

Komunikat

Gatunek rośliny, której dotyczy sprawozdanie: ...Pszenżyto

Autor/autorzy: Anna Linkiewicz, Krzysztof Michalski, Sławomir Sowa

Afiliacja: IHAR-PIB

Adres korespondencyjny, adres e-mail i nr telefonu Kierownika Tematu: Zakład Biotechnologii i Cytogenetyki Roślin, Laboratorium Kontroli GMO, IHAR-PIB Tel. +48(22)733-45-17, tel. sekretariat: tel. 22 725 36 11; Fax: +48(22)733-46-81; a.linkiewicz@ihar.edu.pl.

Informacja o dotacji: Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji załącznik nr 8 do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. poz. 1170. z późn. zmianami; zadanie nr 13

Tytuł zadania w języku polskim: Opracowanie i wykorzystanie metod biotechnologicznych do skrócenia cyklu hodowlanego pszenżyta oraz do poprawy efektywności selekcji –miejscowo-specyficzna mutageneza z wykorzystaniem miejscowo-specyficznych nukleaz

Tytuł zadania w języku angielskim: Development and application of methods for the shortening of triticale breeding cycle and for the effective selection — site-specific mutagenesis using programmable nucleases

Słowa kluczowe: Crispr/Cas9, mutageneza, Triticale

Tekst:

W ramach tematu badawczego nr 1 prace obejmowały doświadczenia nad transformacją pszenżyta przy użyciu konstruktorów Crispr/Cas9 z sgRNA skierowanymi wobec 2 genów potencjalnie związanych z porastaniem pszenżyta. Wykonano transformację roślin pszenżyta konstruktorami z sgRNA1A, sgRNA1B, sgRNA2A, sgRNA2B i sgRNA6A dla genów PP2A i ABA8'OH, otrzymano regenerację roślin in vitro i uzyskano rośliny pokolenia T0. Konstrukty Crispr/Cas9 różniły się sekwencjami sgRNA do indukowania mutacji w genomie pszenżyta oraz zastosowanymi promotorami. Nawet w przypadku zastosowania wszystkich znanych zasad projektowania sgRNA, specyficzność i aktywność tych cząsteczek w dużym stopniu nie jest przewidywalna, dlatego polecane jest zaprojektowanie kilku różnych sekwencji sgRNA wobec genu, który zamierzamy

edytować i eksperymentalne sprawdzenie ich skuteczności. W wyniku transformacji około 100 niedojrzałych zarodków pszenżyta na kombinację dla genów PP2A i ABA8'OH, uzyskano 67 roślin T0 odpornych na czynnik selekcyjny fosfinitrycynę. Wyselekcjonowane rośliny zostały przesadzone do szklarni w celu uzyskania pokolenia T1.

Równolegle, w ramach tematu badawczego 2 sprawdzano efektywności różnego typu konstruktów do wywoływania mutacji w komórkach pszenżyta.

Prześciowa ekspresja konstruktów w wyniku transfekcji protoplastów z zastosowaniem PEG, stanowi metodę stosowaną do testowania konstruktów wykorzystywanych do mutagenyzy miejscowo-specyficznej w roślinach (Cermak *i in.*, 2015; Liang *i in.*, 2014; Shan *i in.*, 2014; Woo *i in.*, 2015). Poszczególne typy wektorów były testowane w układzie ekspresji przejściowej na komórkach protoplastów pszenżyta. W przypadku niskiej wydajności transfekcji protoplastów monitorowanej poprzez ekspresję genu markerowego (GFP), alternatywną metodą sprawdzenia konstruktów była ich ocena poprzez mikrowstrzeliwanie do tkanek jęczmienia (Budhagatapalli, 2016) i ocena ekspresji w systemie transformacji przejściowej roślin metodą strzelby genowej, we współpracy z IPK Gatersleben. Analizy edytowanych sekwencji na poziomie DNA potwierdziły wystąpienie zmian typu delecje w przewidywanych regionach genów PP2A i ABA8'OH u pszenżyta. Potwierdzono znaczące zwiększenie efektywności edycji genów dzięki zastosowaniu dodatkowych sekwencji Trex2 w wektorach stosowanych do transformacji. Generowane zmiany obserwowane w komórkach protoplastów pszenżyta mają charakter delecji 3 do kilkunastonukleotydowych.

Trzeci realizowany temat badawczy dotyczył detekcji zmian mutacyjnych, określenie rodzaju i liczby zmian w poszczególnych edytowanych loci poprzez analizy DNA.

Wykrycie mutacji uzyskanych w wyniku działania miejscowo-specyficznych nukleaz pozostaje wyzwaniem, szczególnie u roślin poliploidalnych (Wang *i in.*, 2014; 2018). Efektywna metoda wykrywania mutacji jest szczególnie przydatna kiedy spodziewamy się niskiej wydajności w generowaniu mutacji lub kiedy badamy dużą populację (Liang *i in.*, 2018). Ze względu na ograniczone możliwości wykrycia zmian mutacyjnych typu SNP w roślinach T0 pszenżyta poprzez zastosowanie endonukleazy T7 wykorzystano sekwencjonowanie NGS w celu określenia typu i częstości zmian mutacyjnych dla wybranych 19 roślin T0. Analiza sekwencji wykazała 9 zmian mutacyjnych, najczęściej o charakterze SNP lub delecji 1 lub 2 nukleotydowych o dużo niższym nasileniu niż w porównywanych próbach uzyskanych w wyniku transfekcji protoplastów pszenżyta konstruktami zawierającymi dodatkowy element- eksonukleazę TREX2.

Budhagatapalli, N., Schedel, S., Gurushidze, M. *et al.* 2016. A simple test for the cleavage activity of customized endonucleases in plants. *Plant Methods* **12**, 18 doi:10.1186/s13007-016-0118-6.

Čermák, T., Baltes, N.J., Čegan, R. *et al.* 2015. High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol* **16**, 232 doi:10.1186/s13059-015-0796-9

Liang Z., Zhang K., Chen K., Gao C. 2014. Targeted Mutagenesis in *Zea mays* Using TALENs and the CRISPR/Cas System. *Journal of Genetics and Genomics* **41** (2):63-68.

Michalski K, A. M. Linkiewicz. 2019. Projektowanie, konstrukcja i ocena nukleaz CRISPR/Cas9 w celu edycji genów związanych z porastaniem przedźniwnym pszenżyta. BIULETYN INSTYTUTU HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN NR 285, STR 91.

Shan, Q., Wang, Y., Li, J. *et al.* 2014. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nat Protoc* **9**, 2395–2410, doi:10.1038/nprot.2014.157

Woo, J., Kim, J., Kwon, S. *et al.* 2015. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol* **33**, 1162–1164, doi:10.1038/nbt.3389

Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu JL. 2014. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol* **32**:947–951.

Wang, W., Simmonds, J., Pan, Q. *et al.* 2018. *Theor Appl Genet* **131**: 2463. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3166-7>