

Tytuł zadania:

Ukierunkowana mutageneza genów podatności na infekcje wirusowe i uzyskanie roślin jęczmienia o podniesionej odporności na BaYMV i BaMMV

Okres realizacji: 2021 r

Zespół badawczy

Kierownik	Wacław Orczyk, Prof. dr hab.	IHAR-PIB	w.orczyk@ohar.edu.pl
Wykonawcy	Yuliya Kloc, Mgr	IHAR-PIB	
	Marta Dmochowska-Boguta, Dr	IHAR-PIB	
	Technik	IHAR-PIB	

Cele projektu w 2021 r.

Lp.	Cel	Czy cel został zrealizowany (tak/nie/częściowo ¹)
1	Identyfikacja in silico paralogów <i>eIF4E</i> w genomie jęczmienia, oznaczanych dalej, jako <i>HveIF4E</i> . Eksperymentalna weryfikacja obecności <i>HveIF4E</i> w genomowym DNA jęczmienia odmiany Golden Promise. Poznanie sekwencji kodującej (cDNA) wybranych <i>HveIF4E</i> w odmianie Golden Promise.	tak
2	Poznanie wybranych regionów sekwencji genomowej <i>HveIF4E</i> w odmianie Golden Promise.	tak
3	Pozyskanie izolatów wirusa żółtej mozaiki jęczmienia (BaYMV) i wirusa łagodnej mozaiki jęczmienia (BaMMV). Temat będzie wykonany we współpracy z zespołem z IOR-PIB.	tak
4	Pierwszy etap analizy ekspresji wybranych <i>HveIF4E</i> w roślinach odmiany Golden Promise.	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.
- Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>).
- Analiza filogenetyczna pełnej sekwencji nukleotydów i wydedukowanej sekwencji aminokwasów z wykorzystaniem modelu Kimura 2-parameters (K2+G) oraz modelu Jones'a-Taylor'a-Thornton'a (JTT+G) w programie MEGA7.

Metody biologii molekularnej:

- Izolacja genomowego DNA, izolacja całkowitego RNA, synteza pierwszej nici cDNA, reakcja PCR, analiza elektroforetyczna, sekwencjonowanie i analiza wyników sekwencjonowania, reakcja RT-qPCR.
- Inokulacja roślin jęczmienia izolatami wirusów BaMMV i BaYMV.
- Oczyszczanie RNA wirusa z liści metodą z użyciem buforu cytrynianu potasu oraz fluorku fenylometylosulfonylu, wirowaniem 35000g na poduszce sacharozy oraz wirowaniem 40000g w gradiencie chlorku cezu.

Wyniki

Z 18 genów jęczmienia (*rym1* – *rym18*) warunkujących odporność na wirusy, 15 to geny recesywne. Jeden z nich *rym4*, zlokalizowany na chromosomie 3HL został sklonowany, wykazano, że koduje białko z domeną inicjacji elongacji 4E (eIF4E).

Temat 1. Identyfikacja *in silico* paralogów *eIF4E* w genomie jęczmienia, oznaczanych dalej, jako *HveIF4E*. Eksperymentalna weryfikacja obecności *HveIF4E* w genomowym DNA jęczmienia odmiany Golden Promise.

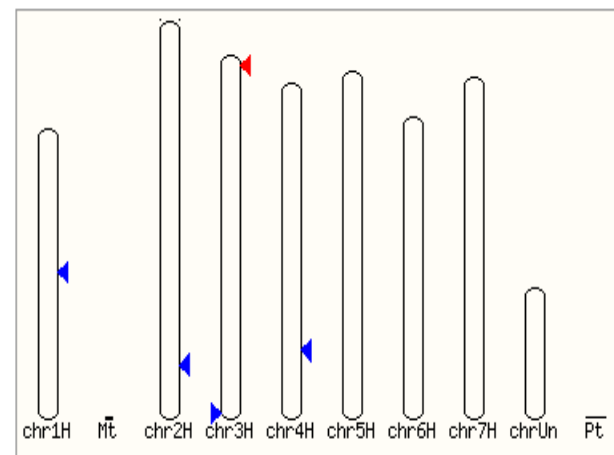
Wyniki

1. W bazie NCBI zidentyfikowano 77 obiektów o sekwencji praktycznie identycznej z sekwencją kodującą *rym4* (wartości E od 0 do $2e^{-175}$).
2. W bazie *EnsemblePlants* zidentyfikowano 5 genów jęczmienia kodujących białka z domeną IPR001040 czynnika inicjacji elongacji 4E.
3. Geny reprezentują paralogi rodziny genów *HveIF4E*.

Lp.	Numer ID genu	Lokalizacja na chromosomie	Pozycja na chromosomie	Numery wybranych sekwencji CDS
1	HORVU1Hr1G039260	1H	275290250 - 275294068	HORVU1Hr1G039260.2.
2	HORVU2Hr1G094490	2H	664937221 - 664938271	HORVU2Hr1G094490.1
3a	HORVU3Hr1G113940	3H (3aH)	689854512 - 689861683	HORVU3Hr1G113940.2
3b	HORVU3Hr1G007130	3H (3bH)	17361894 - 17365454	HORVU3Hr1G007130.1
4	HORVU4Hr1G061500	4H	516126711 - 516130946	HORVU4Hr1G061500.4

Temat 1. Wyniki c.d.

4. Zidentyfikowane geny zlokalizowane są na 4 chromosomach jęczmienia 1H, 2H, 3H i 4H.
5. Na rysunku przedstawiona jest chromosomowa lokalizacja. Sekwencja identyczna z klonem AJ699059 (czerwona strzałka), sekwencje o bardzo wysokim podobieństwie (strzałki niebieskie). Wszystkie kodują białko z domeną IPR001040 Translation Initiation Factor 4E.
6. Dwa z tych genów zlokalizowane są na chromosomie 3H, tym samym, na którym zmapowano allele recesywnych genów odporności na wirusy i na którym jest zmapowany *rym4*.



Lp.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba paralogów genu <i>eIF4E</i> zidentyfikowanych metodami bioinformatycznymi <i>in silico</i> w genomie jęczmienia.	4	5 ⁽¹⁾
2	Liczba paralogów <i>HveIF4E</i> potwierdzonych eksperymentalnie w genomie jęczmienia.	3	3

⁽¹⁾ - zidentyfikowano pięć paralogów *eIF4E* jęczmienia. Odpowiada to liczbie wszystkich paralogów genu *eIF4E* w genomie jęczmienia.

Wyniki

Temat 2. Poznanie wybranych regionów sekwencji genomowej *HveIF4E* w odmianie Golden Promise.

Wyniki i podsumowanie

1. Eksperymentalnie poznano sekwencje nukleotydowe regionów kodujących dwóch paralogów *eIF4E* zlokalizowanych na chromosomie 3H.
2. Wykazano 100% identyczność odczytanych eksperymentalnie sekwencji odmiany Golden Promise z odpowiadającymi im regionami genomu odmiany Morex (*EnsemblePlants*).
3. Wynik ten potwierdza możliwość wykorzystania *EnsemblePlants* do projektowania sekwencji nukleotydowej sgRNA w tym projekcie.
4. W roku 2020 udostępniona została baza genomu odmiany Golden Promise (Schreiber et al., 2020) <https://ics.hutton.ac.uk/gmapper/index.html>. W bazie tej nie ma graficznej reprezentacji genomu ani adnotacji genów. Jej konstrukcja pozwala jedynie na porównanie określonych sekwencji. Ta funkcja będzie wykorzystywana w dalszych etapach tego projektu.

Lp.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba regionów kodujących w <i>HveIF4E</i> jęczmienia o poznanej sekwencji nukleotydowej.	2	2

Wyniki

Temat 3. Pozyskanie izolatów wirusa żółtej mozaiki jęczmienia (BaYMV) i wirusa łagodnej mozaiki jęczmienia (BaMMV). Temat wykonany we współpracy z zespołem Prof. dr hab. Beaty Hasiów-Jarowszewskiej, IOR-PIB, Poznań.

Wyniki i podsumowanie

1. Z kolekcji DSMZ pozyskano izolaty wirusów BaMMV i BaYMV.
2. Obserwowano różne poziomy infekcyjności ww. izolatów po inokulacji różnych odmian jęczmienia.
3. Wysoka skuteczność inokulacji Maris Otter odmiany podatnej i modelowej dla tych prac potwierdza przydatność otrzymanych izolatów do planowanych badań.
4. Skuteczność inokulacji odmiany Golden Promise jest wystarczająca dla izolatu BaMMV. Natomiast wymaga dopracowania dla izolatu BaYMV.
5. Charakterystyka molekularna obydwu izolatów potwierdziła ich wysokie podobieństwo do izolatów europejskich (niemieckich i francuskich) oraz japońskich.

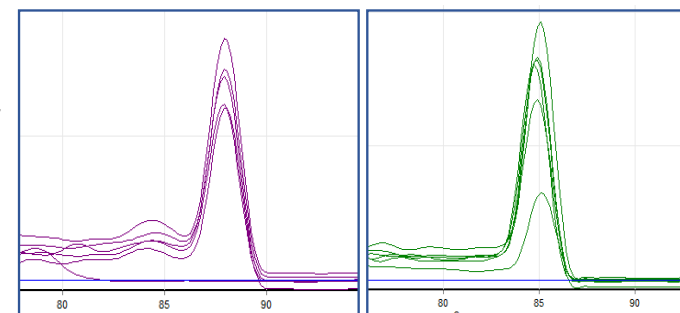
Lp.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba pozyskanych i wstępnie scharakteryzowanych izolatów wirusa żółtej mozaiki jęczmienia BaYMV.	1	1
2	Liczba pozyskanych i wstępnie scharakteryzowanych izolatów wirusa łagodnej mozaiki jęczmienia BaMMV.	1	1

Wyniki

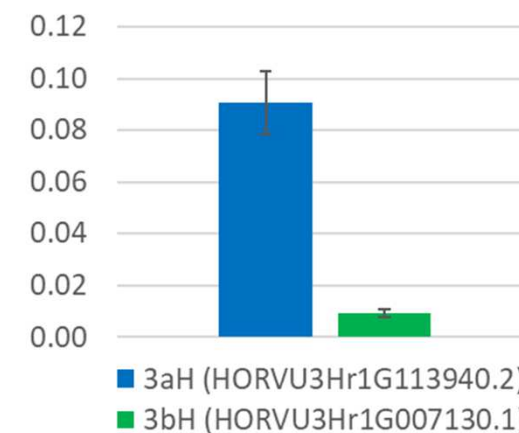
Temat 4. Pierwszy etap analizy ekspresji wybranych *HveIF4E* w roślinach odmiany Golden Promise.

Wyniki i podsumowanie

1. Amplifikowano fragmenty transkryptu dwóch paralogów *HveIF4E* zlokalizowanych w dwóch różnych loci na chromosomie 3 jęczmienia: HORVU3Hr1G113940 (3aH) i HORVU3Hr1G007130 (3bH).
2. Wykazano, że z ustalonych warunków amplifikowane są specyficjnie fragmenty cDNA każdego transkryptu.
3. Analizowano ekspresję w liściach 14-dniowych siewek odmiany Golden Promise i wykazano, że obydwa geny ulegają ekspresji.
4. Ilość transkryptu genu HORVU3Hr1G113940 (3aH) jest około 10 razy większa niż genu HORVU3Hr1G007130 (3bH).
5. Tak duże różnice mogą wskazywać na różne funkcje i potrzebę szczegółowej analizy ekspresji w wybranych genotypach w czasie infekcji.



Względna ekspresja *HveIF4E* w liściach 14-dniowych siewek jęczmienia odmiany Golden Promise



Lp.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba paralogów <i>HveIF4E</i> o poznanej ekspresji w liściach jęczmienia Golden Promise.	2	2

Lp.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana	Stopień realizacji miernika
1	2	3	4	5
temat badawczy 1				
1.1	Liczba paralogów genu <i>eIF4E</i> zidentyfikowanych metodami bioinformatycznymi in silico w genomie jęczmienia.	4	5 ⁽¹⁾	1 ⁽¹⁾
1.2	Liczba paralogów <i>HveIF4E</i> potwierdzonych eksperymentalnie w genomie jęczmienia.	3	3	1
temat badawczy 2				
2.1	Liczba regionów kodujących w <i>HveIF4E</i> jęczmienia o poznanej sekwencji nukleotydowej.	2	2	1
temat badawczy 3				
3.1	Liczba pozyskanych i wstępnie scharakteryzowanych izolatów wirusa żółtej mozaiki jęczmienia BaYMV.	1	1	1
3.2	Liczba pozyskanych i wstępnie scharakteryzowanych izolatów wirusa łagodnej mozaiki jęczmienia BaMMV.	1	1	1
temat badawczy 4				
4.1	Liczba paralogów <i>HveIF4E</i> o poznanej ekspresji w liściach jęczmienia Golden Promise.	2	2	1
			ŚREDNIA	1

⁽¹⁾ - zidentyfikowano pięć paralogów *eIF4E* jęczmienia. Odpowiada to liczbie wszystkich paralogów genu *eIF4E* w genomie jęczmienia.

Adres, pod którym wyniki badań są dostępne: <http://bip.ihar.edu.pl/artukul/128/586/l-p-w-zal-do-rozporzadzenia-mrirw-13>

