**Streszczenie**

**Zadanie nr** 3-1-00-4-01

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

W roku 2022 realizowano 4 tematy badawcze: 1) Adaptacja procedury inokulacji roślin odmiany referencyjnej i odmiany Golden Promise wirusem BaYMV i BaMMV (Współpraca z IOR-PIB), 2) Analiza ekspresji genów *HveIF4E* zidentyfikowanych w roku 2021 w roślinach jęczmienia po inokulacji wirusem, 3) Projektowanie sgRNA do wybranych paralogów *eIF4E* wykorzystując poznane sekwencje gDNA w odmianie Golden Promise i analiza *in silico* potencjalnych miejsc niedocelowych i 4) Synteza DNA komplementarnego do sgRNA. Konstruowanie wektorów CRISPR/Cas9 do ukierunkowanej mutagenezy wybranych regionów dwóch genów *eIF4E*.

Wszystkie tematy zrealizowano w 100%.

Najważniejsze wyniki uzyskane w roku 2022.

1. Inokulacja roślin izolatem BaYMV-DSMZ pozwoliła uzyskać rośliny z objawami porażenia. Wskaźnik porażenia był niski, ale wystarczający, aby potwierdzić podatność roślin odmiany modelowej Golden Promise i polskiej odmiany Bursztyn na infekcję wirusem żółtej mozaiki jęczmienia.
2. Inokulacja mechaniczna roślin wirusem łagodnej mozaiki jęczmienia, izolatem BaMMV-DSMZ pozwoliła otrzymać rośliny z objawami infekcji z wysokim wskaźnikiem porażenia dla modelowej odmiany Golden Promise oraz dwóch odmian polskich Bażant i Bursztyn.
3. W ubiegłym roku zidentyfikowano cztery paralogi *eIF4E* w jęczmieniu *HveIF4E1*, *HveIF4E2*, *HveIF4E3* i *HveIF4E-iso*. W roku bieżącym wykazano, że wszystkie paralogi wykazują aktywność transkrypcyjną.
4. Wzory ekspresji wskazały, że w liściach dominują transkrypty *HveIF4E2* oraz *HveIF4E3*. Transkrypty dwóch pozostałych są na poziomie około 1 rząd wielkości niższym.
5. Gen *HveIF4E2*, z silną ekspresję i lokalizacją w locus genów odporności jęczmienia jest pierwszym kandydatem do ukierunkowanej mutagenezy CRISPR/Cas9. Drugi kandydat *HveIF4E3* zlokalizowany na chromosomie 4H został wybrany ze względu na silną i modulowana przez infekcję wirusową ekspresję oraz brak wcześniejszych doniesień o takiej lokalizacji genów odporności na wirusy.
6. Zaprojektowano sekwencje nukleotydowe sgRNA komplementarne do paralogów *HveIF4E2* i *HveIF4E3* oraz jako opcję dodatkową, sgRNA komplementarne do obydwu paralogów jednocześnie z zamiarem uzyskania podwójnych mutantów w jednym cyklu edytowania.
7. Skonstruowano zestaw wektorów do ukierunkowanej mutagenezy *HveIF4E2* i *HveIF4E3*.
8. Poprawność tego wektora, zweryfikowana w trakcie konstruowania i po wprowadzeniu do *Agrobacterium tumefaciens*. Zamrożone w -80 °C porcje tych bakterii będą sukcesywnie używane do transformacji jęczmienia w kolejnym etapie realizacji Zad.13.
9. Wyniki prezentowano w formie doniesienia ustnego na VI Polskim Kongresie Genetyki, Kraków 27-30.2022. Book of Abstracts, p. 235-236. Tytuł: Editing of barley susceptibility gene for plant virus resistance. Autorzy: Y. Kloc, M. Dmochowska-Boguta, A. Hameed, B. Hasiów-Jaroszewska, K. Trzmiel, W. Orczyk.