

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

Cele zadania:

Zadanie obejmowało 3 tematy:

- 1) Opracowanie konstruktów genowych do wprowadzenia mutacji w genach związanych z porastaniem u pszenżyta. *Cel tematu:* Zaprojektowanie i wykonanie konstruktów genowych do edytowania genów PDF1 i CYP707A u pszenżyta.
- 2) Ocena funkcjonalności konstruktów nukleaz. *Cel tematu:* Sprawdzenie poprawności zaprojektowania i wykonania oraz ocena funkcjonalności konstruktów nukleaz.
- 3) Uprawa roślin pszenżyta, optymalizacja transformacji roślin oraz metody regeneracji *in vitro*. *Cel tematu:* Uzyskanie odpowiedniego materiału do transformacji pszenżyta, zastosowanie metody transformacji *in vitro* roślin pszenżyta wykonanymi konstruktami oraz regeneracja roślin T0.

Wyniki i dyskusja: *Ad 1).* Prace obejmowały zaprojektowanie i wykonanie konstruktów genetycznych do indukowania mutacji w genomie pszenżyta przy wykorzystaniu miejscowo-specyficznych nukleaz Crispr/Cas9. Do wprowadzenia mutacji wytypowano rejony 1 i 2 eksonu w sekwencji homologów genów PDF1 i CYP707A. Zaprojektowano i skonstruowano 6 konstruktów do edycji sekwencji w/w genów. Żadna z wybranych sekwencji sgRNA nie charakteryzuje się możliwością pełnego wiązania do innych *loci* niż zamierzone w subgenomach pszenżyta, na podstawie analiz *in silico*, co wskazuje na niskie ryzyko wystąpienia mutacji typu *off-target* po wprowadzeniu zaprojektowanych konstruktów do komórek rośliny. Analiza przygotowanych konstruktów poprzez trawienie restrykcyjne oraz poprzez sekwencjonowanie potwierdziła poprawność klonowania i skład sekwencji kodujących.

Wyniki i dyskusja: *Ad 2).* Przejściowa ekspresja konstruktów w wyniku transfekcji protoplastów stanowi metodę stosowaną do testowania konstruktów wykorzystywanych do mutagenazy miejscowo-specyficznej w roślinach. Po uzyskaniu 30-40% transfekcji protoplastów wytworzone konstrukty były sprawdzane poprzez ich ekspresję przejściową w protoplastach izolowanych z 4-7 dniowych siewek pszenżyta odm. Bogu. Wytworzone w temacie nr 1 konstrukty zawierające sgRNA3 dla genu CYP707A i sgRNA5 dla genu PDF1 zostały wykorzystane do przetestowania możliwości wprowadzania zmian w protoplastach przy użyciu transfekcji z PEG. Obecny w konstrukcie gen markerowy GFP umożliwił ocenę wydajności transfekcji. Analizy na poziomie DNA potwierdziły wystąpienie zmian typu delekcje/insercje w przewidywanych regionach genów CYP707A i PDF1 u pszenżyta. Wykonano analizy prowadzące do allelo-specyficznej amplifikacji PCR dla poszczególnych genomów cząstkowych A, B i R dla sekwencji poddanych mutagenzie.

Wyniki i dyskusja: *Ad 3).* Sprawdzone w temacie 2 konstrukty genowe po przeklonowaniu do szczepu AGL1 zostały użyte do transformacji niedojrzałych zarodków pszenżyta z zastosowaniem *A. tumefaciens*. Zastosowano metodę transformacji zarodków i regeneracji roślin *in vitro* zgodnie z procedurami opisanymi w Oleszczuk i in. 2004, z modyfikacjami własnymi. Przeprowadzono 3 niezależne eksperymenty transformacji w odstępach kilkudniowych. W wyniku prowadzonej selekcji i regeneracji otrzymano 10 linii T0 pszenżyta, które wykazały *in vitro* odporność na czynnik selekcyjny fosfintyrynę.

I. Podsumowanie i wnioski:

Cele wszystkich zadań zostały osiągnięte i zrealizowane w 100%. Zaprojektowano i wykonano konstrukty genowe do edytowania genów PDF1 i CYP707A u pszenżyta. Przeprowadzono ocenę funkcjonalności konstruktów nukleaz w systemie ekspresji przejściowej w protoplastach pszenżyta. Uzyskano materiał do transformacji stałej pszenżyta, a zastosowana metoda transformacji zarodków doprowadziła do uzyskania 10 linii T0 pszenżyta opornych na fosfintyrynę.

Krótką informacją o wynikach współpracy naukowo-technicznej krajowej i z zagranicą (przy współpracy z zagranicą podać kraj, firmę, temat).

Współpraca z Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK)², Gatersleben, Germany przy ocenie konstruktów do transformacji.