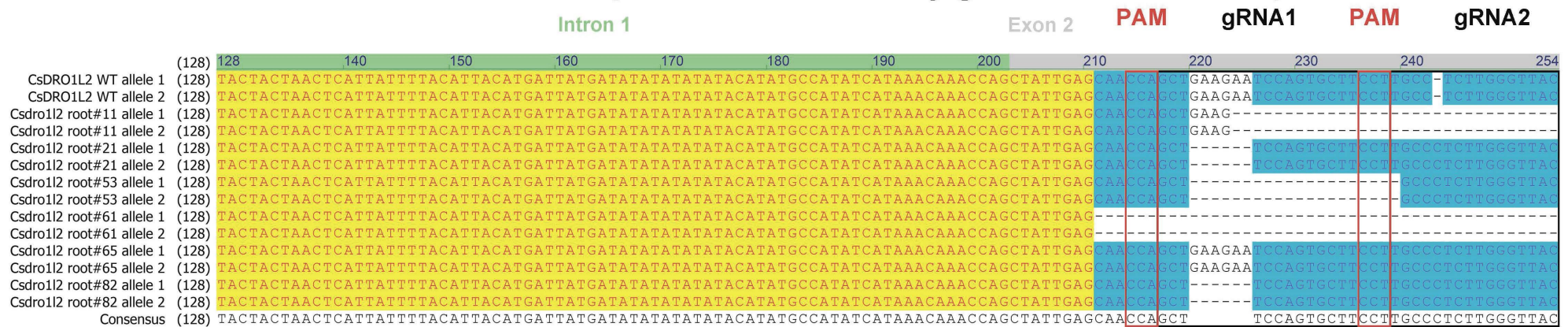


Figure S7. CsDRO1-LIKE2 (biallelic homozygous mutations)



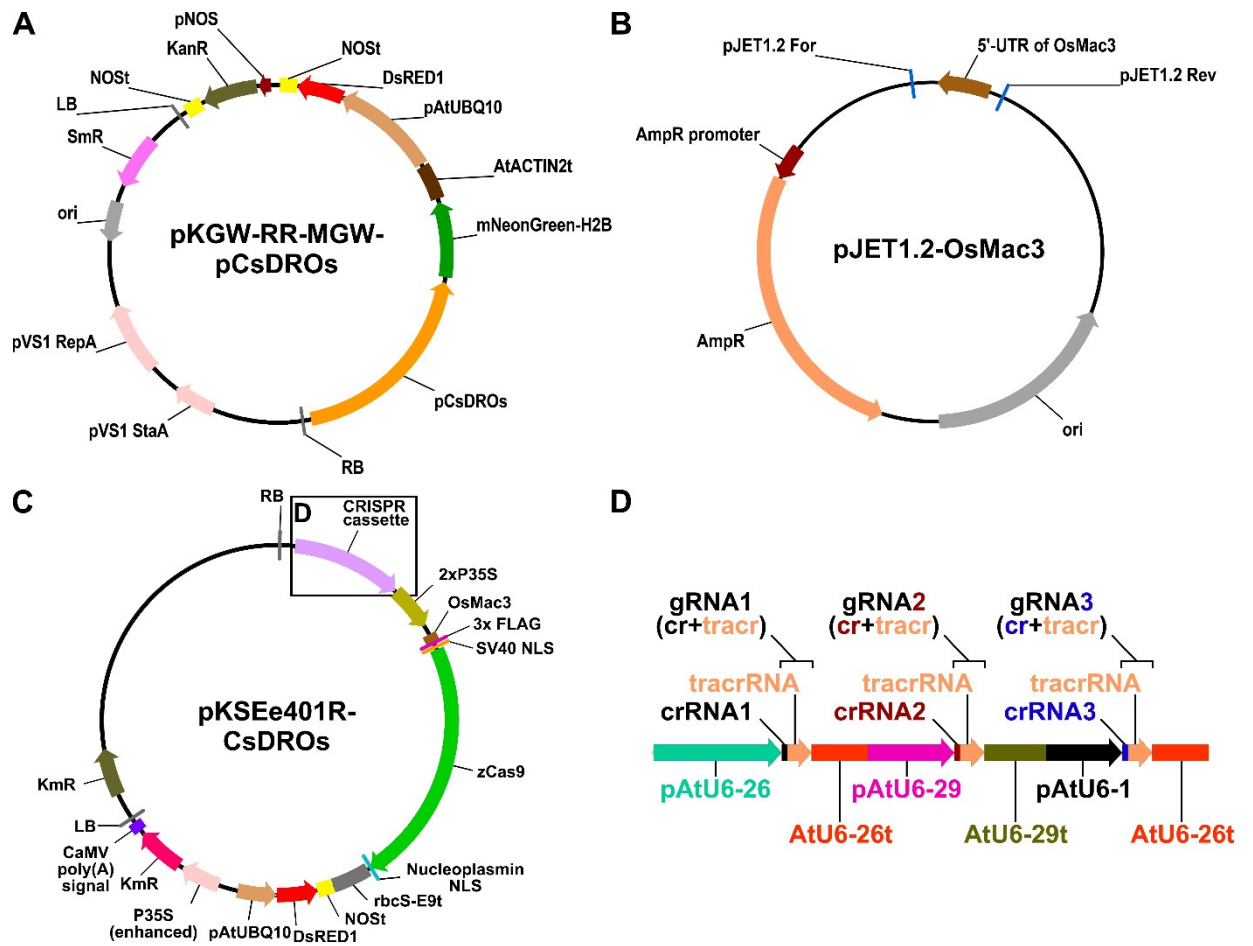


Figure S8. Maps of vectors used in this study. (A) Map of the pKGW-RR-MGW binary vector containing the *H2B-mNeonGreen* reporter under control of *CsDRO1*, *CsDRO1-LIKE1*, or *CsDRO1-LIKE2* promoter (*pCsDROs*). (B) Map of the pJET1.2 plasmid harboring the 158-bp 5'-UTR fragment of *OsMac3*. (C) Common map of the binary plasmids for genome editing, pKSEe401R-*CsDRO1*, pKSEe401R-*CsDRO1-LIKE1*, and pKSEe401R-*CsDRO1-LIKE2* (pKSEe401R-*CsDROs*). (D) General scheme of CRISPR cassette consisting of three guide RNA (gRNA)-expressing domains for targeting of each gene *CsDRO1*, *CsDRO1-LIKE1*, or *CsDRO1-LIKE2*. One domain comprises the promoter of the Arabidopsis *U6* small nucleolar RNA (*snoRNA*) gene (*pAtU6-26*, *pAtU6-29*, or *pAtU6-1*), the gRNA sequence (gRNA1, gRNA2, or gRNA3), and the Arabidopsis *U6* *snoRNA* transcription terminator (*AtU6-26t* or *pAtU6-29t*). Each gRNA sequence, in turn, was designed to contain two fused sequences, the 19-bp target specific *crisprRNA* (crRNA1, crRNA2, or crRNA3) and the conservative 80-bp *trans*-activating crRNA (*tracrRNA*). Both pKGW-RR-MGW-pCsDROs (A) and pKSEe401R-*CsDROs* (C) binary vectors carried the *pAtUBQ10-DsRED1-NOST* screening cassette (Limpens et al., 2004) in the backbone.

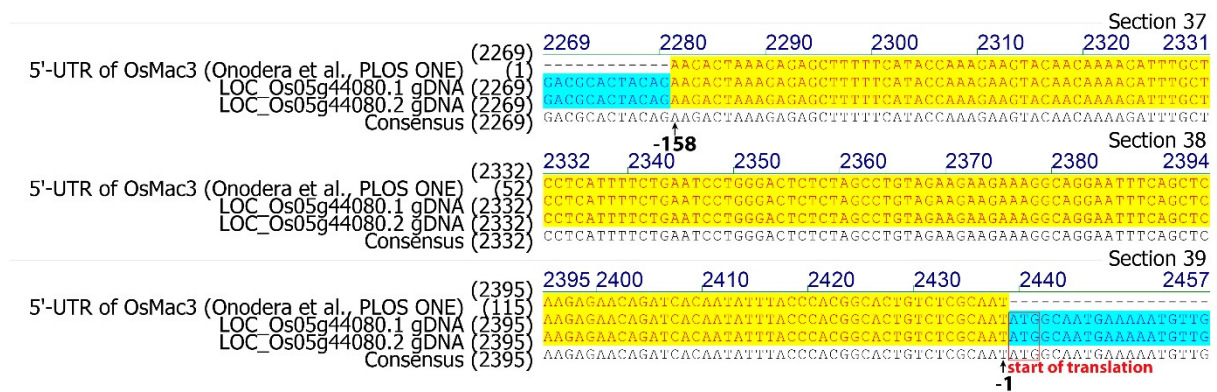


Figure S9. Fragment of the nucleotide sequence alignment between 5'-UTRs of LOC_Os05g44080.1, LOC_Os05g44080.2 (*Oryza sativa* v7.0 based on Phytozome v13), and 158-bp 5'-UTR fragment (from -158 to -1 b.p. before the ATG) of *OsMac3* from Onodera et al. (2018). The yellow color indicates the similar area between all sequences analyzed. Arrows with numbers indicate the position of the site relative to the translation start, ATG (marked with a red rectangle).

- Limpens, E., Ramos, J., Franken, C., Raz, V., Compaan, B., Franssen, H., et al. (2004). RNA interference in *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *J. Exp. Bot.* 55(399), 983-992. doi: 10.1093/jxb/erh122
- Onodera, H., Shingu, S., Ohnuma, M., Horie, T., Kihira, M., Kusano, H., et al. (2018). Establishment of a conditional TALEN system using the translational enhancer dMac3 and an inducible promoter activated by glucocorticoid treatment to increase the frequency of targeted mutagenesis in plants. *PLOS ONE* 13(12), 1-13. doi: 10.1371/journal.pone.0208959

Table S1. List of primers used in this study.

Name	Sequence 5'-3'	Application
CsEF1a_qFor	ATGGGTAAGGAGAAGGTTACATTAACATT	RT-qPCR analysis
CsEF1a_qRev	CGAACTTCCACAAAGCAATATCAATT	
CsDRO1_qFor	CCATAAAAAACAAGAGTCTCGTGAGGAG	
CsDRO1_qRev	GCTTTGTCAATTCTTTCTGTAGTTTACCAA	
CsDRO1-LIKE1_qFor	GCAAAAAGAACAACATCAAATTCAATCAA	
CsDRO1-LIKE1_qRev	GTGCTTCATTCAGATTCTCGTCTCC	
CsDRO1-LIKE2_qFor	GGATCATATAATTCTTCAAACCTTCAAGT	
CsDRO1-LIKE2_qRev	CAAGAGGCAAGGAAGCACTGGA	
pCsDRO1_For_XhoI	AACTCGAGGCATATCAATGGCTCAAATCCAAAAG	Promoter cloning into pENTRattL4attR1_BSAI
pCsDRO1_Rev_KpnI	AAAGGTACCTAAATGAAAAAAGAGAATCAAATCCCA	
pCsDRO1-LIKE1_For_XhoI	AACTCGAGGAGATGTTCTTCCTCAAATCTTCTCGT	
pCsDRO1-LIKE1_Rev_KpnI	AAAGGTACCTTGTCAAAAGACGGATTGGCAAC	
pCsDRO1-LIKE2_For_XhoI	AACTCGAGCTTGCTCAGCAACATCACGTATATCA	
pCsDRO1-LIKE2_Rev_KpnI	AAAGGTACCCAACTCAACAACTGAAACCCAAA	
OsMac3_For	AAGACTAAAGAGAGCTTTTCATACCAAAG	Cloning of the <i>OsMac3</i> 5'-UTR fragment into pJET1.2 and sequencing
OsMac3_Rev	ATTGCGAGACAGTGCCGTGG	Fusion <i>OsMac3</i> with <i>zCas9</i> and cloning into pKSE401 via Gibson Assembly
OsMac3_For_Gi_XbaI	CATTACGAACGATACTCGAGTAATCTAGAAAGACTAAAGAGAGCTTTTCATACCAAAG	
OsMac3_Rev_Gi	CGTGGTCCTTGTAATCCCCGTCGTGGTCTTGTAATCCATATTGCGAGACAGTGCCGTGG	
zCas9_For_Gi	CAATATTTACCCACGGCACTGTCTCGCAATATGGATTACAAAGGACCACGACGG	
zCas9_Rev_Gi_SacI	ACCGATGATACGAACGAAAGCTCTGAGCTCTCACTTCTTCTTCTCGCCTGCC	
zCas9_Rev1	CAACAGAGTTAGTCCCAATATCGAGG	Sequencing of the <i>OsMac3</i> - <i>zCas9</i> fusion after Gibson Assembly
zCas9_For2	ATGGATTACAAGGACCACGACGG	
zCas9_Rev2	CGAGACTTCGAGAGCCTAGCGGA	
zCas9_For3	CATCTGCGGAAGAAGCTCGTGG	
zCas9_Rev3	ATGAATCTGGTGTGGGATGCTGC	
zCas9_For4	CGATCAGTCGAAGAACGGCTACG	
zCas9_Rev4	CTCATTCTCCTCGTTGTCCAGGAAG	
zCas9_For5	ATCGTGGACCTCCTGTTCAAGACC	
zCas9_Rev5	CGTCGTAATCGCTGAGCCTGTTAATAT	
zCas9_For6	AAGCCTGAGAACATCGTCATTGAGAT	
zCas9_Rev6	TCCTCACATCGTAAACCTTGTAGTCCC	
zCas9_For7	GAAGGTCATCACCTGAAGTCAAAGC	
zCas9_Rev7	GCCAGCGGAAGCCAGCA	
zCas9_For8	GGTTCGACAGCCCCACTGTG	
zCas9_Rev8	AGAGCTCTCACTTCTTCTTCTCGCCTGCC	
pAtUBQ10_For_EcoRI	AAGAATTCGGGACGAAGTCCAGTAATAAACGG	Cloning of the <i>pAtUBQ10</i> - <i>DsRED1</i> - <i>NOS</i> cassette
NOS_Rev_EcoRI	AAGAATTCGATCTAGTAACATAGATGACACCGCGC	

Name	Sequence 5'-3'	Application
		into pKSEe401 and sequencing
M13_Rev	AACAGCTATGACCATG	Sequencing of the <i>pAtUBQ10-DsRED1-NOS</i> cassette after insertion into pKSEe401
pAtUBQ10_Rev	TGTTAATCAGAAAACTCAGATTAATCTACAAATT	
DsRED1_For	ATGGCGCGCTCCTCCAAG	
DsRED1_REV	CAGGAACAGGTGGTGGCGG	
CsDRO1_g1_DT1_BsaI_F	ATATATGGTCTCGATTGagaagtgagattgtatccGTT	Assembly of pKSEe401R-CsDRO1
CsDRO1_g1_DT1_F0	TGagaagtgagattgtatccGTTTITAGAGCTAGAAATAGC	
DT0_BsaI_R2	ATATTATTGGTCTCAATCTCTTAGTCGACTCTACCAAT	
CsDRO1_g2_DT2_BsaI_F2	ATATTATTGGTCTCAAGATTGcaattgcaagcaacccatgGTT	Assembly of pKSEe401R-CsDRO1
CsDRO1_g2_DT2_F0	TGcaattgcaagcaacccatgGTTTITAGAGCTAGAAATAGC	
CsDRO1_g3_DT3_R0	AACccaagcttgagggcagttCAATCACTACTTCGTCTCTAACCAT	
CsDRO1_g3_DT3_BsaI_R	ATTATTGGTCTCGAAACccaagcttgagggcagttC	
CsDRO1-LIKE1_g1_DT1_BsaI_F	ATATATGGTCTCGATTGaccagaagaattcagcaacGTT	Assembly of pKSEe401R-CsDRO1-LIKE1
CsDRO1-LIKE1_g1_DT1_F0	TGaccagaagaattcagcaacGTTTITAGAGCTAGAAATAGC	
DT0_BsaI_R2	the same as for the pKSEe401R-CsDRO1 assembly	
CsDRO1-LIKE1_g2_DT2_BsaI_F2	ATATTATTGGTCTCAAGATTGtgacttcaaattccaaggtGTT	
CsDRO1-LIKE1_g2_DT2_F0	TGtgacttcaaattccaaggtGTTTITAGAGCTAGAAATAGC	
CsDRO1-LIKE1_g3_DT3_R0	AACcctgtgtggttactctcCAATCACTACTTCGTCTCTAACCAT	
CsDRO1-LIKE1_g3_DT3_BsaI_R	ATTATTGGTCTCGAAACcctgtgtggttactctcC	Assembly of pKSEe401R-CsDRO1-LIKE2
CsDRO1-LIKE2_g1_DT1_BsaI_F	ATATATGGTCTCGATTGagcactggattcttcagcGTT	
CsDRO1-LIKE2_g1_DT1_F0	TGagcactggattcttcagcGTTTITAGAGCTAGAAATAGC	
DT0_BsaI_R2	the same as for the pKSEe401R-CsDRO1 assembly	
CsDRO1-LIKE2_g2_DT2_BsaI_F2	ATATTATTGGTCTCAAGATTGgctagtaaccaagaggcaGTT	
CsDRO1-LIKE2_g2_DT2_F0	TGgctagtaaccaagaggcaGTTTITAGAGCTAGAAATAGC	
CsDRO1-LIKE2_g3_DT3_R0	AACaattagaagaggagttggcCAATCACTACTTCGTCTCTAACCAT	
CsDRO1-LIKE2_g3_DT3_BsaI_R	ATTATTGGTCTCGAAACaattagaagaggagttggcC	Sequencing of the CRISPR-cassettes in pKSEe401R-DRO1, -CsDRO1-LIKE1, and -CsDRO1-LIKE2
M13_For	GTA AACGACGGCCAGT	
AtU6-26p_For	TGTCCCAGGATTAGAATGATTAGGC	
AtU6-29p_For	TTAATCCAACTACTGCAGCCTGAC	
AtU6-29p_Rev	AGCCCTCTTCTTTCGATCCATCAAC	
AtU6-29t_For	CGTGTTCAGCTCTCATGATCCTTG	
AtU6-1p_Rev	TATGCAAGTCTCACTCACACTCAG	
CsDRO1_5'-UTR_For	GTTCTGCTTCGGCATT CATCTTG	PCR-amplification of the CsDRO1 ORF and sequencing to search genome editing events within it
CsDRO1_3'-UTR_Rev	ATTTC AAAACAAGGGGTGGAGATTG	
CsDRO1_Intron1_For	TGTGCCTTGTTCCTTGTTC	Additional primers for sequencing to search genome editing events within the CsDRO1 ORF
CsDRO1_Intron2_Rev	TGATCTTTAGGATTTAATAATGAATATGCACA	
CsDRO1_Exon2_For	CTTTTATCTCGAAAACCGAACGCC	

Name	Sequence 5'-3'	Application
CsDRO1-LIKE1_5'-UTR_For	TCCCTGTTGCCAATCCGTCTTT	PCR-amplification of the CsDRO1-LIKE1 ORF and sequencing to search genome editing events within it
CsDRO1-LIKE1_3'-UTR_Rev	CCAAGCGAGAAAATAATGTCTTGTGAACT	
CsDRO1-LIKE2_5'-UTR_For	TTCTGAATAACCCCTTTAATTTTGGTG	PCR-amplification of the CsDRO1-LIKE2 ORF and sequencing to search genome editing events within it
CsDRO1-LIKE2_3'-UTR_Rev	CTATGGCAATAGTTACCTCTCATCTTCATC	
CsDRO1-LIKE2_Exon2_Rev1	TTCTAATTCGGGGACACCTTCAAG	Additional primers for sequencing to search genome editing events within the CsDRO1-LIKE2 ORF
CsDRO1-LIKE2_Exon2_For	TTGGAACCTTTGGCAACAATATTAACG	
CsDRO1-LIKE2_Exon2_Rev2	TTTGTCTTCTATTTGGTCATCATCAAAGT	

Restriction enzyme sites in adaptors are underlined and given in **bold** style.

For long primers the primer sequences are separated from adaptors by the gray background.

The target specific *crispr*RNA sequences are given in small letters.