

Projekt ma na celu identyfikację czynników genetycznych specyficznych na poziomie komórek, kontrolujących pluripotencję komórek somatycznych *Arabidopsis thaliana*. Proces somatycznej embriogenezy (SE) manifestuje wyjątkową plastyczność rozwojową komórek roślinnych. Totipotencja jest jedną z najbardziej pożądaných przez człowieka cech charakterystycznych dla roślin i odpowiada za zdolność pojedynczej lub grupy komórek odtworzenia w pełni funkcjonalnego organizmu. SE od lat stanowi przydatny system w badaniach czynników molekularnych determinujących pluripotencję komórek somatycznych, ale jest również metodą wykorzystywaną w transformacji genetycznej roślin oraz systemem wykorzystywanym do rozmnażania roślin o długim cyklu życiowym (mikrorozmnażanie). Zarodki somatyczne poddawane są kapsułkowaniu co pozwala na otrzymywanie dużych ilości sztucznych nasion będących klonami rośliny matecznej.

Jednakże, podstawowym ograniczeniem w analizach eksperymentalnych mających na celu identyfikację molekularnych czynników regulujących SE jest trudność oddzielenia i analizy wyłącznie tych komórek, które ulegają indukcji SE. Jak dotąd analizy opierały się na technikach izolacji RNA z całych eksplantatów, w których komórki embriogenne stanowiły tylko niewielki procent. Aby odpowiedzieć na pytania dotyczące aktywności transkryptomu podczas tranzycji embriogenicznej komórek somatycznych w trakcie indukcji SE i rozwoju zarodka somatycznego, zamierzamy przeprowadzić sortowanie jąder komórkowych aktywowanych fluorescencyjnie (FANS), aby wyizolować tylko te komórki, które podlegają SE (Gutzat and Mittelsten Scheid, 2020).

W badaniach zostanie wykorzystany system indukcji bezpośredniej SE u *Arabidopsis*, w którym to zarodki somatyczne są produkowane szybko i wydajnie z pominięciem pośredniego stadium kalusa (Gaj, 2001). Analiza kilku punktów czasowych w trakcie kultury SE *in vitro* metodą FANS stworzy wyjątkową okazję do uzyskania wglądu w dynamiczne zmiany transkryptomowe związane z indukcją embriogenną. Aby przeanalizować transkryptom jąder wyizolowanych z zastosowaniem metody FANS, wykorzystamy zaadoptowane protokoły do RNA-seq i smallRNA-seq dostosowane do bardzo małej ilości materiału do analizy.

W celu zweryfikowania roli wytypowanych do analizy genów i małych cząsteczek RNA wybranych na podstawie analiz transkryptomu, wykorzystane zostaną liczne linie transgeniczne z zmienioną aktywnością odpowiednich genów, np. linie insercyjne, linie z nadekspresją analizowanych genów, linie reporterowe itp. Część linii wykorzystanych w projekcie zostanie stworzona i wyprowadzona na jego potrzeby.

Wyniki projektu poszerzą wiedzę o mechanizmie kontrolującym pluripotencję komórek somatycznych, przyczyniając się do postępu w wielu obszarach biotechnologii i medycyny. Wdrożenie FANS do badań nad SE pozwoli na pionierskie analizy specyficznej frakcji komórek ulegających SE, co znacznie poszerzy wiedzę o molekularnych podstawach totipotencji komórek roślinnych, w tym gatunków ważnych ekonomicznie. Identyfikacja genetycznych regulatorów SE jest podstawą dalszego postępu w opracowywaniu protokołów regeneracji roślin, produkcji sztucznych nasion i produkcji roślin genetycznie modyfikowanych. Dodatkowo zaplanowane w projekcie porównanie może być kluczowym elementem toczącej się od kilkadziesiąt lat dyskusji na temat konwergencji mechanizmów genetycznych zaangażowanych w zygoczną i somatyczną embriogenezę u roślin.