



Institut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

Postęp Biologiczny w Produkcji Roślinnej

Zadanie 13

Prezentacja wyników w roku 2022

Wacław Orczyk

Institut 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: 2022 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	
Technik		IHAR-PIB	

Cele projektu w 2022 r.

Nr tematu	Cel	Czy cel został zrealizowany (tak/nie/częściowo ¹)
1	Adaptacja procedury inokulacji roślin odmiany referencyjnej i odmiany Golden Promise wirusem BaYMV i BaMMV (Współpraca z IOR-PIB).	TAK
2	Analiza ekspresji genów <i>HveIF4E</i> zidentyfikowanych w roku 2021 w roślinach jęczmienia po inokulacji wirusem.	TAK
3	Projektowanie sgRNA do wybranych paralogów <i>eIF4E</i> wykorzystując poznane sekwencje gDNA w odmianie Golden Promise i analiza <i>in silico</i> potencjalnych miejsc niedocelowych.	TAK
4	Synteza DNA komplementarnego do sgRNA. Konstruowanie wektorów CRISPR/Cas9 do ukierunkowanej mutagenyzy wybranych regionów dwóch genów <i>eIF4E</i> .	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, projektowanie i konstruowanie wektorów CRISPR/Cas9, elektroporacja *E. coli* i *A. tumefaciens*, sekwencjonowanie metryc.
- Transkrypcja *in vitro*, inokulacja roślin izolatami wirusów BaMMV i BaYMV.
- Oczyszczanie RNA wirusa z liści wybranymi metodami (bufor cytrynianu potasu, fluorek fenylometylosulfonylu), wirowanie 35000g na poduszce sacharozy, wirowaniem 40000g w gradiencie chlorku cezu.

Wyniki

Temat 1 Adaptacja procedury inokulacji roślin odmiany referencyjnej i odmiany Golden Promise wirusem BaYMV i BaMMV (Współpraca z IOR-PIB).

Rośliny odmian Bursztyn i Golden Promise inokulowano mieszaninami inokulacyjnymi dwóch komercyjnie dostępnych izolatów BaYMV-Loewe i BaYMV-DSMZ. Inokulacja izolatami BaYMV-DSMZ pozwoliła uzyskać, jakkolwiek ze stosunkowo niską skutecznością, rośliny z objawami infekcji wirusem BaYMV (Tab.1). Kontynuując zadanie 1 inokulowano rośliny drugim wirusem BaMMV. Powtórzono inokulację mechaniczną, według wyżej opisanej procedury, dla 4 odmian jęczmienia:

Rośliny odmian Bażant, Bursztyn, Golden Promise i Maris Otter inokulowano mechanicznie drugim wirusem BaMMV-DSMZ. Pierwsze objawy infekcji zaobserwowano 20 dni. Wyniki testów DAS-ELISA (DSMZ) wykazały wysoką skuteczność przenoszenia BaMMV-DSMZ (Tab. 1.2).

Izolację całkowitego RNA z liści jęczmienia wykonano 37 dni oraz z roślin kontrolnych i próbki te posłużyły do analizy ekspresji genów *eIF4E* jęczmienia.

Tabela 1.1 Wskaźniki porażenia roślin jęczmienia po inokulacji izolatami BaYMV-DSMZ i BaYMV-Loewe.

Odmiana jęczmienia	Liczba porażonych roślin/liczba badanych roślin		Wskaźnik porażenia (%)	
	BaYMV-Loewe	BaYMV-DSMZ	BaYMV-Loewe	BaYMV-DSMZ
Bursztyn	0/20	2/20	0	10
Golden Promise	0/20	1/16	0	6,25

Tabela 1.2. Wskaźniki porażenia roślin jęczmienia po inokulacji izolatami BaMMV-DSMZ.

Odmiana jęczmienia	Liczba roślin		Wskaźnik porażenia (%)
	Inokulowanych BaMMV	Z objawami infekcji wirusowej	
Bażant	20	15	75
Bursztyn	20	16	80
Golden Promise	20	14	70
Maris Otter	37	7	18,9

Wnioski i podsumowanie

1. Inokulacja roślin izolatami BaYMV-Loewe i BaYMV-DSMZ pozwoliła uzyskać rośliny z objawami porażenia wirusem przy użyciu tylko jednego izolatu BaYMV-DSMZ. Wskaźnik porażenia, względnie niski, był wystarczający, aby potwierdzić podatność roślin odmiany modelowej Golden Promise i polskiej odmiany Bursztyn na infekcję BaYMV.
2. Adaptowano na potrzeby tego projektu metodykę uzyskania transkryptów RNA1 i RNA2 wirusa. Negatywny wynik inokulacji tymi transkryptami wskazywał, że uzyskany z Japonii izolat BaYMV-JK05 nie był infekcyjny w stosunku do użytych odmian jęczmienia.
3. Inokulacja mechaniczna roślin wirusem łagodnej mozaiki jęczmienia, izolatami BaMMV-DSMZ pozwoliła otrzymać rośliny z objawami infekcji i wysokim wskaźnikiem porażenia. Potwierdzając podatność odmiany Golden Promise na użyty izolat BaMMV oraz skuteczność metody mechanicznej inokulacji.
4. Mechaniczna inokulacja izolatami BaYMV i BaMMV jest metodą opracowaną na potrzeby badań laboratoryjnych. W warunkach polowych wektorem obydwu wirusów jest pasożyt *Polymyxa graminis*. Jego wykorzystanie jest eksperymentalnie i formalnie znacznie trudniejsze niż inokulacja mechaniczna.

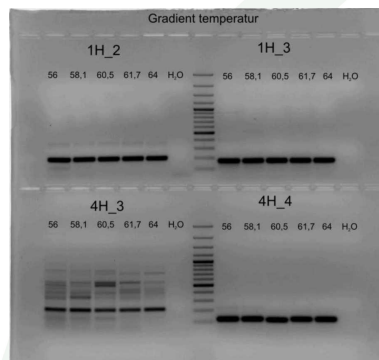
Mierniki dla tematu badawczego 1

Lp.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1	Procedura inokulacji roślin jęczmienia odmiany Golden Promise wirusem BaYMV.	1	1
2	Procedura inokulacji roślin jęczmienia odmiany Golden Promise wirusem BaMMV	1	1

Wyniki

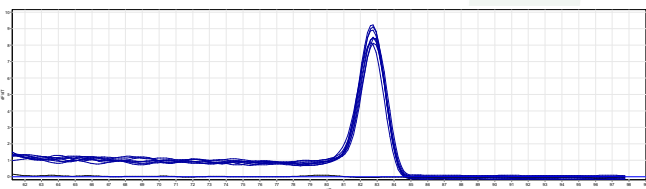
Temat 2 Analiza ekspresji genów *HveIF4E* zidentyfikowanych w roku 2021 w roślinach jęczmienia po inokulacji wirusem.

Zaprojektowano startery do qRT-PCR czterech paralogów *eIF4E* zidentyfikowanych w genomie jęczmienia. Sprawdzone optymalną temperaturę przyłączania starterów (Rys. 2.1).



Rys. 2.1. Rozdział ampliconów po reakcji w gradiencie temperatur.

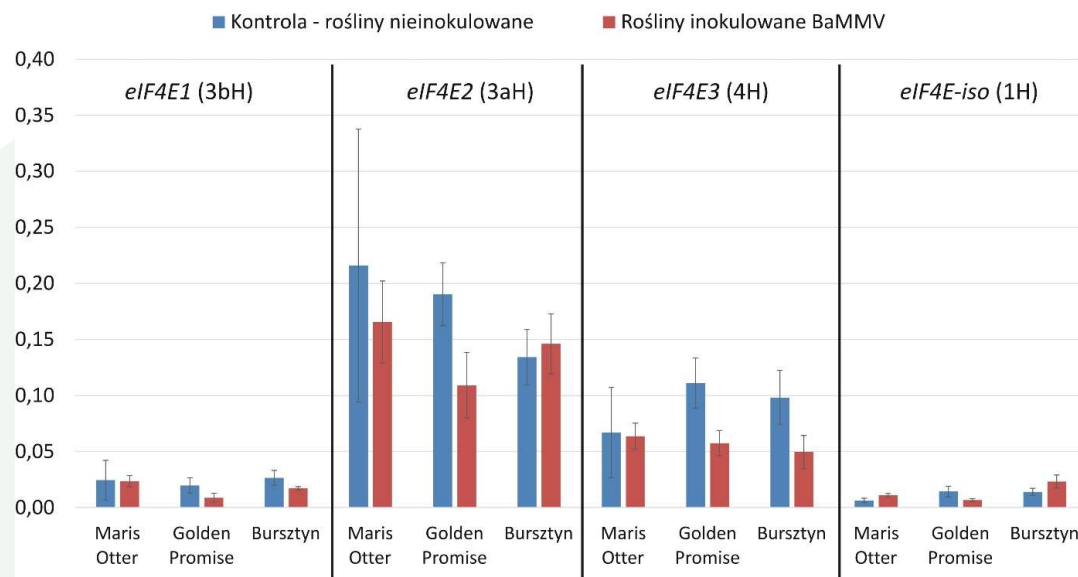
Analizując krzywe topnienia każdego z ampliconów, potwierdzono specyficzną amplifikację (Rys.2.2).



Rys 2.2. Przykładowa krzywa topnienia produktu reakcji RT-qPCR ampliconu 1H_3 eIF4E-iso.

Analizowano ekspresję czterech paralogów *eIF4E* w liściach jęczmienia odmian Maris Otter, Golden Promise i Bursztyn nieinokulowanych oraz po inokulacji wirusem BaMMV-DZMZ (Rys. 2.3).

Względna ekspresja *HveIF4E* w liściach jęczmienia



Rys. 2.3. Względna ekspresja czterech paralogów *IF4E* jęczmienia w liściach odmian Maris Otter, Golden Promise i Bursztyn w warunkach kontrolnych i po inokulacji wirusem BaMMV-DZMZ. Gen referencyjny - gen ADP-rybosylacja czynnik (ARF) AJ508228. Wyniki przedstawiają wartości średnie wraz odchyleniami standardowymi.

Wnioski i podsumowanie

1. Analiza ekspresji czterech paralogów *eiF4E* jęczmienia: *eiF4E1* (3bH), *eiF4E2* (3aH), *eiF4E3* (4H) i *eiF4E-iso* (1H) wykazała aktywność transkrypcyjną wszystkich paralogów w liściach jęczmienia.
2. Dwa paralogi *eIF4E2* oraz *eIF4E3* ulegają silnej ekspresji, około jeden rząd większej niż dwóch pozostałych paralogów *eiF4E3* i *eiF4E-iso*. Wskazuje to, że w liściach funkcje biologiczne tych dwóch paralogów dominują.
3. Paralog *eIF4E2*, zlokalizowany w locus opisanych w literaturze genów odporności jest pierwszym kandydatem do ukierunkowanej mutagenyzy CRISPR/Cas9.
4. Drugim kandydatem jest paralog *eIF4E3* zlokalizowany na chromosomie 4H. Wybrany został ze względu na ekspresję (silną i modulowaną przez infekcję) oraz brak wcześniejszych doniesień o takiej lokalizacji potencjalnych genów odporności na wirusy.

Mierniki dla tematu badawczego 2

Lp.	Miernik	Wartość miernika zaplanowana	Wartość miernika zrealizowana
1	Wzór ekspresji paralogów <i>HveIF4E</i> w roślinach kontrolnych.	1	1

Wyniki

Temat 3 Projektowanie sgRNA do wybranych paralogów *eIF4E* wykorzystując poznane sekwencje gDNA w odmianie Golden Promise i analiza *in silico* potencjalnych miejsc niedocelowych.

Cząsteczki sgRNA komplementarne do wybranego regionu dwóch paralogów *eIF4E*: tj. *eIF4E2*(3aH) oraz *eIF4E3*(4H) zaprojektowano używając narzędzia on line dostępnego na platformie CRISPOR on-line tool (<http://crispor.tefor.net/>).

Tabela 3.1. Sekwencje oligonukleotydowe sgRNA zaprojektowane do wybranych regionów docelowych paralogów *eIF4E*. Region PAM w edytowanym regionie zaznaczono kursywą i podkreśleniem.

Paralogi docelowe	Sekwencja sgRNA (20 nt)	Sekwencje nukleotydowe gDNA regionu docelowego paralogu <i>eIF4E</i>
<i>eIF4E2</i> (3aH)	Pojedyncza cząsteczka sgRNA GATGCTAAGAGGTCCGACAA	GATGCTAAGAGGTCC GACAA <u>AGG</u>
<i>eIF4E3</i> (4H)	Pojedyncza cząsteczka sgRNA GTGGATTATACGGTTCAAGA	GTGGATTATACGGTTC AAGA <u>AGG</u>
<i>eIF4E2</i> (3aH) oraz <i>eIF4E3</i> (4H)	Podwójna cząsteczka sgRNA 5'GGTCTCACTTGCAACAAAGCGCATCTGGTGTAGTGGTATCAT AGTACCCTCCCACGGTACTGACCAGGGTTCGATTCCCTGGATGC GCAATGATGCTAAGAGGTCCGACAAAGTTTATAGAGCTAGAAATAGC AAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGC ACCGAGTCGGTGCACAAAGCGCATCTGGTGTAGTGGTATCA TAGTACCCTCCCACGGTACTGACCAGGGTTCGATTCCCTGGATG CGCATGGATTATACGGTTCAAGAAGTTTATAGAGACC 3'	GATGCTAAGAGGTCC GACAA <u>AGG</u> oraz GTGGATTATACGGTTC AAGA <u>AGG</u>

Podsumowanie:

1. Zaprojektowano sekwencje nukleotydowe sgRNA komplementarne do paralogów *eIF4E2* i *eIF4E3*.
2. Jako opcję dodatkową zaprojektowano sgRNA komplementarne do obydwu paralogów jednocześnie z zamiarem uzyskania podwójnych mutantów w jednym cyklu edytowania.

Mierniki dla tematu badawczego 3

Lp	Miernik	Wartość miernika zaplanowana	Wartość miernika zrealizowana
1	Zaprojektowanie sekwencji nukleotydowej sgRNA dla dwóch paralogów <i>HveIF4E</i> .	2	2

Wyniki

Temat 4 Synteza DNA komplementarnego do sgRNA. Konstruowanie wektorów CRISPR/Cas9 do ukierunkowanej mutagenyzy wybranych regionów dwóch genów *eIF4E*.

Najważniejsze etapy konstruowania wektorów

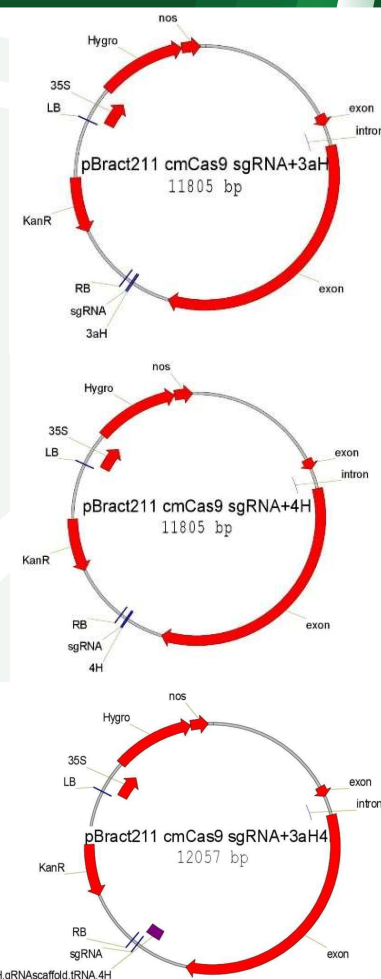
1. Synteza dwóch cząsteczek oligonukleotydów o sekwencji odpowiadającej sgRNA.
2. Hybrydyzacja odpowiednich par oligonukleotydów.
3. Cięcie enzymem *BsaI* w celu generowania lepkich końców i ligacja do wektora pBract_cmCas9-sgRNA.
4. Elektroporacja do *E. coli* izolacja plazmidowego DNA i weryfikacja poprawności konstrukcji (analiza restrykcyjna, PCR, sekwencjonowanie) (Rys. 4.1).
5. Elektroporacja do *A. tumefaciens* AGL1 i potwierdzenie poprawności konstrukcji w *A. tumefaciens* (izolacja plazmidu, elektroporacja do *E.coli*, izolacja plazmidu i sekwencjonowanie wybranych regionów konstrukcji).

Podsumowanie

1. Skonstruowano wektor (1 zestaw) do ukierunkowanej mutagenyzy dwóch wybranych paralogów *eIF4E* jęczmienia *eIF4E2* i *eIF4E3*.
2. Poprawność tego wektora, zweryfikowana w trakcie budowania wektora została dodatkowo sprawdzona po wprowadzeniu do *Agrobacterium tumefaciens*.
3. Kolonie *A. tumefaciens* zawierające pozytywnie zweryfikowane konstrukcje zostały namnożone w kulturze płynnej, podzielone na porcje i zamrożone w -80 °C. Będą sukcesywnie używane do transformacji jęczmienia w kolejnym etapie realizacji Zad.13.

Mierniki dla tematu badawczego 4

Lp.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1	Uzyskanie wektora CRISPR/Cas9 do edytowania określonego regionu genu <i>eIF4E</i> jęczmienia.	1	1



Rys. 4.1. Wektory pBract211_cmCas9-sgRNA z insertami 3aH, 4H i 3aH4H.



Prezentacja wyników badań

Lp.	Konferencja	Prezentacja / Doniesienie konferencyjne	Liczba prezentacji podana w opisie zadania	Liczba prezentacji zrealizowana
1	VI POLSKI KONGRES GENETYKI, Kraków 27-30.2022.	Editing of barley susceptibility gene for plant virus resistance Y. Kloc, M. Dmochowska-Boguta, A. Hameed, B. Hasiów-Jaroszewska, K. Trzmiel, W. Orczyk	1	1

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				
1.1	Procedura inokulacji roślin jęczmienia odmiany Golden Promise wirusem BaYMV.	1	1	100 %
1.2	Procedura inokulacji roślin jęczmienia odmiany Golden Promise wirusem BaMMV	1	1	100 %
temat badawczy 2				
2.1	Wzór ekspresji paralogów HveIF4E w roślinach kontrolnych.	1	1	100 %
temat badawczy 3				
3.1	Zaprojektowanie sekwencji nukleotydowej sgRNA dla dwóch paralogów HveIF4E.	2	2	100 %
temat badawczy 4				
4.1	Uzyskanie wektora CRISPR/Cas9 do edytowania określonego regionu genu eIF4E jęczmienia.	1	1	100 %
			ŚREDNIA	100 %
			% REALIZACJI	100%