

1. Tytuł zadania: Opracowanie i wykorzystanie metod biotechnologicznych do skrócenia cyklu hodowlanego pszenżyta oraz do poprawy efektywności selekcji –miejscowo-specyficzna mutageniza z wykorzystaniem miejscowo-specyficznych nukleaz.

2. Kierownik zadania: Anna Linkiewicz, Laboratorium Kontroli GMO, Zakład Biotechnologii i Cytogenetyki Roślin IHAR-PIB

Celem prac prowadzonych w 2016 r było przeprowadzenie doświadczeń wykazujących możliwość wprowadzenia precyzyjnych zmian w genach mających wpływ na spoczynek nasion, metodą mutagenazy miejscowo specyficznej, na przykładzie rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana*

3. Temat obejmował 4 zadania:

Wykorzystanie nukleaz TALE do wprowadzenia zmian w wybranych *loci* genów odpowiedzialnych za spoczynek nasion Określenie poziomu ekspresji TALEN w komórkach rośliny modelowej

Analiza edycji genomu w miejscu docelowym dla TALEN

Analiza funkcjonalna wybranych *loci* wykazujących silną korelację między ekspresją genu i spoczynkiem nasion w roślinie modelowej

Wyniki i dyskusja:

Na podstawie analiz bioinformatycznych zaprojektowano nukleazy TALE dla 2 genów związanych ze spoczynkiem u rzodkiewnika. Konstrukcje genowe wykonano metodą GoldenGate co obejmowało stworzenie wektorów pośrenich oraz ostateczne klonowanie do wektorów docelowych umożliwiających ekspresję w roślinach dwuliściennych. Wszystkie etapy prac potwierdzane były poprzez trawienia restrykcyjne i sekwencjonowanie. Zastosowana metoda klonowania doprowadziła do uzyskania zaplanowanych i poprawnie zbudowanych konstruktów TALEN dla sekwencji 2 genów związanych z porastaniem u rzodkiewnika.

Założono, że system transformacji protoplastów mezofilowych rzodkiewnika posłuży do przeprowadzenia sprawdzenia funkcjonalności konstruktów. Efektywność transformacji zastosowanymi konstruktami z nukleazami TALE była na tym etapie oceniana poprzez oznaczenie ekspresji białka zielonej fluorescencji GFP, ponieważ wprowadzone konstrukty zawierały prócz kasety niosącej dany TALEN, gen reporterowy kodujący GFP. Zaobserwowane różnice w poziomie transfekcji protoplastów oraz efektywność izolacji protoplastów z poszczególnych roślin wskazują na konieczność zastosowania uprawy roślin donorowych w ściśle kontrolowanych warunkach (temp, wilgotność) jak też optymalizacji transfekcji, w tym szczególnie sposobu oczyszczania plazmidu i stosunku ilości plazmidu do gęstości zastosowanych protoplastów.

W celu wykrycia mutacji w docelowym rejonie danego genu została wykorzystana metoda identyfikacji mutacji z użyciem endonukleazy T7. Produkty PCR oczyszczano, denaturowano przez podgrzewanie i poddawano re-annealingowi. Dupleksy DNA były trawione endonukleazą T7 i rozdzielane na żelu agarozowym. Metoda nie wykryła w badanym materiale heterodupleksów powstałych z połączenia nici DNA niosącej mutację z nicią typu dzikiego. Również analizy na poziomie RNA nie potwierdziły zmian w poziomie ujawnienia się danego genu. Uzyskany materiał gdzie poziom transfekcji protoplastów był wyższy został zgromadzony i będzie analizowany na dalszych etapach projektu. W przypadku wadliwego działania TALEN nie wyklucza się konieczności nowego zaprojektowania wektorów i dalszej optymalizacji metody.