

KRZYSZTOF MICHALSKI

ANNA M. LINKIEWICZ

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Zakład Biotechnologii i Cytogenetyki Roślin, Laboratorium Kontroli GMO

e-mail: krzysztof.michalski@ihar.edu.pl

Projektowanie, konstrukcja i ocena nukleaz CRISPR/Cas9 w celu edycji genów związanych z porastaniem przedzmiwnym pszenżyta

Pszenżyto jest przykładem obiecującej rośliny paszowej i energetycznej. Mimo wielu pozytywnych cech, takich jak odporność na choroby i duży potencjał plonowania, zbiór pszenżyta bywa utrudniony z powodu jego wysokiej podatności na porastanie przedzmiwne (PHS). Jednym z możliwych sposobów na uzyskanie linii pszenżyta o podwyższonej odporności na porastanie jest wprowadzenie zmian mutacyjnych w genach będących negatywnymi regulatorami spoczynku. Do tego celu wykorzystano technikę edytowania genomów CRISPR/Cas9 warunkującą miejscowo-specyficzną mutagenезę. Opisany jest proces projektowania i oceny nukleaz skierowanych wobec genów zaangażowanych w regulację czasu spoczynku ziarniaków pszenżyta. Wyróżnia się dwie, potencjalnie niezależne ścieżki regulujące czas spoczynku. Jedna z nich zależna jest od poziomu kwasu abscysynowego, druga natomiast integrowana jest przez produkt genu DOG1 (DELAY OF GERMINATION1). Zaprojektowano nukleazy skierowane przeciw negatywnym regulatorom spoczynku występującym w obu tych ścieżkach. CYP707A2 koduje oksydazę kwasu abscysynowego, obniżając poziom tego hormonu w ziarniakach. PP2A-A koduje natomiast podjednostkę fosfatazy białkowej, regulującą aktywność DOG1 w nasionach. Za specyficznosc wiązania nukleazy Cas9 do danego *locus* odpowiada wchodząca z nią w kompleks cząsteczka sgRNA (single guide RNA), którą można zaprojektować dla każdego *locus* o znanej sekwencji genomowej. Przed wprowadzeniem zaprojektowanej nukleazy do rośliny docelowej, konieczna jest odpowiednia ewaluacja specyficznosci i aktywnosci danego konstruktów poprzez analizy *in silico* oraz *in vitro*. Dla każdego z genów zaprojektowano trzy niezależne sekwencje sgRNA, których aktywność i specyficznosc oceniano w systemie przejściowej transfekcji protoplastów pszenżyta.