

Postęp Biologiczny w Produkcji Roślinnej

Zadanie 13

Prezentacja wyników w roku 2023

Wacław Orczyk

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

Tytuł zadania:

Ukierunkowana mutageneza genów podatności na infekcje wirusowe i uzyskanie roślin jęczmienia o podniesionej odporności na BaYMV i BaMMV

Okres realizacji: 2023 r

Zespół badawczy

Kierownik	Wacław Orczyk, Prof. dr hab.	IHAR-PIB w.orczyk@ohar.edu.pl
Wykonawcy	Yuliya Kloc, Dr	IHAR-PIB y.kloc@ihar.edu.pl
	Marta Dmochowska-Boguta, Dr	IHAR-PIB
	Justyna Giza, mgr (3 miesiące)	IHAR-PIB
	Technik	IHAR-PIB

Cele projektu w 2023 r.

Nr tematu	Cel	Czy cel został zrealizowany (tak/nie/częściowo ¹)
1	Wykonanie pełnej procedury transformacji genetycznej niedojrzałych zarodków jęczmienia i zainicjowanie kultury <i>in vitro</i> pozwalającej wyselekcjonować transgeniczne rośliny T ₀ .	TAK
2	Wykonanie całej procedury kultury <i>in vitro</i> eksplantów jęczmienia po inokulacji <i>Agrobacterium</i> , izolacja kalusa embriogenicznego i regeneracja roślin pokolenia T ₀ w obecności czynnika selekcyjnego.	TAK
3	Pierwszy etap charakterystyki molekularnej zregenerowanych roślin pokolenia T ₀ w celu potwierdzenia obecności T-DNA z komponentami systemu CRISPR/Cas9 do edytowania wybranych genów <i>HveIF4E</i> .	TAK
4	Celem tematu będzie sprawdzenie, czy wśród testowanych odmian jęczmienia są takie odmiany, które mogą być porażone izolatem BaYMV i uzyskany z porażonych roślin ekstrakt może być użyty do inokulacji mechanicznej roślin eksperymentalnych.	TAK

Materiały i metody (najważniejsze)

Bazy danych:

- ❖ Sekwencja genomowa i cDNA: EnsemblePlants *Hordeum vulgare* (IBSC_v2), baza sekwencji genomowych odmiany Golden Promise, baza klonów NCBI Nucleotide, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Programy:

- BLAST w EnsemblePlants http://plants.ensembl.org/Hordeum_vulgare/Tools/Blast, Nucleotide BLAST w NCBI <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>. Programy z pakietu LaserGene: ClustalW.
- Analiza wyników sekwencjonowania: program FinchTV, pakiet LaserGene (DNASTAR), program BlastN (www.ncbi.nlm.nih.gov/blastn) i BioEdit software.
- Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>)

Metody biologii molekularnej:

- Wybrane metody biologii molekularnej roślin i bakterii w tym m.in. izolacja genomowego DNA, izolacja całkowitego RNA, synteza pierwszej nici cDNA, reakcja PCR, analiza elektroforetyczna, sekwencjonowanie i analiza wyników sekwencjonowania, reakcja RT-qPCR,
- Wybrane metody transformacji przy użyciu *Agrobacterium tumefaciens*: izolacja tarczek zarodkowych jęczmienia z niedojrzałych ziarniaków, przygotowanie *Agrobacterium* do inokulacji, kultura *in vitro*, selekcja na pożywkach z higromycyną, regeneracja roślin.
- Charakterystyka molekularna roślin zregenerowanych po Agro transformacji: sprawdzenie obecności genu *hpt* i kasety CRISPR/Cas9 w genomie jęczmienia, analiza przesiewowa obecności mutacji w docelowych regionach genów *eIF4E2* i *eIF4E3* z użyciem reakcji PCR i endonukleazy T7EI.
- Transkrypcja *in vitro*, inokulacja roślin izolatami wirusów BaMMV i BaYMV, weryfikacja obecności wirusa w inokulowanych roślinach, RT-PCR, test ELISA.

Wyniki

Temat 1 Transformacja genetyczna niedojrzałych zarodków jęczmienia odmiany Golden Promise zawiesiną *Agrobacterium* z wektorami CRISPR/Cas9.

Podsumowanie wyników Tematu 1 wykonano wykorzystując procedurę opracowaną w zespole wiele lat wcześniej. Obecnie jest ona standardowo wykorzystywana przez nas do wszystkich badań wymagających transformacji jęczmienia przez *Agrobacterium*. Ten etap wymaga odpowiedniego przygotowania roślin donorowych, jest czasochłonny ale jednocześnie opracowana metoda gwarantuje uzyskanie roślin z T-DNA zintegrowanym z chromosomem jęczmienia.

Tabela 1. Liczba niedojrzałych zarodków jęczmienia poddanych Agro transformacji z trzema wektorami.

Cel tematu 1. został zrealizowany w całości.

Liczba niedojrzałych zarodków jęczmienia Golden Promise poddanych transformacji	Wektor z kasetą CRISPR/Cas9 z gRNA do edytowania genu			Suma
	eIF4E2	eIF4E3	eIF4E2 i eIF4E3	
	1032	834	693	2559

Mierniki dla tematu badawczego 1

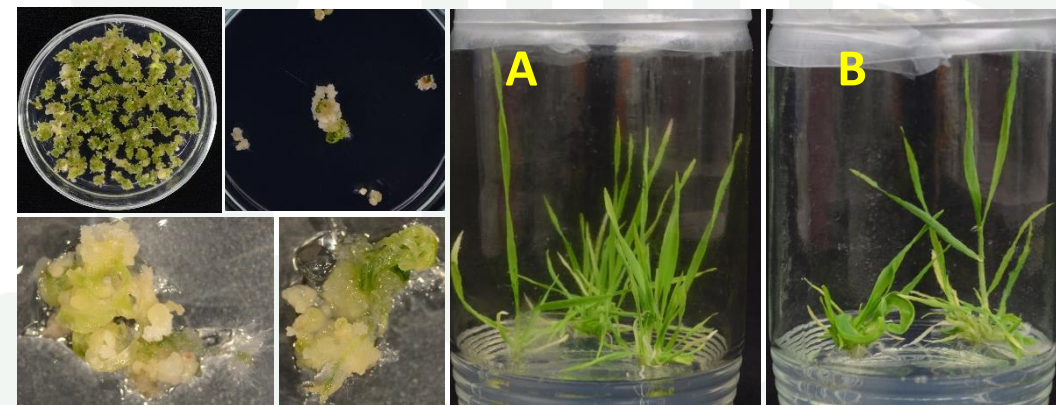
Lp.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba niedojrzałych zarodków jęczmienia odmiany Golden Promise poddanych transformacji genetycznej CRISPR/Cas9.	co najmniej 2000	2559

Wyniki

Temat 2. Kultura *in vitro* niedojrzałych zarodków jęczmienia odmiany Golden Promise i regeneracja roślin pokolenia T₀

Uzyskano 120 roślin zregenerowanych z tarczek zarodkowych po inokulacji *Agrobacterium* i kulturze na pożywce selekcyjnej.

Rośliny te po adaptacji zostały posadzone do doniczek z substratem torfowym. Sześć roślin uzyskanych z kultury *in vitro* bez inokulacji i bez czynnika selekcyjnego będzie służyło jako kontrola do analiz molekularnych. Kultura zarodków nie inokulowanych Agro w obecności higromycyny (kontrola selekcji) zakończyła się ich obumarciem.



Kultura *in vitro* i regeneracja roślin T₀ po transformacji w celu edytowania genów *eIF4E2* i *eIF4E3*.

Tabela 2. Liczba roślin uzyskanych w wyniku transformacji trzema wektorami.

Gen edytowany kasetą CRISPR/Cas9 zawierającą gRNA do docelowego genu	Liczba uzyskanych roślin w wyniku transformacji
<i>eIF4E2</i>	46
<i>eIF4E3</i>	37
<i>eIF4E2</i> i <i>eIF4E3</i>	37
Suma uzyskanych roślin	120

Cel tematu 2. został zrealizowany w całości.

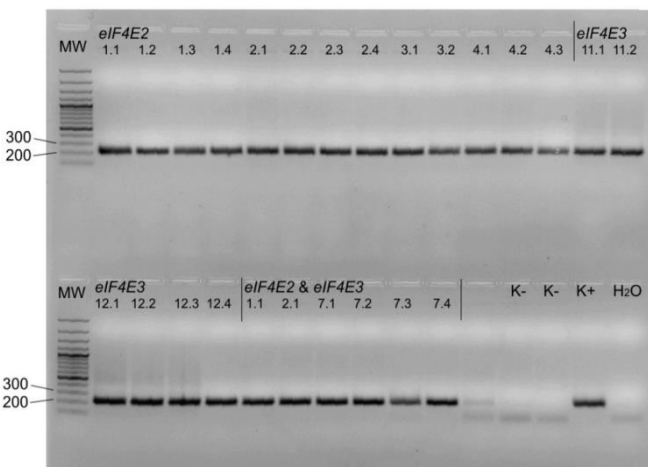
Mierniki dla tematu badawczego 2

Lp.	Miernik	Wartość miernika zaplanowana	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba roślin zregenerowanych po inokulacji niedojrzałych zarodków zawieszoną <i>Agrobacterium</i> .	co najmniej 30	120

Temat 3. Wstępna charakterystyka molekularna wybranych roślin T₀ oraz uzyskanie nasion pokolenia T₁.

Potwierdzono obecność genu *hpt* we wszystkich roślinach T₀ (Rys.1, Tab.3).

W roślinach z *hpt* sprawdzano z użyciem endonukleazy T7EI obecność mutacji w genach docelowych (Rys. 2, Tab.3).



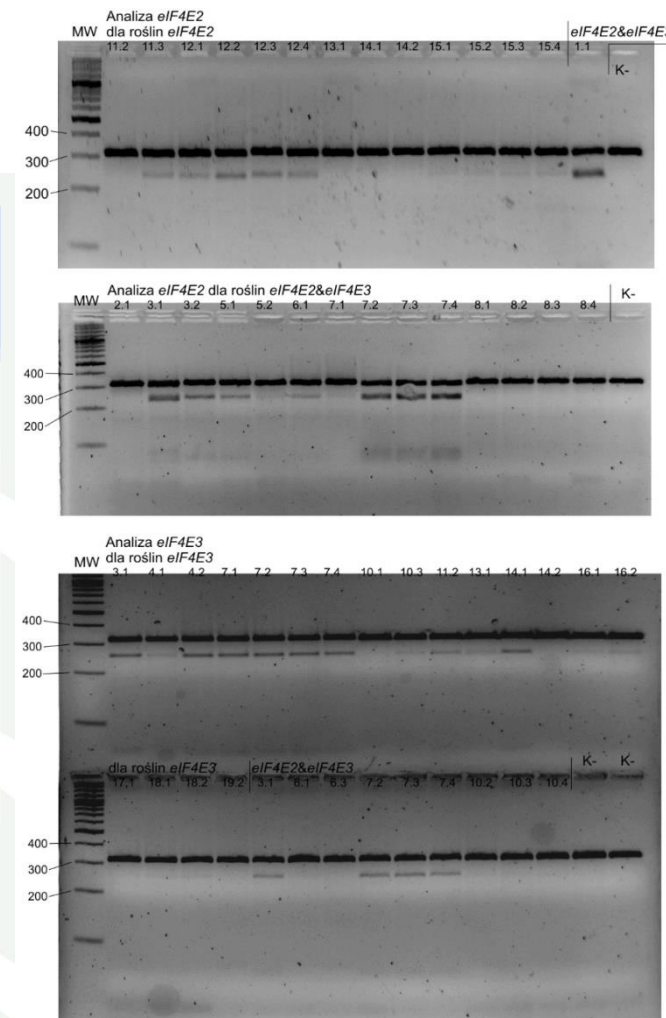
Rys.1. Zdjęcie elektroforetyczne fragmentów genu *hpt* w analizowanych roślinach.

Tabela 3. Liczba roślin z integracją T-DNA oraz z mutacją w wyniku transformacji wektorami zaprojektowanymi do edytowania trzech genów docelowych

Edytowane geny docelowe	<i>eIF4E2</i>	<i>eIF4E3</i>	<i>eIF4E2</i> i <i>eIF4E3</i>	Suma
Liczba uzyskanych roślin T ₀ ze zintegrowanym T-DNA	46	37	37	120
Liczba roślin T ₀ z potwierdzoną mutacją w docelowym locus	25	13	6 roślin z mutacją w obydwu loci	44
Wydajność mutacji	54%	35%	16%	

Rośliny 44 linii z potwierdzoną mutacją doprowadzono do nasion T₁ do dalszych analiz.

Cel tematu 3. został zrealizowany w całości.



Rys. 2. Zdjęcie elektroforetyczne fragmentów DNA genów docelowych po cięciu T7EI.

Mierniki dla tematu badawczego 3

Lp.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba roślin pokolenia T ₀ poddana analizie molekularnej na obecność T-DNA	co najmniej 30	120

Wyniki

Temat 4. Mechaniczna inokulacja różnych odmian jęczmienia wybranym izolatem wirusa żółtej mozaiki jęczmienia BaYMV

- Wyniki potwierdziły skuteczność inokulacji i porażenia roślin jęczmienia przez izolat DSMZ wirusa łagodnej mozaiki BaMMV (Tabela 4).
- Inokulacja odmian (Bażant, Bursztyn, Goldn Promisa i Maris Otter) przez izolat DE wirusa BaYMV była nieskuteczna, co może wskazywać że jest to izolat z grupy NM (*non mechanically transmitted*).
- Użycie innego izolatu JK05 (od dr Hideki Kondo) pozwoliły uzyskać porażone rośliny tylko jednej odmiany Karakan przy odpowiednio dobranej mieszance RNA tego izolatu.
- Porażone rośliny tej odmiany będą testowane jako naturalne inokulum w celu porażenia odmiany Golden Promise (Tabela 5).

Tabela 4. Skuteczność inokulacji i porażenia roślin wybranych odmian jęczmienia przez BaMMV_DSMZ.

BaMMV-DSMZ			
Odmiana jęczmienia	Liczba roślin		Wskaźnik porażenia (%)
	Po inokulacji	Z objawami infekcji	
Karakan	6	6	100
DS 568/20	6	0	0
Prospect	6	6	100
Sebastian	6	5	83,3

Tabela 5. Tylko rośliny odmiany Karakan były porażane przez izolat JK05 wirusa BaYMV

BaYMV-JK05			
Odmiana jęczmienia	Liczba roślin		Wskaźnik porażenia (%)
	Po inokulacji	Z objawami infekcji	
Karakan	9	3	33,3
DS 568/20	9	0	0
Prospect	9	0	0
Sebastian	9	0	0

Cel tematu 4. został zrealizowany w całości.

Mierniki dla tematu badawczego 4

Lp.	Miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1	Liczba odmian jęczmienia poddanych mechanicznej inokulacji izolatem BaYMV	4	4

Prezentacja wyników na konferencjach				
lp.	konferencja	prezentacja	Liczba prezentacji podana w opisie zadania	Liczba prezentacji zrealizowana
1	Nie planowane	-	-	-
Publikacje w monografiach/czasopismach recenzowanych				
lp.	monografia/ czasopismo	publikacja	Liczba publikacji podana w opisie zadania	Liczba publikacji zrealizowana
1	Nie planowane	-	-	-

6. Miernik zadania - stopień realizacji

Lp.	miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana	Stopień realizacji miernika
1	2	3	4	5
temat badawczy 1				
1	Liczba niedojrzałych zarodków jęczmienia odmiany Golden Promise poddanych transformacji genetycznej wektorami CRISPR/Cas9.	co najmniej 2000	2559	100 %
temat badawczy 2				
2	Liczba roślin zregenerowanych po inokulacji niedojrzałych zarodków zawiesiną <i>Agrobacterium</i> .	co najmniej 30	120	100 %
temat badawczy 3				
3	Liczba roślin pokolenia T0 poddana analizie molekularnej na obecność T-DNA	co najmniej 30	120	100 %
temat badawczy 4				
4	Liczba odmian jęczmienia poddanych mechanicznej inokulacji izolatem BaYMV	4	4	100 %
			ŚREDNIA	100 %
			% REALIZACJI ZADANIA	100%