



Sprawozdanie końcowe z wyników badań w temacie nr 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. (2014-2020)**

**Kierownik tematu: dr Anna Linkiewicz [a.linkiewicz@ihar.edu.pl](mailto:a.linkiewicz@ihar.edu.pl)**

**Zespół: mgr Krzysztof Michalski, dr Sylwia Oleszczuk, dr Sławomir Sowa  
Zakład Biotechnologii i Cytogenetyki Roślin, Laboratorium Kontroli GMO**

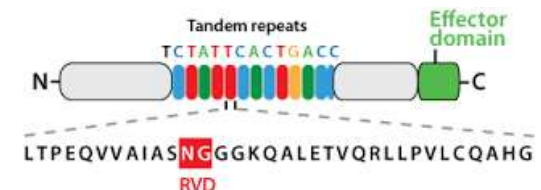
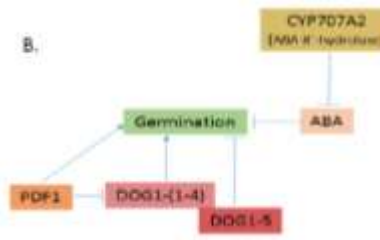
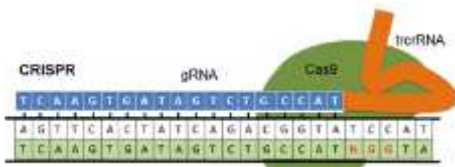
# Cel projektu

1. Wykorzystanie miejscowo-specyficznych nukleaz do indukowania kierunkowych mutacji w genomie pszenżyta dla poznania mechanizmów zaangażowanych w spoczynek nasion i uzyskania roślin o podwyższonej tolerancji na porastanie.

2. Zastosowanie mutagenazy TALEN i CRISPR/Cas9 do wyciszenia dwóch genów zaangażowanych w spoczynek nasion pszenżyta.

## ■ Cele badań

- Zaprojektowanie i wykonanie konstruktów genowych TALEN i Crispr/Cas9 do edytowania genów PDF1 i CYP707A u rzodkiewnika, pszenżyta i żyta,
- Sprawdzenie poprawności zaprojektowania i wykonania oraz ocena funkcjonalności konstruktów nukleaz w systemie ekspresji w komórkach drożdży, poprzez transfekcje protoplastów, poprzez transformacje przejściową jęczmienia i tytoniu
- Transformacja stabilna rzodkiewnika, pszenżyta i żyta wykonanymi konstruktami oraz regeneracja roślin T0.
- Ocena efektywności transgenezy i wprowadzonych zmian mutacyjnych na poziomie DNA, określenie rodzaju i liczby zmian w poszczególnych edytowanych loci poprzez analizy DNA.
- Określenie poziomu ekspresji nukleaz i sgRNA w komórkach
- Określenie efektywności różnego typu konstruktów do wywoływania mutacji w komórkach pszenżyta i żyta
- Rozmnożenie i uzyskanie pokoleń T1 i T2 oraz wykorzystanie materiału do analiz zmian w tych pokoleniach.





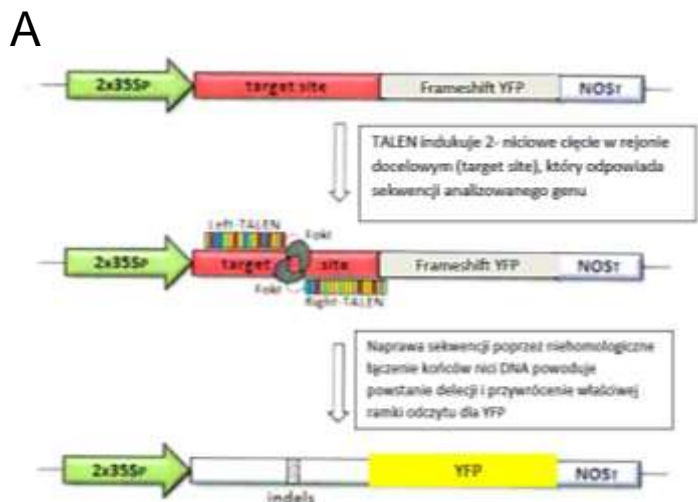
# Materiały i metody

---

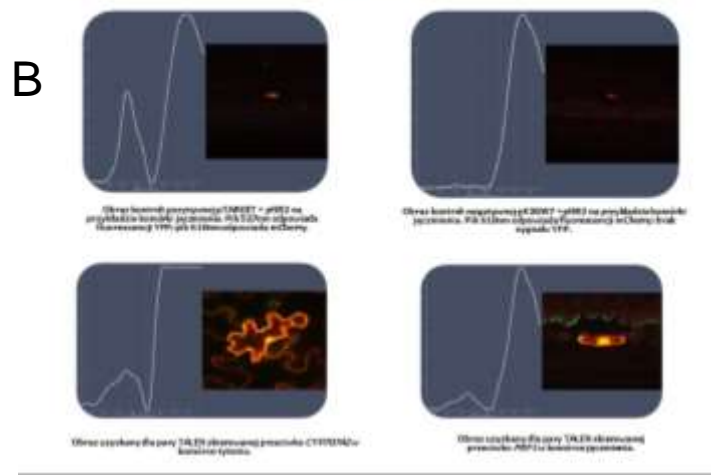
- A. Materiał roślinny: *Arabidopsis thaliana*, pszenżyto ozime (*Triticosecale* Wittmack) , żyto zwyczajne (*Secale cereale* L.)
- B. Metody: 1. metody molekularne: izolacja DNA, izolacja RNA, odwrotna transkrypcja, ligacja, klonowanie, analiza restrykcyjna i sekwencyjna konstruktów TALEN i Crispr/Cas9 (od 2018 r) do modyfikacji rzodkiewnika, pszenżyta i żyta, analiza PCR, analiza ekspresji konstruktów TALEN i Crispr/Cas9 w komórkach; analiza ekspresji genów qPCR, konstrukcja wektorów ekspresyjnych metodami Gateway oraz GoldenGate.
1. Ocena aktywności przygotowanych konstruktów do edytowania komórek roślin:
    - Przejściowa transfekcja protoplastów z liści pszenżyta z użyciem glikolu polietylenowego (PEG); izolacja DNA genomowego na kolumnkach, namnażanie regionu docelowego poprzez PCR, rehybrydyzacja i trawienie nukleazą T7, ocena na aparacie BioAnalyzer, sekwencjonowanie Sanger i analiza TIDE, sekwencjonowanie NGS.
    - Przejściowa ko-ekspresja konstruktów nukleaz oraz sekwencji docelowych w wektorach zawierających YFP ze zmienioną ramką odczytu; dostarczanie wektorów do liści jęczmienia metodą transformacji biolistycznej, obserwacje w mikroskopie konfokalnym, zliczanie wydajności naprawy ramki odczytu zachodzącej w wyniku aktywności badanych nukleaz.
  2. Metody kultur *in vitro*: namnażanie, regeneracja, metody transformacji komórek roślinnych, kultury zawieszinowe żyta, selekcja na podłożach z dodatkiem antybiotyków lub herbicydów.
    - Transformacja oraz regeneracja płodnych transformantów pszenżyta poprzez kulturę niedojrzałych zarodków; wyprowadzanie zawiesziny żyta z kallusa uzyskanego na drodze kultury pylników, transformacja zawiesziny poprzez ko-kulturę z *Agrobacterium*
  3. Metody mikrobiologiczne: hodowla bakterii, transformacja bakterii, preparatyka plazmidu;
  4. Analizy bioinformatyczne i analizy statystyczne
    - Projektowanie konstruktów TALEN i CRISPR/Cas9 z zastosowaniem narzędzi on-line, analiza regionów oddziaływań „off-target”, dopasowania oraz dopasowania wielokrotne sekwencji uzyskanych w wyniku sekwencjonowania Sanger, TIDE (narzędzie on-line służące ocenie udziału zmutowanych sekwencji w próbie na podstawie chromatogramu); GeneiousPrime: (narzędzie stacjonarne do filtrowania oraz analizy danych z sekwencjonowania NGS).
  5. Uprawa roślin rzodkiewnika i pszenżyta w warunkach kontrolowanych fitotronu i szklarni
    - Wernalizacja roślin (8-12 tyg., 4°C), profilaktyczne opryski fungycydami oraz insektycydami; opryski preparatem Asahi, sprzyjającym krzewieniu roślin.



# Ocena funkcjonalności konstruktów nukleaz



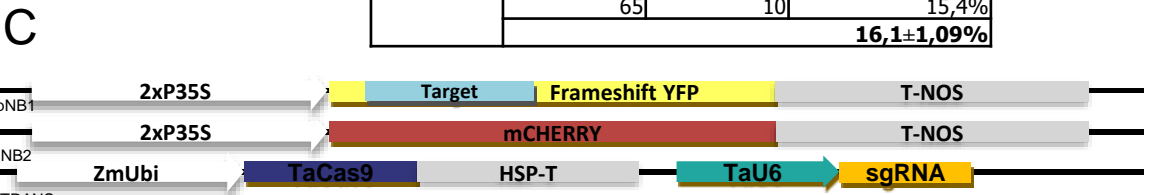
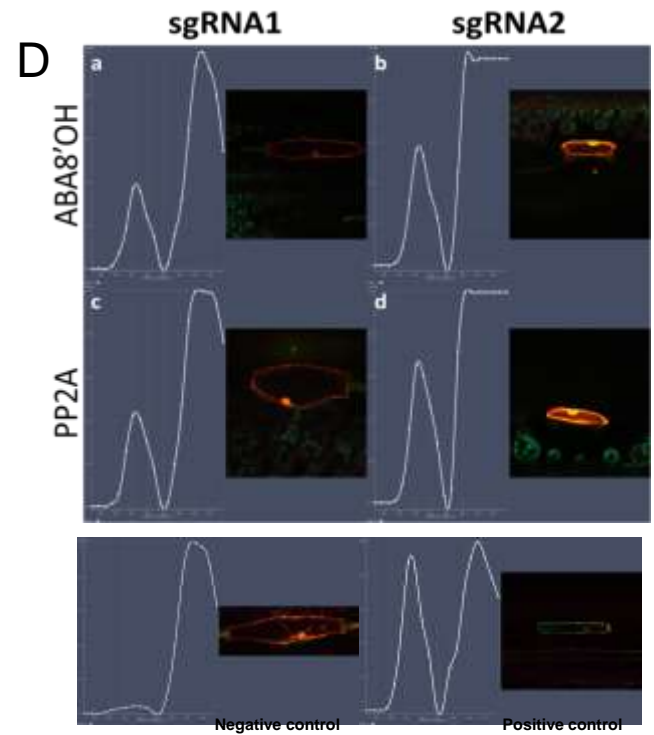
## Wyniki testu nukleaz TALEN – transformacja biolistyczna komórek jęczmienia i tytoniu



Rys 3. Sprawdzenie poprawności konstrukcji i działania wykonanych konstruktów TALEN (A i B) oraz Crispr/Cas9 (C i D) w systemie przejściowej transformacji roślin zapewniającym ekspresję uzyskanych konstruktów.

**Tabela 2.** Efektywność *sgRNA in planta* na podstawie 3 niezależnych eksperymentów bombardowania komórek jęczmienia konstruktami z mCHERRY i z CAS9 przywracającym funkcję YFP. Efektywność danego konstruktu CRISPR/Cas9 oceniono na podstawie liczby komórek z YFP w stosunku do ogólnej liczby komórek transformowanych wykazującą ekspresję mCHERRY.

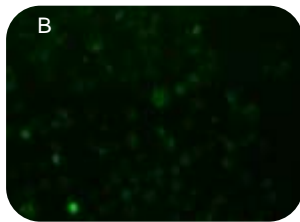
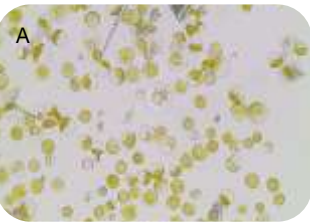
sgRNA	mCHERRY	z YFP	YFP/mCHERRY
ABA-sgRNA1	33	2	6,1%
	110	6	5,5%
	38	2	5,3%
			<b>5,6±0,42%</b>
ABA-sgRNA2	62	14	22,6%
	101	27	26,7%
	72	17	23,6%
			<b>24,3±15,31%</b>
PP2A-sgRNA1	50	24	48,0%
	87	21	24,1%
	72	14	19,4%
			<b>30,5±15,31%</b>
PP2A-sgRNA2	161	28	17,4%
	83	13	15,7%
	65	10	15,4%
			<b>16,1±1,09%</b>



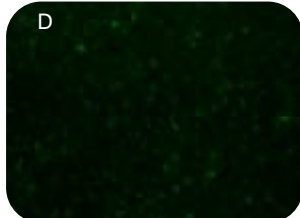
Rys 3C: Schemat konstruktów użytych do testu aktywności CRISPR/Cas9



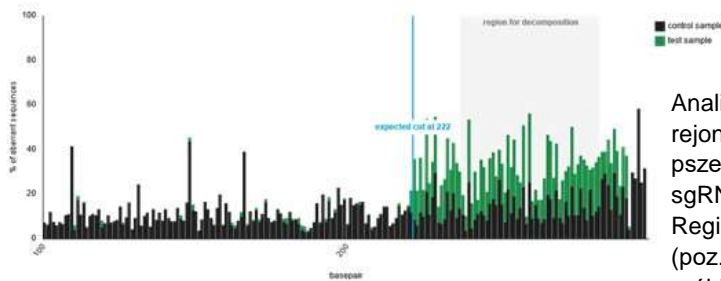
# Wyniki edycji nukleazami Crispr/Cas9 – transfekcja protoplastów pszenżyta



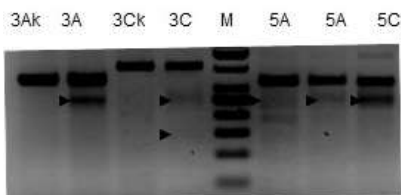
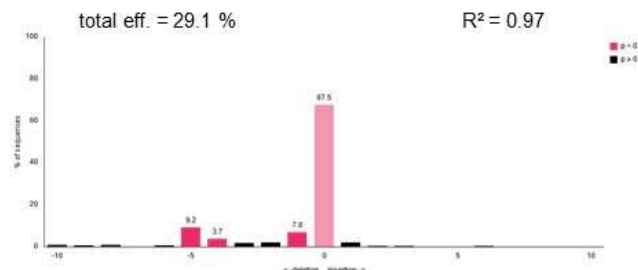
Protoplasty pszenżyta z sgRNA5 dla PP2A, VIS (A) i UV (B), 24 h od transfekcji



Protoplasty pszenżyta z sgRNA3 dla CYP707A2, VIS (C) i UV (D), 24 h od transfekcji



Analizy sekwencjonowania regionu PP2A w protoplastach pszenżyta po zastosowaniu sgRNA5 Crispr/Cas9. Region zmian w sekwencji (poz. 222 bp) pomiędzy próbką badaną (zielony) a kontrolą nietraktowaną Cas9 (czarny). W 67,5% sekwencji nie wykryto zmian, pozostałe dotyczyły niewielkich delecji od 1 do 5 nukleotydów oraz insercji do 6 nukleotydów ( $p \geq 0,001$ ).



Produkty PCR dla CYP707A2 (3A, 3C) i PP2A (5A i 5C), poddano analizie mutacji przy użyciu endonukleazy T7 (NEB). 3Ak, 3Ck DNA z protoplastów poddanych transfekcji wektorami kontrolnymi bez Cas9. Widoczne dodatkowe produkty cięcia T7E (strzałki) powstałe dzięki rozpoznaniu zmutowanych sekwencji. Marker 50 bp DNA Ladder Fermentas.



Analiza produktów cięcia CRISPR w genie TaABA8'OH-A w protoplastach pszenżyta z zastosowaniem modyfikacji wektorów Crispr/Cas9 na BioAnalizrze. Zwiększony poziom edycji w komórkach protoplastów, bez względu na zastosowane sgRNA, otrzymano przy użyciu konstruktorów z sekwencją TREX2. Przykładowo protoplasty były transfekowane sgRNA2 i odpowiednio zawierały sekwencje TREX2+ lub nie zawierały (TREX2-). Analiza aktywności Cas9 została przeprowadzona przy użyciu T7E. Kontrolę stanowiło DNA protoplastów transfekowanych wektorem bez Cas9.

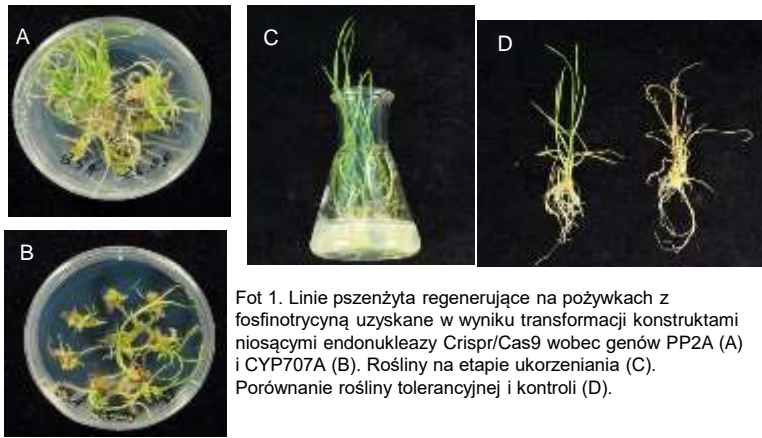
sgRNA	sekwencja	sekwencja	Stosunek	% mutacji
sgRNA2	sgRNA2+TREX2	sgRNA2	sgRNA2+TREX2	%
sgRNA2 (+TREX2)	77,2%	71,6%	0,208223%	5,960777%
sgRNA2 (+TREX2)	134,3%	504,3%	0,257994%	12,702006%
sgRNA2 (+TREX2)	20,5%	743,4%	0,027602%	1,992233%
sgRNA2 (+TREX2)	26,5%	585,4%	0,449602%	25,81171%
Kontrola	0%	775,3%	0%	0%
sgRNA3	sgRNA3	sgRNA3	sgRNA3	%
sgRNA2 (+TREX2)	51,8%	590,3%	0,09466%	4,481113%
sgRNA2 (+TREX2)	25,0%	548,8%	0,477897%	27,71902%
sgRNA2 (+TREX2)	21,3%	728,8%	0,030049%	1,51399%
sgRNA2 (+TREX2)	125,7%	411,3%	0,177881%	9,407178%
Kontrola	26,2%	806,3%	0,01247%	1,648894%

Tab 3. Edycja genu TaABA8'OH-A uzyskana w 2 eksperymentach transfekcji protoplastów pszenżyta. Częstotliwość T7E cięcia fragmentów PCR docelowych sekwencji opracowano na podstawie analizy na BioAnalizrze. Wartość uzyskanych mutacji [%] zestawiono w odniesieniu do kontroli, gdzie zastosowano wektor bez sekwencji Cas9. Zwiększony poziom edycji w komórkach protoplastów, bez względu na zastosowane sgRNA, otrzymano przy użyciu konstruktorów z sekwencją TREX2.

	sgRNA2a			sgRNA2+TREX2a			sgRNA3a			sgRNA3+TREX2a			
	At	Bt	Rt	At	Bt	Rt	At	Bt	Rt	At	Bt	Rt	
Całkowita wydajność edycji [%]	34,09±	33,18±	29,11±	46,73±	42,86±	48,77±	2,04±	2,32±	3,26±	30,72±	44,21±	38,60±	
Udział poszczególnych typów mutacji [%]	delecje	95,86±	97,04±	97,29±	98,78±	97,93±	99,65±	71,70±	70,22±	77,92±	99,52±	99,38±	99,93±
	insercje	0,65±	0,70±	0,24±	0,04±	0,08±	0,01±	25,63±	28,55±	21,70±	0,00±	0,00±	0,00±
	substytucje	3,15±	1,26±	1,85±	0,76±	1,95±	0,15±	2,67±	1,23±	0,38±	0,14±	0,30±	0,00±
	złożone mutacje	0,54±	0,99±	0,62±	0,43±	0,04±	0,19±	0,00±	0,00±	0,00±	0,34±	0,32±	0,07±

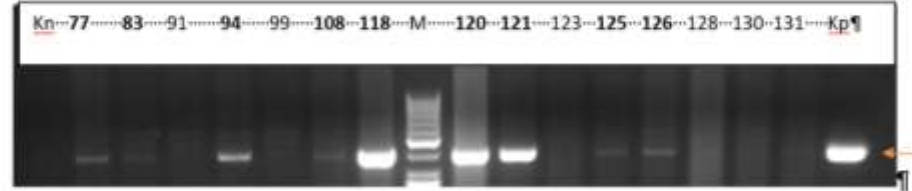
Tab 4. Potwierdzenie rodzaju i częstości mutacji generowanych w komórkach pszenżyta wykonano przy użyciu sekwencjonowania NGS dla konstruktorów z sgRNA2 i sgRNA3 z modyfikacją TREX lub bez. Częstość i charakter zaobserwowanych zmian zależy od zastosowanego konstruktów.

# Wyniki – stabilna transformacja pszenżyta



Fot 1. Linie pszenżyta regenerujące na pożywkach z fosfotrycyną uzyskane w wyniku transformacji konstrukcjami niosącymi endonukleazy Crispr/Cas9 wobec genów PP2A (A) i CYP707A (B). Rośliny na etapie ukorzeniania (C). Porównanie rośliny tolerancyjnej i kontroli (D).

Rys. 1. Przykładowe wyniki analizy roślin T0 (nr 77-131) ze starterami specyficznymi dla stosowanego w konstrukcjach terminatora HSP. Kp- plazmid zawierający sekwencję terminatora HSP (380 bp). Kn - odm. Bogo nietransformowana. Pozytywne rośliny zaznaczono wytłuszczoną czcionką. M-marker mas. molekularnych 50 bp DNA Lader Thermo. ¶



Roślina #	Cas9	sgRNA	Akt
112/1	poz	poz	poz
112/2	poz	poz	poz
112/3	poz	poz	poz
112/4	poz	poz	poz
112/5	poz	poz	poz
112/6	neg	neg	poz
118A	poz	poz	poz
108C	poz	poz	poz
61A	poz	poz	poz
94F	poz	poz	poz

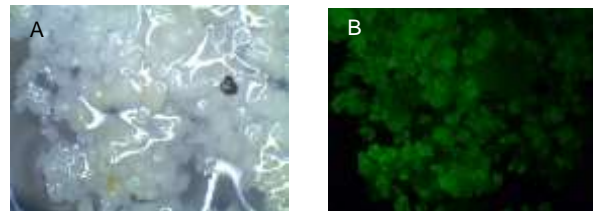
Tab.2 Metodą qPCR określono ekspresję genu Cas9 i sgRNA w pokoleniu T2 wybranych linii pszenżyta.

Tabela 1. Zmiany wygenerowane w roślinach T0 pszenżyta przy użyciu konstrukcji z sgRNA2, sgRNA3 i sgRNA5 ¶

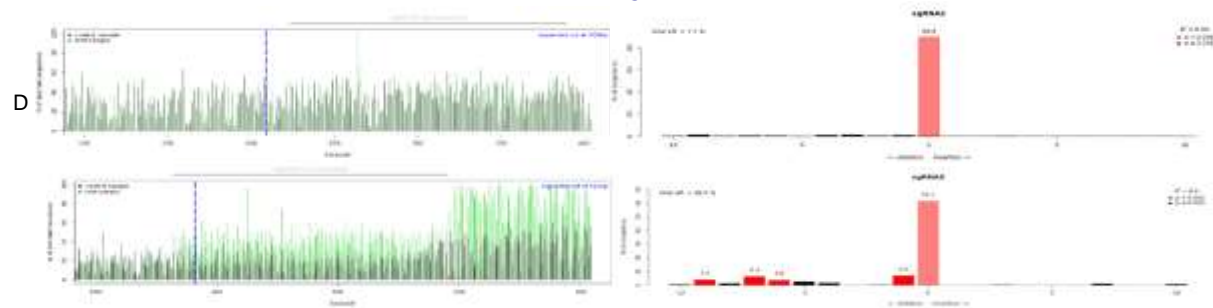
Roślina nr	sgRNA	Rejon edycji	pozycja zmiany	Zmiana SNP lub delekcja	Liczba zmian	Częstość zmian
R71a	B2B	144-166	152	C→A	4	0,5%
R71a	B2B	144-166	136-154	substytucja	2	0,3%
R72a	B2B	144-166	155	C→T	5	0,2%
R72a	B2B	144-166	155	C→A	9	0,3%
R53a	B3B	149-171	155/156	delekcja 2nt	5	0,1%
R53a	B3B	149-171	145/146	delekcja 2nt	3	0,03%
R53a	B3B	149-171	147	C→A	8	0,2%
R53a	B3B	149-171	156/160	delekcja 2nt	5	0,1%
R59a	B5A	184-206	192	G→T	4	0,2%
R59a	B5A	184-206	194	C→A	7	0,2%
R59a	B5A	184-206	192	G→T	7	0,2%
R31a	B5A	184-206	185	C→A	8	0,3%
R97a	B2B	144-166	155	C→A	22	0,6%

Tab.1 Analiza sekwencyjna 40 roślin pszenżyta i porównanie do genomu kontrolnego wykazała pojedyncze zmiany mutacyjne w 6 roślinach T0, o charakterze SNP lub delekcji 1 lub 2 nukleotydowych. Nie stwierdzono dużych delekcji czy insercji.

## Wyniki - stabilna edycja nukleazami Crispr/Cas9 zawiesin żyta



Kultura zawiesinowa żyta transformowana wektorem z GFP światło widzialne (A) i światło UV (B). Widoczne agregaty komórkowe z ekspresją GFP.



Kultury zawiesinowe żyta zostały transformowane konstrukcjami Crispr/Cas9 wobec genu CYP707A2 i PP2A z użyciem Agrobacterium. Sekwencjonowanie rejonów docelowych mutacji wykazało zmiany w obu badanych genach. Analiza sekwencjonowania rejonu CYP707A2 w życie (C) po mutageniezie z użyciem sgRNA2 i PP2A po mutageniezie z użyciem sgRNA5. Oczekiwane regiony zmian na niebiesko, obserwowane zmiany w sekwencjach pomiędzy próbką badaną (zielony) a kontrolą nietraktowaną Cas9 (czarny) na podstawie analizy TIDE. Na wykresie słupkowym, z prawej strony typ i częstotliwość obserwowanych zmian w sekwencjach.



# Wnioski

---

- W wyniku zastosowania nukleaz typu Crispr/Cas9 wprowadzono zmiany w sekwencji genów PP2A i CYP707A2 w komórkach pszenżyta i żyta. Wcześniejsze prace nad edycją zbóż nukleazami TALEn nie przyniosły spodziewanych rezultatów.
- Zaprojektowano i skonstruowano sekwencje sgRNA do edycji sekwencji w/w genów o niskim ryzyku wystąpienia mutacji typu *off-target*. Wykonano analizy prowadzące do allelo-specyficznego amplifikacji PCR dla poszczególnych genomów cząstkowych A, B i R dla genów poddanych mutagenzie.
- Przetestowano i udoskonalono wektory Crispr/Cas9, a ich test przeprowadzono w systemie ekspresji przejściowej na komórkach protoplastów pszenżyta, liściach jęczmienia i tytoniu oraz jako stabilne transformanty w zawiesinach żyta. Potwierdzono znaczące zwiększenie efektywności edycji genów dzięki zastosowaniu dodatkowych sekwencji Trex2 w wektorach stosowanych do transformacji.
- Analizy na poziomie DNA potwierdziły wystąpienie zmian typu delekcje/insercje/SNP w przewidywanych regionach genów PP2A i CYP7072A tak w protoplastach pszenżyta jak i kulturach zawiesinowych żyta.
- Zastosowana metoda transformacji niedojrzałych zarodków zbóż w połączeniu z użyciem zmodyfikowanej procedury regeneracji doprowadziła do otrzymania 77 linii T0 pszenżyta, które wykazały *in vitro* odporność na czynnik selekcyjny fosfotrycynę a obecność konstruktów została potwierdzona metodą PCR.
- Analiza sekwencyjna NGS pokolenia wybranych roślin T0 wykazała pojedyncze zmiany mutacyjne, najczęściej o charakterze SNP lub delekcji 1 lub 2 nukleotydowych o dużo niższym nasileniu niż w porównywanych próbach uzyskanych w wyniku transfekcji protoplastów pszenżyta konstrukcjami zawierającymi TREX2.
- Analizy Real Time PCR wybranych roślin pszenżyta pokolenia T2 wykazały stabilną ekspresję sgRNA jak i Cas9.





# Osiągnięcia, współpraca i projekty

---

- **Opracowanie metody efektywnej transfekcji protoplastów zbóż i transformacji zawiesin żyta konstrukcjami Crispr/Cas9 z sekwencjami umożliwiającymi uzyskanie ukierunkowanych delecji w genach docelowych.**
- **Wizyty naukowe i współpraca przy projekcie:**
- Współpraca z Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK)<sup>2</sup>, Gatersleben, Niemcy i Instytutem Biochemii i Biofizyki Roślin PAN
  - 15.10.2017-21.10.2017:  
Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben, Germany (K. Michalski)
  - 18.03.2019-12.04.2019:  
Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben, Germany (K. Michalski)
- **Projekty i wdrożone metody:**
- Wyniki prac stanowiły podstawę do złożenia 2 projektów: ETIUDA (NCN) i tematu statutowego dla młodego naukowca IHAR.
- Wyniki są podstawą dla 3 publikacji (w opracowaniu) oraz planowanych w 2021 projektów NCN i 1 pracy doktorskiej
- Opracowano i wdrożono metody budowy konstrukcji CRISPR/Cas9 do ekspresji w zbożach, zoptymalizowano metodę transformacji niedojrzałych zarodków pszenżyta, protoplastów i zawiesin żyta przy użyciu Agrobacterium i PEG. Wdrożono metody detekcji i analiz mutacji. Uzyskane wyniki stanowią warsztat badawczy i analityczny Zakładu Biotechnologii i Cytogenetyki Roślin IHAR-PIB.



# Publikacje

---

## 1. Doniesienia konferencyjne:

- Michalski K, Linkiewicz A. 2019. Projektowanie, konstrukcja i ocena nukleaz CRISPR/Cas9 w celu edycji genów związanych z porastaniem przedzmiwnym pszenżyta. [Design, construction and evaluation of CRISPR/Cas9 constructs for editing PHS-related genes in Triticale]; XIV Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych”, Zakopane, 5-8.02.2019. 1st place for the best oral presentation in the Young Scientists Competition; XIV National Scientific Conference 'Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych'; Zakopane, 5-8.02.2019
- K. Michalski, C. Hertig, J. Kumlehn, A M. Linkiewicz. CRISPR/Cas9 constructs evaluation for PHS-specific loci in Triticale. Konferencja EUROBIOTECH Krakowie 2019, K. Michalski, A M. Linkiewicz. Optimization of Triticale ABA8'OH Crispr/Cas9 mutagenesis - construct design and validation by protoplast transfection. 5th Conference on Cereal Biotechnology and Breeding, Węgry, Budapeszt, 4-7 listopada 2019
- Michalski K, Hertig C, Schedel S, Hensel G, Linkiewicz A. 2018. TALEN construct evaluation for PHS-specific loci in Triticale. 6th Plant Genomics & Gene Editing Congress: Europe, Rotterdam 14-15.05.2018.
- Linkiewicz A, Michalski K, Hertig C, Schedel S, Hensel G. 2018. Development and evaluation of TALENS for seed germination promoting genes in Arabidopsis. 12th Congress of the International Plant Molecular Biology, Montpellier 5-10.08.2018
- Michalski K, Linkiewicz A, Sowa S. 2017. Gene editing of the dormancy – specific loci in Arabidopsis: TALEN design, assembly and in vitro evaluation. VISCEA: Plant Genome Editing & Genome Engineering, Wiedeń 3-4.07.2017. (wykład)
- Linkiewicz A, Michalski K, Sowa S. 2017. TALEN design and assembly for gene editing of the seed dormancy –specific loci in Triticale. 8th International Triticeae Symposium (8ITS), Wernigerode 12-15.06.2017.
- Linkiewicz A, Michalski K, Sowa S. 2016. Gene editing of the dormancy –specific loci in Arabidopsis by TALEN induced mutagenesis. V Polskiego Kongres Genetyki, Łódź 19-22.09.2016.

## 2. Publikacje

- Segal S, Linkiewicz A. 2014. Wykorzystanie miejscowo-specyficznych nukleaz do modyfikacji genomów roślinnych. Postępy Biologii Komórki. 0324-833X. T. 41, nr 4 (2014), s. 701-720. (5 pkt MEN)