4-1-03-4-01 „Opracowanie i wykorzystanie metod biotechnologicznych do skrócenia cyklu hodowlanego pszenżyta oraz do poprawy efektywności selekcji - miejscowo-specyficzna mutageneza   
z wykorzystaniem miejscowo-specyficznych nukleaz” (dr A. Linkiewicz)

**Cele projektu:**

Celem projektu było wykorzystanie miejscowo-specyficznych nukleaz TALEN i CRISPR/Cas9 do indukowania kierunkowych mutacji w genomie pszenżyta dla poznania mechanizmów zaangażowanych   
w spoczynek nasion celem uzyskania roślin o podwyższonej tolerancji na porastanie.

Mutageneza była wykorzystana do wyciszenia dwóch genów PP2A i ABA8’OH, (homologów PDF1   
i CYP707A u rzodkiewnika), potencjalnie zaangażowanych w spoczynek nasion pszenżyta

**Wyniki i dyskusja:**

Prace obejmowały doświadczenia nad transformacją pszenżyta przy użyciu konstruktów TALEN jak również CRISPR/Cas9 z sgRNA skierowanymi wobec 2 genów potencjalnie związanych z porastaniem pszenżyta. Transformacja roślin rzodkiewnika czterema konstruktami TALEN oraz transformacja roślin pszenżyta sześcioma konstruktami CRISPR/Cas9 dla genów PP2A i ABA8’OH pozwoliła na otrzymanie roślin in vitro i uzyskanie pokolenia T0 oraz T1. W wyniku transformacji około 100 niedojrzałych zarodków pszenżyta na kombinację dla genów PP2A i ABA8’OH, uzyskano 77 roślin T0 odpornych na czynnik selekcyjny fosfinotrycynę (Michalski i Linkiewicz, 2019). Wyselekcjonowane rośliny   
o potwierdzonej integracji transgenu zostały rozmnożone i uzyskano pokolenie T1.

Sprawdzenie efektywności różnego typu konstruktów do wywoływania mutacji w komórkach pszenżyta   
z zastosowaniem transfekcji protoplastów z zużyciem PEG oraz ocena aktywności konstruktu poprzez mikrowstrzeliwanie do tkanek jęczmienia (Budhagatapalli, 2016), we współpracy z IPK Gatersleben, wykazały zmiany w przewidywanych regionach genów PP2A i ABA8’OH. Potwierdzono znaczące zwiększenie efektywności edycji genów dzięki zastosowaniu nukleaz CRISPR/Cas9   
i dodatkowych sekwencji Trex2 w stosowanych do transformacji wektorach CRISPR/Cas9. Generowane zmiany obserwowane w komórkach protoplastów pszenżyta mają charakter delecji, insercji lub SNP   
o różnym nasileniu, zależnie od zastosowanego sgRNA.

Zmiany mutacyjne w komórkach pszenzyta i żyta oceniono poprzez zastosowanie endonukleazy T7E1, sekwencjonowanie Sangera oraz sekwencjonowanie NGS w celu określenia typu i częstości zmian mutacyjnych.

Analizy stabilnych linii transgenicznych żyta przy wykorzystaniu sekwencjonowania Sanger   
w połączeniu z analizą TIDE rejonu CYP707A2 po mutagenezie z użyciem sgRNA2 i sekwencji PP2A po mutagenezie z użyciem sgRNA5 wykazały zmiany w sekwencjach docelowych genów. Typ i nasilenie zmian zależne było od zastosowanego sgRNA.

Analiza sekwencji pszenżyta oparta została o sekwencjonowanie NGS materiału uzyskanego poprzez przejściową nadekspresję badanych konstruktów w protoplastach. Charakter generowanych mutacji zależny był od zastosowanego sgRNA oraz obecności lub braku sekwencji Trex2 w konstrukcie.

**Wnioski**

1. Zaproponowane w projekcie sposoby konstrukcji i wykonania budowy sekwencji TALEN   
   i sgRNA do edycji sekwencji w/w genów obarczone są niskim ryzykiem wystąpienia mutacji typu off-target.
2. Udoskonalone wektory CRISPR/Cas9 sprawdzane w systemie ekspresji przejściowej   
   w komórkach protoplastów pszenżyta oraz w stabilnie stransformowanych zawiesinach żyta, potwierdziły znaczące zwiększenie efektywności edycji genów dzięki zastosowaniu dodatkowych sekwencji Trex2   
   w wektorach stosowanych do transformacji.
3. W wyniku zastosowania nukleaz typu CRISPR/Cas9 możliwe jest wprowadzenie zmian   
   w sekwencji genów docelowych - PP2A i CYP707A2 w komórkach pszenżyta i żyta.
4. Zastosowana metoda transformacji niedojrzałych zarodków zbóż w połączeniu z użyciem zmodyfikowanej procedury regeneracji umożliwia otrzymanie licznych linii T0 pszenżyta, które wykazują in vitro odporność na czynnik selekcyjny fosfinotrycynę oraz obecność konstruktu metodą PCR.
5. Analizy Real Time PCR wybranych roślin pszenżyta pokolenia T1 wykazały stabilną ekspresję sgRNA jak  
   i Cas9, co wskazuje na zastosowanie funkcjonalnych konstruktów oraz odpowiedniej metodyki transformacji. Brak zmian w sekwencjach docelowych roślin T1 może wynikać z analizy zbyt małej próby lub działania mechanizmu niwelującego mutacje u poliploidów.