

Celem projektu jest zastosowanie nowych technik inżynierii genetycznej w badaniach nad funkcją genów, które zmieniają i kontrolują różne procesy fizjologiczne. Badania realizowane będą w oparciu o nowatorską, nie testowaną dotychczas technologię CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats). Technika ta wykorzystuje proces ukierunkowanej mutagenyzy, który pozwala na wprowadzenie mutacji do teoretycznie każdego genu o znanej sekwencji. Poprzez wprowadzenie takiej mutacji, możliwe jest wyłączenie danego genu lub zmiana jego funkcji. W niniejszym projekcie, system CRISPR/Cas zostanie wykorzystany w celu uzyskania rośliny, która zmienia o zmienionym genotypie i fenotypie, poprzez indukcję mutacji w dwóch genach warunkujących różne cechy użytkowe.

Głównym obiektem naszych badań będzie gen HvCKX1, który zmienia, kodujący enzym oksydaz/dehydrogenaz cytokinin. Enzym ten katalizuje reakcję degradacji cytokinin – bardzo ważnej grupy hormonów roślinnych kontrolujących szereg procesów wzrostu i rozwoju. U zbóż, cytokininy są również istotnym czynnikiem wpływającym na plon ziarna. Celem badań jest zatem dokładne poznanie procesów fizjologicznych kontrolowanych przez gen HvCKX1, które zachodzą w dojrzewających ziarniakach. Za pomocą techniki CRISPR/Cas do genu HvCKX1 wprowadzona zostanie mutacja powodująca utratę jego funkcji. Pozwoli to na obserwację zmian fizjologicznych zachodzących w roślinie. Spodziewamy się, że efektem wyłączenia genu HvCKX1 będzie spadek aktywności enzymu dehydrogenazy cytokinin, a zatem poziom tych hormonów w dojrzewających ziarniakach powinien wzrosnąć. To z kolei może przyczynić się do wzrostu masy ziarniaków i w konsekwencji do większego plonu ziarna.

Drugim z badanych genów, który zmienia jest gen Nud, który kontroluje oplewienie ziarniaków. W odróżnieniu do większości odmian, które zmieniają, rośliny ze zmutowanym genem Nud wytwarzają nieoplewione (nagie) ziarniaki. Ze względu na znaną funkcję i możliwe bezpośredniej obserwacji efektu fenotypowego mutacji, gen Nud został wybrany w celu określenia efektywności i wydajności systemu CRISPR/Cas u rośliny, która zmienia.

Integralną częścią projektu będzie również analiza specyficzności systemu CRISPR/Cas, poprzez identyfikację potencjalnych, niespecyficznych mutacji, powstałych w innych miejscach genomu niż w zamierzonych genach.

Technologia modyfikacji genomów roślinnych oparta na systemie CRISPR/Cas jest rozwijana od trzech lat. Prowadzone dotychczas badania opierały się głównie na gatunkach modelowych, takich jak *Arabidopsis thaliana* lub tytoń. Konieczne jest zatem podjęcie badań, które umożliwi wykorzystanie tej nowoczesnej techniki u gatunków roślin uprawnych, zarówno w celu analizy funkcji genów, jak i w celu uzyskania zmodyfikowanych roślin o pożądanych cechach użytkowych.

Szerokie zastosowanie techniki CRISPR/Cas w badaniach roślin uprawnych może przyczynić się do znacznego postępu w hodowli. Bardzo istotną przesłanką decydującą o zastosowaniu systemu CRISPR/Cas w tym obszarze jest możliwość uzyskania zmutowanych roślin, które jednocześnie nie będą zawierały obcych genów, a zatem nie powinny być traktowane jako organizmy modyfikowane genetycznie.