

DR. ESTER STAJIČ

Indukcija haploidnih linij iz heterozigotnih staršev je metoda, ki je pogosto v uporabi pri žlahtnjenju hibridnih sort rastlin. Do zdaj je pristop indukcije temeljil na spontanem nastanku iz haploidnih gamet. Nove študije so nakazovale, da je mogoče z manipuliranjem regije CENH3 izzvati nastanek haploidnih potomcev z uporabo genomskega preurejanja. Dr. Ester Stajič je v poskusih uporabila deset različnih sgRNA za ciljanje štirih različnih mest v genomu zelja (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.), med njimi tudi 6 sgRNA za spremembe centromernega proteina CENH3, ki je vključen v ločevanje kromosomov. Rastline z mutiranimi oblikami proteina CENH3 se lahko uporabijo kot opravevalske linije za indukcijo haploidov. Za dostavo pripravljenih CRISPR/Cas9 vektorjev v celice rastlin zelja je uporabila tri različne pristope: transformacijo protoplastov, agroinfiltracijo in stabilno transformacijo z uporabo bakterije *Agrobacterium tumefaciens* (*A. t.*). Za detekcijo tarčnih mutacij je uporabila test z endonukleazo T7E1, sekvenciranje po Sangerju in sekvenciranje naslednje generacije. Slednje je pokazalo uspešno indukcijo tarčnih mutacij za vse testirane sgRNA pri vzorcih poskusov transformacije protoplastov in agroinfiltracije. Odstotki induciranih indel (insercije-delecije) mutacij so bili do 11,95 % po transformaciji protoplastov in do 14,42 % po agroinfiltraciji. Za regeneracijo rastlin z zelenimi mutacijami je dr. Ester Stajič optimizirala protokole za regeneracijo protoplastov z uporabo gojenja v alginatnih diskah in protokol za stabilno transformacijo z *A. t.* Do tvorbe inducerskih linij sicer ni prišlo, vendar bodo protokoli, izdelani v okviru doktorske disertacije, pripomogli k uporabi tarčne mutageneze pri žlahtnjenju zelja.