



Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

Postęp Biologiczny w Produkcji Roślinnej

Zadanie 13

Prezentacja wyników w roku 2024

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: 2024 r

Zespół badawczy

Kierownik Waław Orczyk, Prof. dr hab.

IHAR-PIB w.orczyk@ihar.edu.pl

Wykonawcy Yuliya Kloc, Dr
Marta Dmochowska-Boguta, Dr
Paweł Poznański, mgr
Sylwia Parzonko, mgr
Technik

IHAR-PIB y.kloc@ihar.edu.pl
IHAR-PIB m.dmochowska-boguta@ihar.edu.pl
IHAR-PIB
IHAR-PIB
IHAR-PIB

Przyznane środki: 229 000zł

Cele projektu w 2024 r.

Nr tematu	Cel	Czy cel został zrealizowany (tak/nie/częściowo ¹)
1	Wykonanie wstępnej charakterystyki molekularnej wybranych roślin pokolenia T1 po edytowaniu <i>eIF4E2</i> , <i>eIF4E3</i> oraz <i>eIF4E2/eIF4E3</i>	TAK
2	Wykonanie szczegółowej analizy molekularnej wybranych roślin pokolenia T1 po edytowaniu <i>eIF4E2</i> , <i>eIF4E3</i> oraz <i>eIF4E2/eIF4E3</i>	TAK
3	Inokulacja roślin odmian wzorcowych wybranymi izolatami wirusów	TAK



Materiały i metody

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, platforma Galaxy oraz program IGV.
- Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>)

Metody biologii molekularnej:

- Wybrane metody biologii molekularnej roślin w tym m.in. izolacja genomowego DNA, reakcja PCR, trawienie enzymami, analiza elektroforetyczna, analiza wyników sekwencjonowania,
- Charakterystyka molekularna roślin po Agro transformacji pokolenia T1: 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, endonukleazy T7E1 i enzymów restrykcyjnych, analiza sekwencjonowania Sangera i NGS.



Wyniki

Temat 1 Weryfikacja obecności T-DNA i mutacji w wybranych liniach pokolenia T₁ w trzech wariantach edytowania *eIF4E2*, *eIF4E3* oraz *eIF4E2/eIF4E3* przy wykorzystaniu trawienia endocukleazą T7E1 i/lub enzymu restrykcyjnego oraz sekwencjonowania typu Sanger wybranych linii pokolenia T₁.

Tabela 1. Liczba roślin pokolenia T₁ poddana analizie na obecność T-DNA oraz mutacji w genach *eIF4E2* i *eIF4E3* oraz z wynikami pozytywnymi

Edytowane geny docelowe	<i>eIF4E2</i>	<i>eIF4E3</i>	<i>eIF4E2</i> i <i>eIF4E3</i>	SUMA
Liczba roślin pokolenia T ₁ poddanych analizie na obecność T-DNA (obecność genu <i>hpt</i>)	28	30	64	122
Liczba roślin pokolenia T ₁ z <u>potwierdzoną</u> obecnością T-DNA (obecność genu <i>hpt</i>)	25 (89%)	21 (70%)	57 (89%)	103 (84%)
Liczba roślin pokolenia T ₁ poddana analizie na obecność mutacji genu docelowego przy wykorzystaniu endocukleazy T7E1 i/lub enzymu restrykcyjnego.	28	30	64	122
Liczba roślin pokolenia T ₁ z <u>potwierdzoną</u> mutacją genu docelowego przy wykorzystaniu endocukleazy T7E1 i/lub enzymu restrykcyjnego.	18 (64%)	18 (60%)	26 roślin z mutacją w obu loci (41%)	62 (51%)
Liczba roślin T ₁ analizowana na obecność mutacji genu docelowego przy wykorzystaniu sekwencjonowania Sangera.	16	18	6	40
Liczba roślin T ₁ z <u>potwierdzoną</u> mutacją genu docelowego przy wykorzystaniu sekwencjonowania Sangera.	16	18	6	40

Cel tematu 1. został zrealizowany w całości.



Wyniki

Temat 1 Weryfikacja obecności T-DNA i mutacji w wybranych liniach pokolenia T1 w trzech wariantach edytowania *eIF4E2*, *eIF4E3* oraz *eIF4E2/eIF4E3* przy wykorzystaniu trawienia endocukleazą T7E1 i/lub enzymu restrykcyjnego oraz sekwencjonowania typu Sanger wybranych linii pokolenia T1.

Podsumowanie wyników:

Potwierdzono obecność mutacji w genach docelowych *eIF4E2* i *eIF4E3* roślin pokolenia T1 zarówno edytowanych konstrukcjami CRISPR/Cas9 zaprojektowanymi do jednego z tych genów jak i konstruktem CRISPR/Cas9 zaprojektowanym do edycji obu genów jednocześnie. Wytypowano rośliny do szczegółowej analizy mutacji przy użyciu sekwencjonowania NGS.

Mierniki dla tematu badawczego 1			
Lp.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba roślin pokolenia T ₁ poddana analizie na obecność T-DNA	co najmniej 100	122
2	Liczba roślin pokolenia T ₁ poddana analizie na obecność mutacji przy wykorzystaniu endocukleazy T7E1 i/lub enzymu restrykcyjnego	co najmniej 100	122
3	Liczba roślin T ₁ analizowana na obecność mutacji przy wykorzystaniu sekwencjonowania Sanger.	co najmniej 40	40

Wyniki

Temat 2 Szczegółowa charakterystyka sekwencji nukleotydowych w mutowanych regionach genów *eIF4E2* i *eIF4E3* w wybranych liniach pokolenia T₁ w trzech wariantach edytowania *eIF4E2*, *eIF4E3* oraz *eIF4E2/eIF4E3* przy wykorzystaniu sekwencjonowania typu NGS.

Tabela 2. Typy mutacji w transgenicznym roślinach pokolenia T₁ uzyskanych w wyniku sekwencjonowania NGS

Oznaczenia próbki	Genotyp	Opis genotypu	Oznaczenia próbki	Genotyp	Opis genotypu	Oznaczenia próbki	Genotyp	Opis genotypu
Gen docelowy: eF4E2 w roślinach po transformacji konstruktem CRISPR/Cas9 dla eIF4E2			Gen docelowy: eF4E2 w roślinach po transformacji konstruktem CRISPR/Cas9 dla eIF4E2 i eIF4E3			Gen docelowy: eF4E3 w roślinach po transformacji konstruktem CRISPR/Cas9 dla eIF4E3		
1b	-13pz/-2pz/WT	MO	24e	-13pz/-2pz	BI	68i	+2pz/+1pz/WT	MO
2c	-13pz/-2pz	BI	25f	-13pz	HM	69j	+2pz/+1pz/WT	MO
3d	-13pz/-2pz	BI	26g	-2pz	HM	70a	+2pz/+1pz/WT	MO
4e	-13pz	HM	27h	-2pz	HM	71b	+1pz/WT	HT
5f	-2pz	HM	28i	-2pz	HM	72c	+1pz/WT	HT
6g	-13pz	HM	37j	-2pz/-3pz	BI	73d	+1pz/WT	HT
7h	+1pz/+15pz	BI	38i	-2pz	HM	74e	+1pz/WT	HT
8i	-3pz/+1pz	BI	39j	+1pz/S	BI	75f	+1pz/WT	HT
9j	+1pz/WT/-13pz/-2pz	MO	40a	-11pz/zmiana	BI	76g	+1pz/WT	HT
10a	+1pz/WT	HT	41b	-2pz	HM	77h	+1pz/WT	HT
13d	S/WT	HT	42c	-11pz	HM	78i	+1pz/WT	HT
14e	S/WT	HT	Gen docelowy: eF4E3 w roślinach po transformacji konstruktem CRISPR/Cas9 dla eIF4E2 i eIF4E3			79j	+1pz/WT	HT
15f	WT/-11pz/+1pz	MO	49j	+1pz/WT	HT	80a	+1pz/WT	HT
16g	-2pz/WT	HT	50a	+1pz/WT	HT	81b	+1pz/WT	HT
17h	WT/-2pz/+1pz	MO	51b	+1pz/WT	HT	82c	+1pz/WT	HT
18i	-2pz/+1pz/WT	MO	52c	+1pz/WT	HT	83d	+1pz/WT	HT
			53d	+1pz/WT	HT	84e	+1pz/WT	HT
			62c	+2pz/WT	HT	85f	+1pz/WT	HT
			63d	+2pz/WT	HT			
			64e	+2pz/WT	HT			
			65f	+2pz/WT	HT			
			66g	+2pz/+1pz/WT	MO			
			67h	+2pz/+1pz/WT	MO			

Cel tematu 2. został zrealizowany w całości.



Wyniki

Temat 2 Szczegółowa charakterystyka sekwencji nukleotydowych w mutowanych regionach genów *eIF4E2* i *eIF4E3* w wybranych liniach pokolenia T₁ w trzech wariantach edytowania *eIF4E2*, *eIF4E3* oraz *eIF4E2/eIF4E3* przy wykorzystaniu sekwencjonowania typu NGS.

Podsumowanie wyników:

1. Zaprojektowane unikatowe pary starterów z barkodami umożliwiły analizę NGS i będą mogły być wykorzystane w analizach roślin kolejnego pokolenia.
2. Wszystkie analizowane rośliny są roślinami z mutacjami w genach docelowych *eIF4E2* i *eIF4E3*.

Mierniki dla tematu badawczego 2			
Lp.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba roślin pokolenia T1 poddanych analizie NGS	co najmniej 50	56*

* liczba 56 jest liczbą analiz roślin z jednym genem docelowym *eIF4E2* lub *eIF4E3* oraz roślin, w których analizowano dwie mutacje w obydwu genach docelowych *eIF4E2* i *eIF4E3*.

W tej drugiej grupie liczono każdą z analizowanych roślin dwukrotnie, ponieważ w każdej z nich wykonano dwie niezależne od siebie analizy dla dwóch różnych loci.

Wyniki

Temat 3 Mechaniczna inokulacja roślin odmian wzorcowych wybranymi izolatami wirusów.

Podsumowanie wyników:

1. Rośliny odmian jęczmienia Karakan, Prospect i Sebastian nadają się do utrzymania stałego źródła inokulum wirusa BaMMV-DSMZ.
2. Mechaniczna inokulacja wirusem paskowej mozaiki pszenicy (WSMV) wskazuje na podatność wszystkich sześciu testowanych odmian jęczmienia w tym odmiany Golden Promise.

Mierniki dla tematu badawczego 3

Lp.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba odmian jęczmienia poddanych mechanicznej inokulacji izolatem BaMMV-DSMZ	3	3
2	Liczba odmian jęczmienia poddanych mechanicznej inokulacji izolatem WSMV-Sze	6	6

Cel tematu 3. został zrealizowany w całości.

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	-	-	-



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 roślin pokolenia T ₁ poddana analizie na obecność T-DNA	co najmniej 100	122	1
2	Liczba roślin pokolenia T ₁ poddana analizie na obecność mutacji przy wykorzystaniu endocukleazy T7E1 i/lub enzymu restrykcyjnego	co najmniej 100	122	1
3	Liczba roślin T ₁ analizowana na obecność mutacji przy wykorzystaniu sekwencjonowania Sangera.	co najmniej 40	40	1
1				
4	Liczba roślin pokolenia T ₁ poddanych analizie NGS	co najmniej 50	56	1
temat badawczy 3				
5	Liczba odmian jęczmienia poddanych mechanicznej inokulacji izolatem BaMMV-DSMZ	3	3	1
6	Liczba odmian jęczmienia poddanych mechanicznej inokulacji izolatem WSMV-Sze	6	6	1
			ŚREDNIA	1
			% REALIZACJI ZADANIA	100%