

ANNA LINKIEWICZ**KRZYSZTOF MICHALSKI**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Zakład Biotechnologii i Cytogenetyki Roślin, Laboratorium Kontroli GMO

Kierownik Tematu: dr Anna Linkiewicz Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików Zakład Biotechnologii i Cytogenetyki Roślin, Laboratorium Kontroli GMO, tel. +48 (22) 7334517, e mail: a.linkiewicz@ihar.edu.pl

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.hn.802.19.2018, Zadanie 13.

Opracowanie i wykorzystanie metod biotechnologicznych do skrócenia cyklu hodowlanego pszenżyta oraz do poprawy efektywności selekcji — miejscowo-specyficzna mutageneza z wykorzystaniem miejscowo-specyficznych nukleaz

Development and application of methods for the shortening of triticale breeding cycle and for the effective selection — site-specific mutagenesis using programmable nucleases

Słowa kluczowe: Crispr-Cas9, edytowanie genomu, mutageneza miejscowo-specyficzna, pszenżyto, TALEN

Celem badań było opracowanie konstruktów genowych do wprowadzenia mutacji w genach związanych z porastaniem u pszenżyta, ocenę funkcjonalności konstruktów nukleaz w systemie transfekcji protoplastów oraz optymalizację transformacji roślin wybranymi konstruktami i regeneracji *in vitro* pszenżyta. Zaprojektowano i wykonano 6 konstruktów do edycji sekwencji homologów genów PDF1 i CYP707A u pszenżyta. Konstrukty były sprawdzane metodą *transient assay* na protoplastach izolowanych z 4–7 dniowych siewek pszenżyta odmiany Bogo. Konstrukty zawierające sgRNA3 i sgRNA5 zostały wykorzystane do wprowadzania zmian w DNA protoplastów przy użyciu transfekcji z PEG. Obecny w konstrukcie gen markerowy GFP umożliwił ocenę wydajności transfekcji. Analizy na poziomie DNA potwierdziły wystąpienie zmian typu

delecje/insercje w przewidywanych regionach homologów genów CYP707A i PDF1 u pszenżyta. Wykonano analizy prowadzące do allelo-specyficznego amplifikacji PCR dla poszczególnych genomów cząstkowych A, B i R dla genów poddanych mutagenezie. Wybrane konstrukty genowe po przeklonowaniu do szczepu AGL1 *A. tumefaciens* zostały użyte do transformacji niedojrzałych zarodków pszenżyta zgodnie z procedurami opisanymi w Oleszczuk i in. 2004, z modyfikacjami własnymi. W wyniku prowadzonej selekcji i regeneracji otrzymano 10 linii T0 pszenżyta, które wykazały *in vitro* odporność na czynnik selekcyjny fosfotrycynę.

LITERATURA

Oleszczuk S., Sowa S., Zimny J. 2004. Direct embryogenesis and green plants regeneration from isolated microspores of hexaploid triticale (*x Triticosecale* Wittmack) cv. Bogo. *Plant Cell Rep.* 22: 885 — 893.