

Zadanie 3.20. Opracowanie procedury ukierunkowanej mutagenazy z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas dla wybranych gatunków roślin warzywnych (pomidor, ogórek).

Cel badań:

- opracowanie optymalnych warunków regeneracji *in vitro* wybranych genotypów ogórka i pomidora w różnych wariantach prowadzenia kultur,
- opracowanie metodyki izolacji protoplastów dla pomidora jako wstępnego etapu dla bezwektorowej metody edycji genów,
- identyfikacja oraz bioinformatyczna charakterystyka genu kandydującego do ukierunkowanej mutagenazy genomu pomidora mającej na celu uzyskanie bezkolankowej szypułki,
- scharakteryzowanie warstwy odcinającej (AZ) w szypułce u genotypów z mutacją *j-2* oraz z funkcjonalnym genem *J-2* na różnych etapach rozwoju kwiatostanu.

W ramach optymalizacji warunków regeneracji *in vitro* przetestowano sześć genotypów pomidora i trzy genotypy ogórka z wykorzystaniem dwóch typów eksplantatów dla każdego gatunku, wykazując istotny wpływ genotypu, rodzaju eksplantatu oraz regulatorów wzrostu na efektywność regeneracji. Wytypowano trzy genotypy pomidora o najwyższym potencjale regeneracyjnym jako podstawę do dalszej optymalizacji procedur transformacji i regeneracji roślin uzyskanych po edycji genomu. Równolegle przeprowadzono próbne transformacje trzech genotypów pomidora z wykorzystaniem *Agrobacterium tumefaciens*, potwierdzając skuteczność wprowadzenia transgenu na podstawie ekspresji genu reporterowego *gus*. W przypadku ogórka zaobserwowano istotnie niższą efektywność regeneracji w porównaniu z pomidorem oraz silną zależność odpowiedzi regeneracyjnej od genotypu i rodzaju eksplantatu, co potwierdza trudności w opracowaniu uniwersalnej metodyki regeneracji dla tego gatunku.

Rozpoczęto prace nad optymalizacją protokołu izolacji protoplastów z dwóch rodzajów eksplantatów pomidora, testując jedno- i dwustopniowe procedury trawienia ściany komórkowej z zastosowaniem różnych mieszanin enzymatycznych, co umożliwiło wskazanie kierunków dalszej optymalizacji pod kątem żywotności protoplastów oraz stopnia zanieczyszczenia izolatu niestrawionymi fragmentami tkanek.

W celu przygotowania strategii edycji genomu pomidora przeprowadzono analizę sekwencji genu *Solyc12g038510* związanego z występowaniem warstwy AZ w szypułce, u genotypów posiadających funkcjonalny (siedem genotypów) lub niefunkcjonalny (sześć genotypów) allel *J-2*. Uzyskane dane potwierdziły obecność znanych typów mutacji prowadzących do utraty funkcji genu, w tym insercji elementu transpozonowego oraz mutacji punktowych skutkujących przedwczesnym kodonem STOP. Równolegle wykonano analizę ekspresji genu *Solyc12g038510* w szypułkach metodą RT-qPCR, wykazując związek pomiędzy poziomem transkryptu a zdolnością do rozwoju warstwy odcinającej. Dodatkowo, dla pięciu wybranych genotypów (cztery mutanty *j-2*, jeden genotyp kontrolny *J-2*), przeprowadzono charakterystykę warstwy AZ w różnych stadiach rozwojowych kwiatostanu z wykorzystaniem mikroskopii świetlnej i skaningowej, co pozwoliło na powiązanie zmian morfologicznych i anatomicznych z obecnością funkcjonalnego lub niefunkcjonalnego allelu *J-2*. Równolegle rozpoczęto opracowanie komponentów systemu CRISPR/Cas na potrzeby ukierunkowanej mutagenazy, projektując dwie sekwencje sgRNA komplementarne do genu docelowego (*Solyc12g038510*), dobrane pod kątem wysokiej skuteczności i specyficzności cięcia.