

NOWE TECHNIKI GENOMOWE w Polsce

7-8 kwietnia 2025



PAN

POLSKA AKADEMIA NAUK

Komitety Organizacyjne konferencji:

Anna NADOLSKA-ORCZYK – Przewodnicząca

Magdalena FRĄC

Dariusz GRZEBELUS

Ewa ŁOJKOWSKA



**Komitety
Biotechnologii**



**Komitety
Nauk
Agronomicznych**

Broszura została przygotowana
w Biurze Upowszechniania Nauki i Wydawnictw

Koordynacja prac – Karolina TRUSZ

Skład i łamanie – Andrzej FIGATOWSKI

Projekt graficzny okładki – Aneta KARWOWSKA (Biuro Komunikacji)

© Copyright
Polska Akademia Nauk

Druk: Agencja Wydawniczo-Poligraficzna GIMPO
ul. Transportowców 11, 02-858 Warszawa

Ogólnopolska konferencja naukowa
„Nowe Techniki Genomowe w Polsce”

7–8 kwietnia 2025 r.

Warszawa, Pałac Staszica,
Sala im. Marii Skłodowskiej-Curie



GŁÓWNY ORGANIZATOR

prof. dr hab. Anna Nadolska-Orczyk
a.orczyk@ihar.edu.pl, +48 22 7334619

PATRONATY HONOROWE



Minister Nauki
i Szkolnictwa Wyższego



Ministerstwo Rolnictwa
i Rozwoju Wsi

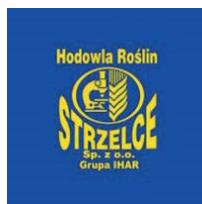
Minister Rolnictwa i Rozwoju Wsi
Czesław Siekierski



Narodowe Centrum Badań i Rozwoju

SPONSORZY

SPÓŁKI HODOWLANE



FIRMY I FUNDACJE



Seeing beyond



PROFESORA
Wacława Szybalskiego

Wprowadzenie

Nowe Techniki Genomowe (ang. New Genomic Techniques, NGT), w tym technologia CRISPR/Cas, zrewolucjonizowały możliwości precyzyjnej edycji genomu, znajdując szerokie zastosowanie w biologii molekularnej, medycynie oraz rolnictwie. Obecnie narzędzia te są wykorzystywane do modyfikacji genetycznych różnych organizmów, w tym roślin użytkowych, co umożliwia prowadzenie badań nad funkcjami genów oraz doskonalenie cech użytkowych.

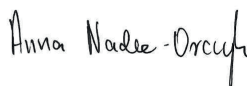
Pomimo ogromnego postępu technologicznego, wciąż istotnym wyzwaniem pozostaje zwiększenie efektywności i precyzji edycji, minimalizacja efektów ubocznych oraz rozwój metod dostarczania komponentów CRISPR/Cas do komórek docelowych. Równocześnie trwają prace nad eliminacją barier legislacyjnych i regulacyjnych związanych z komercyjnym zastosowaniem tej technologii.

Celem niniejszej konferencji jest:

1. omówienie aktualnych aspektów prawnych i technologicznych związanych z nowymi technikami genomowymi oraz przedstawienie kierunków badań podstawowych i wdrożeniowych realizowanych w Polsce,
2. stworzenie platformy do nawiązywania współpracy między jednostkami badawczymi, uczelniami, a także przedstawicielami spółek hodowlanych i przemysłu biotechnologicznego,
3. wspieranie innowacyjności oraz promowanie nowych technologii w celu tworzenia strategii dla rozwoju nauki i technologii w Polsce oraz budowania konkurencyjności kraju na arenie międzynarodowej.

Program konferencji obejmie 4 sesje organizowane i prowadzone przez członków Komitetu Biotechnologii i Komitetu Nauk Agronomicznych PAN. Zostaną omówione: aspekty społeczno – prawne, kierunki rozwoju technologii NGT w tym jej przydatność w gospodarce i hodowli roślin oraz stopień zaawansowania tych badań w Polsce – od adaptacji technologii do pierwszych osiągnięć. Zaplanowany jest panel dyskusyjny z udziałem przedstawicieli nauki, NCBR, NCN, ministerstw (MRiRW, MNiSW), przedstawicieli spółek hodowlanych oraz przemysłu. Będzie dotyczył kierunków rozwoju badań podstawowych i wdrożeniowych.

Konferencja skierowana jest do naukowców reprezentujących Komitety Polskiej Akademii Nauk oraz inne jednostki naukowe, takie jak uczelnie i instytuty badawcze, do przedstawicieli ministerstw (MRiRW, MNiSW) oraz instytucji finansujących badania (NCN, NCBR), a także do hodowców i przedstawicieli przemysłu rolno-spożywczego, w tym spółek hodowlanych oraz firm biotechnologicznych. Obrady będą również transmitowane on-line, co umożliwi udział szerokiemu gronu zainteresowanych młodych naukowców.



prof. dr hab. Anna Nadolska-Orczyk
Przewodnicząca Komitetu Organizacyjnego

Program konferencji

7 KWIETNIA 2025

10:00—10:45

rejestracja uczestników, powitalny poczęstunek
10:45—11:00 rozpoczęcie konferencji i przywitanie uczestników

11:00—13:00

SESJA 1

ASPEKTY SPOŁECZNO-PRAWNE

Prowadzący: **prof. dr hab. Tomasz TWARDOWSKI** — KB PAN
prof. dr hab. Paweł KRAJEWSKI — KNA PAN

11:00—11:30

dr Oana DIMA

Dyrektor Wykonawczy EU-SAGE

VIB-UGent Center for Plant Systems Biology, Uniwersytet Gent, Belgium

Rola naukowców zrzeszonych w EU-SAGE (European Sustainable Agriculture through Genome Editing) we wdrażaniu regulacji dotyczących nowych technik genomowych w hodowli roślin w Europie. Baza roślin uzyskanych technologiami NGT dostępna na stronie EU-SAGE

11:30—12:00

Małgorzata WOŹNIAK

Naczelnik Wydziału Bezpieczeństwa Białkowego i Roślinnych Zasobów Genowych

Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, Departament Hodowli i Ochrony Roślin

Nowe techniki genomowe z perspektywy przepisów UE

12:00—12:20

prof. dr hab. Paweł KRAJEWSKI

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk

Uwagi o metodach obliczeniowych i zarządzaniu danymi dla nowych technik genomowych

12:30—12:45

dr Karol MARCINIAK

Prezes PIN i HR Smolice

Polska Izba Nasienna i Hodowla Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR

NGT – nadzieje i obawy z punktu widzenia hodowli roślin

12:45—13:00

dr Tomasz ZIMNY

Prawnik

Instytut Nauk Prawnych Polskiej Akademii Nauk

Rośliny NGT w świetle przepisów o GMO, zagadnienia związane z regulacją i prawem patentowym

13:00—14:00

Przerwa na lunch

14:00—16:00

SESJA 2

**KIERUNKI ROZWOJU TECHNOLOGII NGT I PRZYDATNOŚĆ
W GOSPODARCE I HODOWLI ROŚLIN (TECHNOLOGIE, GENY, CECHY)**

Prowadzący: **prof. dr hab. Arkadiusz KOSMALA** — KNA PAN
prof. dr hab. Rafał BARAŃSKI — KB i KNA PAN

14:00—14:30

prof. dr hab. Wacław ORCZYK

Zakład Genomiki Funkcjonalnej, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
— Państwowy Instytut Badawczy

Technologia CRISPR/Cas stan obecny i perspektywy rozwoju

14:30—15:00

prof. dr hab. Dariusz GRZEBELUS

Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Igły w stogu siana, czyli jak wytypować geny do edycji

15:00—15:30

prof. dr hab. Rafał BARAŃSKI

Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa,
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Odmiany roślin NGT dopuszczone do uprawy

15:30—16:00

dr hab. Magdalena ŻUK, prof. UWR

Zakład Biochemii Genetycznej, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski

*Wykorzystanie technologii OLIGO do indukcji ukierunkowanych zmian
epigenetycznych w genomie roślinnym***8 KWIETNIA 2025**

9:00—11:30

SESJA 3

**ZAAWANSOWANIE BADAŃ W POLSCE — OD ADAPTACJI TECHNOLOGII
DO PIERWSZYCH OSIĄGNIĘĆ**

Prowadzący: **prof. dr hab. Anna NADOLSKA-ORCZYK** — KB i KNA PAN
prof. dr hab. Dariusz GRZEBELUS — KNA PAN

9:00—9:30

prof. dr hab. Anna NADOLSKA-ORCZYK

Zakład Genomiki Funkcjonalnej, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
— Państwowy Instytut Badawczy

*Edycja genomu zbóż (jęczmień, pszenica, pszenżyto) z wykorzystaniem
CRISPR/Cas9 – badania Zakładu Genomiki Funkcjonalnej na rzecz
ulepszania cech agronomicznych*

9:30—10:00

dr Artur PIŃSKI

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Wydział Nauk Przyrodniczych,
Uniwersytet Śląski w Katowicach

Edycja genomu w grzybie: duża roślina – duże możliwości

10:00—10:30

prof. dr hab. Arkadiusz KOSMALA

Instytut Genetyki Roślin PAN

Zastosowanie CRISPR/Cas9 do edycji genomu rzepaku, ziemniaka i traw - analizy funkcji wybranych genów prowadzone w IGR PAN

10:30—11:00

Przerwa kawowa

11:00—11:20

dr Yuliya KLOC

Zakład Genomiki Funkcjonalnej, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
— Państwowy Instytut Badawczy

Zastosowanie CRISPR/Cas9 w edycji regulatorów szlaku sygnałowego brasinosteroidów u jęczmienia w celu zwiększenia odporności na stresy środowiskowe

11:20—11:40

prof. dr hab. Wacław ORCZYK

Zakład Genomiki Funkcjonalnej, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
— Państwowy Instytut Badawczy

Edytowanie genów eIF4E jęczmienia w celu uzyskania roślin o podniesionej odporności na wirusy

11:40—12:00

dr hab. Magdalena KLIMEK-CHODACKA, prof. URK

Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa,
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Edycja (knockout) genów marchwi – układ modelowy i badanie funkcji genów

12:00—13:30

PANEL DYSKUSYJNY

Prowadząca: **prof. dr hab. Ewa ŁOJKOWSKA** — KB PAN,
przedstawiciele nauki, NCN, NCBiR, MRiRW, MNiSW,
przedstawiciele Spółek Hodowlanych, Polskiej Izby Nasiennej (PIN),
Krajowej Grupy Spożywczej (KGS)

13:30

ZAKOŃCZENIE KONFERENCJI

13:30—14:30

Obiad

Streszczenia

Rola naukowców zrzeszonych w EU-SAGE (European Sustainable Agriculture through Genome Editing) we wdrażaniu regulacji dotyczących nowych technik genomowych w hodowli roślin w Europie. Baza roślin uzyskanych technologiami NGT dostępna na stronie EU-SAGE

Oana DIMA

VIB-UGent Center for Plant Systems Biology, Uniwersytet Gent, Belgium

e-mail: oana.dima@vib.be

Czy wiesz, że istnieje już ponad 950 aplikacji metod precyzyjnej hodowli roślin takich jak edycja genomów roślin uprawnych, opublikowanych w literaturze naukowej? Komisja Europejska stwierdza jednak, że wszystkie organizmy powstałe w wyniku nowych technik genomowych (NGT) wchodzą w zakres prawodawstwa UE dotyczącego organizmów zmodyfikowanych genetycznie (GMO). W konsekwencji uprawa ze zmianą genetyczną powstałą w wyniku konwencjonalnej techniki mutagenyzy jest wyłączona z zakresu przepisów dyrektywy GMO, podczas gdy uprawa z tą samą zmianą genetyczną uzyskaną w wyniku zastosowania nowych technik genomowych podlega dyrektywie GMO, co ogranicza potencjał edycji genomów dla rozwoju ulepszonych odmian roślin w Europie.

W 2023 roku Komisja Europejska wydała projekt rozporządzenia, dotyczący regulacji wykorzystania odmian wyhodowanych przy użyciu nowych technik genomowych, aby umożliwić wykorzystanie potencjału edycji genomu w celu ulepszenia upraw i przyczynienia się do rozwoju zrównoważonych systemów żywnościowych. Wniosek prawny Komisji dotyczący NGT może mieć znaczący wpływ na europejski sektor badań i hodowli roślin, rolników oraz firmy nasienne. UE znajduje się obecnie w krytycznym momencie, związanym z koniecznością określenia jakie innowacyjne technologie będą dostępne, aby pomóc rolnikom sprostać wyzwaniom związanym ze zmianą klimatu, wzmocnić działania na rzecz zrównoważonego rozwoju i chronić różnorodność biologiczną, nie pozostawiając nikogo w tyle. Nadchodzące decyzje polityczne w Europie określą, w jaki sposób edycja genomów w hodowli roślin może przyczynić się do przejścia na ekologiczną gospodarkę.

W moim wystąpieniu przedstawię prace stowarzyszenia EU-SAGE, zrzeszającego członków ponad 150 europejskich instytucji zajmujących się prowadzeniem badań z wykorzystaniem roślin na rzecz wprowadzenia legislacji umożliwiającej wykorzystanie nowych technik genomowych w europejskim zrównoważonym rolnictwie.

Nowe techniki genomowe z perspektywy przepisów UE

Małgorzata WOŹNIAK

Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi

e-mail: malgorzata.Wozniak@minrol.gov.pl

5 lipca 2023 roku Komisja Europejska przyjęła projekt rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie roślin otrzymanych z wykorzystaniem niektórych Nowych Technik Genomowych (NGT) oraz pochodzących z nich żywności i pasz, a także zmieniającego rozporządzenie UE 2017/625. Projekt dotyczy wyłącznie roślin i obejmuje dwie nowe techniki genomowe: ukierunkowaną mutagenezę i cisgenezę. Unijne rozporządzenie zakłada podział na dwie kategorie roślin w zależności od liczby modyfikacji wprowadzonych w DNA rośliny. Kategoria NGT 1 z maksymalnie 20 zmianami i kategoria NGT 2 – powyżej 20 zmian. Kategoria NGT 1 została uznana jako równoważna roślinom konwencjonalnym a kategoria NGT 2 traktowana jest jak GMO, ale z niewielkimi złagodzeniami. Projekt przygotowany przez Komisję Europejską, zgodnie z obowiązującymi procedurami współdecydowania w procesie stanowienia prawa, został przekazany do oceny Rady i Parlamentu Europejskiego. Praca w Radzie rozpoczęła się podczas prezydencji hiszpańskiej w lipcu 2023 a następnie w roku 2024 była kontynuowana przez prezydencję belgijską i węgierską. Obecnie pracę nad nim prowadzi prezydencja polska.

Państwa członkowskie z zainteresowaniem przyjęły projekt przedstawiony przez Komisję Europejską. W zaproponowanych przepisach dostrzegły potencjalny wkład NGT w realizację celów zrównoważonego rozwoju Europejskiego Zielonego Ładu i strategii „od pola do stołu”. Niemniej jednak w prowadzonej dyskusji podniesiono wiele obaw dotyczących bezpieczeństwa NGT 1 dla ludzi, zwierząt i środowiska, braku transparentności wynikającego ze zniesieniem obowiązku znakowania żywności i pasz pochodzących z roślin NGT 1, czy braku przepisu umożliwiającego państwom członkowskim zakazanie uprawy roślin NGT na ich terytorium. Istotnym elementem dyskusji była potrzeba zapewnienia konkurencyjności małym i średnim firmom hodowlanym w obliczu zagrożeń wynikających z możliwości pojawienia się na rynku unijnym dużej liczby opatentowanych odmian.

W trakcie prezydencji hiszpańskiej, belgijskiej i węgierskiej do projektu zaproponowano wiele zmian, w tym np. możliwość zakazywania uprawy roślin NGT kategorii 2 przez państwa członkowskie, Parlament Europejski jako jedną z ważniejszych poprawek zaproponował zakaz patentowania roślin NGT. Polska prezydencja od początku kładzie nacisk na sprawy patentowania roślin NGT i przejrzystość informacji patentowej, co ma ogromne znaczenie dla firm hodowlanych, Prezydencja uważa za konieczne przeprowadzenie analizy wpływu patentów, których właścicielami są głównie duże koncerny nasienne, na cały europejski sektor hodowli roślin. Polska dąży do zakończenia pracy w Radzie i przejścia do kolejnego etapu prac nad projektem czyli trilogów między Radą, Komisją i Parlamentem Europejskim.

Uwagi o metodach obliczeniowych i zarządzaniu danymi dla nowych technik genomowych

Paweł KRAJEWSKI

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk

e-mail: pkra@igr.poznan.pl

Współczesne badania naukowe dotyczące roślin korzystają z danych uzyskiwanych różnymi metodami pomiarowymi, w różnego typu doświadczeniach i opisujących wiele różnych własności badanych obiektów. Prawidłowa integracja tych danych i wspólna analiza zmierzająca do uzyskania nowej wiedzy jest wyzwaniem, z którym zmagają się obecnie wiele zespołów badawczych. Postawiony cel może być zrealizowany poprzez dążenie do takiego opisywania i utrwalania danych, które zapewnia ich wyszukiwalność, dostępność, interoperacyjność i możliwość wielokrotnego wykorzystania – zgodnie z zasadami FAIR. Niektóre rozwiązania i metody służące do dobrego zarządzania danymi o roślinach to: rekomendacje dotyczące prawidłowego opisywania danych, protokoły wymiany danych oraz przedsięwzięcia zmierzające do połączenia danych znajdujących się w różnych, niekoniecznie kompatybilnych zasobach. Implementacja takich rozwiązań w istniejących lub tworzonych obecnie bazach danych jest warunkiem koniecznym użyteczności tych baz dla badań naukowych i zastosowań praktycznych, w szczególności – dla rozwiązywania zagadnień związanych z nowymi technikami genomowymi (NGT). W tym obszarze, ważne będzie przechowywanie i przetwarzanie danych wykorzystywanych m.in. do: optymalizacji protokołów NGT, oceny asocjacji pomiędzy genotypem i fenotypem roślin, opisywania produktów NGT, oceny reakcji roślinnych pod względem kryteriów zgodności z tradycyjnymi metodami hodowlanymi i monitorowania procesu wdrażania NGT. Pewne rozwiązania w tym zakresie można sugerować, jednak wprowadzenie stabilnych procedur zapewniających skuteczne i harmonijne współdziałanie interesariuszy w obszarze NGT wymaga rozwiązań systemowych.

NGT – nadzieje i obawy z punktu widzenia hodowli roślin

Karol MARCINIAK

Hodowla Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR/Polska Izba Nasienna

e-mail: karol.marciniak@hrsmolice.pl

Hodowla roślin w największym stopniu przyczynia się do wzrostu efektywności produkcji roślinnej. Proces hodowli jest nieustannie modyfikowany poprzez wdrażanie nowych technik, rozwiązań, metod, narzędzi, które pozwalają na skrócenie cyklu hodowlanego, wpływają na bardziej precyzyjną ocenę materiału roślinnego oraz pozwalają wytworzyć coraz lepsze odmiany.

Szczególną pozycję wśród najnowszych innowacji stanowią tzw. nowe techniki genomowe (*New Genomic Technics* – NGT), zwłaszcza w swej „lżejszej” formie NGT1, nie wymagającej oceny ryzyka. Szczególnie zainteresowane uwolnieniem innowacji typu NGT do środowiska są światowe korporacje biotechnologiczne, które przedstawiają wiele korzystnych przykładów ich zastosowania. Dzięki tym technikom mają zmniejszyć się negatywne skutki zmian klimatu, mają być wprowadzone nowe cechy użytkowe i jakościowe, ma nie zabraknąć żywności dla rosnącej populacji. Wykorzystanie NGT ma pozwolić m.in. na tworzenie odmian bardziej odpornych na szkodniki, choroby i niekorzystne warunki środowiskowe, a więc rośliny wymagające mniej zasobów naturalnych, nawozów i pestycydów, co ma przyczynić się do także zachowania różnorodności biologicznej i korzystniej wpływać na środowisko.

Trwający proces legislacyjny najprawdopodobniej umożliwi wkrótce dopuszczenie roślin NGT1 do rynku, jednak bez uwzględnienia wielu obaw ze strony małych i średnich firm hodowlanych, zarówno krajowych jak i europejskich. Podstawowe obawy małych i średnich firm hodowlanych dotyczą głównie wpływu patentowania na ograniczenie dostępu do zasobów genetycznych, niezbędnych do tworzenia nowych odmian. Nie jest jasny wpływ prawa patentowego na wyłączne prawo do odmiany, w szczególności w zakresie przywileju hodowcy oraz tzw. odstępstwa rolnego. Istnieją też poważne obawy związane z nieumyślnym naruszeniem patentu. Uzyskanie dostępu do opatentowanej innowacji może być bardzo kosztowne lub niemożliwe co będzie skutkować marginalizacją znaczenia lokalnych firm hodowlanych i w konsekwencji uzależnieniem produkcji roślinnej i żywności w Polsce i Europie od kilku światowych dostawców nowych technologii.

Jednocześnie polska hodowla roślin wspiera rozwój nauki w krajowych instytucjach naukowych i jest gotowa do współuczestniczenia w rozwijaniu technologii NGT w celu tworzenia nowych, wartościowych cech, mogących mieć zastosowanie w hodowli nowych odmian i w praktyce rolniczej.

Rośliny NGT w świetle przepisów o GMO, zagadnienia związane z regulacją i prawem patentowym

Tomasz ZIMNY

Instytut Nauk Prawnych PAN

e-mail: tzimny@inp.pan.pl

W wystąpieniu przedstawiam stan prac nad przepisami regulującymi wykorzystanie nowych technik genomowych w hodowli roślin, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu kontrowersji dotyczących patentowania takich roślin na proponowany kształt uregulowań. Dyskusja dotycząca statusu prawnego organizmów powstałych przy wykorzystaniu różnego rodzaju nowych technik hodowlanych (tj. czy podlegają one bądź czy powinny podlegać regulacjom dotyczącym GMO) toczy się w Unii przynajmniej od roku 2007, niemniej jednak przez większość tego czasu nie przynosiła ona efektów w postaci oficjalnych projektów zmian w prawie. Sytuacja ta uległa zmianie w lipcu 2023 roku, wraz z przedstawieniem przez Komisję Europejską projektu rozporządzenia w sprawie roślin powstałych dzięki wykorzystaniu nowych technik genomowych (NGT). Zgodnie z projektem rozporządzenia rośliny powstałe przy wykorzystaniu NGT mają zostać podzielone na dwie kategorie. Do pierwszej (NGT-1) mają zostać zaliczane rośliny uznane za równoważne roślinom uzyskanym dzięki technikom stosowanym w hodowli konwencjonalnej, do drugiej (NGT-2) pozostałe rośliny NGT. Co do zasady do roślin NGT-1 mają nie mieć zastosowania restrykcyjne przepisy o GMO, podczas gdy mają one mieć zastosowanie do roślin NGT-2 (z pewnymi modyfikacjami).

W toku prac legislacyjnych okazało się, że istotne kontrowersje wzbudza kwestia, której projekt Komisji w ogóle nie reguluje – kwestia możliwości patentowania roślin NGT oraz wpływu takich patentów na możliwość wykorzystania tych roślin w pracach hodowlanych, przez podmioty inne niż uprawniony z patentu. Wątpliwości w tym zakresie (również zgłaszane przez Polskę) stały się jedną z głównych przyczyn, dla których projekt nie uzyskał dotychczas akceptacji państw członkowskich. W referacie przedstawię propozycje Parlamentu Europejskiego oraz prezydencji: belgijskiej i polskiej w odniesieniu do kwestii patentowania roślin NGT oraz potencjalne konsekwencje przyjęcia którejś z tych propozycji.

Technologia CRISPR/Cas stan obecny i perspektywy rozwoju

Wacław ORCZYK

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Genomiki Funkcjonalnej, Radzików, Błonie

e-mail: w.orczyk@ihar.edu.pl

Nowe techniki genomowe (NGT, *New Genomic Techniques*) to zestaw zaawansowanych metod modyfikacji genomu, umożliwiających precyzyjne zmiany w DNA bez wprowadzania obcego materiału genetycznego. W hodowli roślin, NGT są stosowane do poprawy cech agronomicznych i użytkowych. Ich zastosowanie pozwala skrócić czas oraz obniżyć koszty uzyskania odmian, co stanowi istotny postęp w porównaniu do tradycyjnych metod hodowlanych. Najważniejszą technologią edycji genomu jest CRISPR/Cas. Na wykładzie zostanie omówiony podstawowy, pierwotnie odkryty system CRISPR/Cas9, pozwalający na wprowadzanie mutacji w wybranych regionach genomu, tj. mutagenезę miejscowo specyficzną. Przedstawione zostaną kluczowe komponenty tego systemu, mechanizmy molekularne warunkujące kolejne etapy procesu oraz efekt końcowy, czyli mutację w zdefiniowanym miejscu genomu. Omówione zostaną modyfikacje podstawowego systemu CRISPR/Cas9, rodzaje indukowanych zmian oraz inne zastosowania biotechnologiczne tej technologii.

Zostanie przedstawiona duża różnorodność natywnych systemów CRISPR/Cas obecnych w drobnoustrojach (archeonach i bakteriach). W tej części omówiona będzie różnorodność ortologów białka Cas9 oraz innych białek o podobnej funkcjonalności, które zostały zidentyfikowane i zaadaptowane do edytowania genów. Omówiony zostanie również schemat wykorzystania strategii edycji genów w hodowli roślin. Szczególna uwaga zostanie zwrócona na kluczowe czynniki decydujące o skutecznej edycji, takie jak znajomość genetycznych uwarunkowań danej cechy oraz umiejętności praktyczne w zakresie stosowania technologii.

W podsumowaniu podkreślona zostanie rola własności intelektualnej w komercjalizacji technologii CRISPR/Cas9 oraz uzyskanych dzięki niej roślin i cech użytkowych. Istotnym aspektem będzie dostępność licencji na CRISPR/Cas dla małych i średnich firm hodowlano-nasiennych, co może wpłynąć na dynamikę innowacji w tym sektorze. Obecnie kształtowane regulacje prawne w Unii Europejskiej, w tym definicja tzw. *Kategorii 1*, mogą istotnie wpłynąć na możliwość wykorzystania technologii CRISPR/Cas w hodowli roślin uprawnych w krajach UE. Ostateczny kształt przepisów będzie miał kluczowe znaczenie dla przyszłości NGT w europejskim rolnictwie oraz dla konkurencyjności unijnego sektora hodowlanego na rynku światowym.

Igły w stogu siana, czyli jak wytypować geny do edycji

Dariusz GRZEBELUS

Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

e-mail: dariusz.grzebelus@urk.edu.pl

Nowe techniki genomowe (New Genomic Techniques; NGT) umożliwiają wprowadzenie ukierunkowanych zmian w genomach roślin uprawnych, które wpływają na funkcjonowanie edytowanych genów, co następnie ma przełożyć się na korzystne z użytecznego punktu widzenia zmiany fenotypowe u nowej odmiany. Aby skutecznie wytypować do edycji te geny, które warunkują pożądane efekty fenotypowe, należy je zidentyfikować i funkcjonalnie scharakteryzować. Cel ten staje się coraz bardziej osiągalny dzięki ogromnemu postępowi technologicznemu, który miał miejsce w ostatnich dekadach, pozwalając na prowadzenie wielkoskalowych eksperymentów z zakresu genomiki strukturalnej i funkcjonalnej. Obecnie niemal dla każdego gatunku rośliny uprawnej opracowano referencyjne złożenia genomu, obejmujące jego sekwencję i adnotację. Jakość złożenia genomów większości gatunków o dużym znaczeniu gospodarczym jest wysoka, są one określane jako „gapless” (bez przerw) lub „T2T” (telomere-to-telomere), co oznacza, że złożenie jest kompletne, a wszystkie chromosomy są reprezentowane przez nieprzerwane sekwencje. Następny poziom złożoności to tzw. pan-genomy, czyli złożenia wielu genomów reprezentujących ten sam gatunek, które poza sekwencją obejmują również informację o wariantach strukturalnych różniących te genomy, a nawet super-pan-genomy grupujące złożenia genomów pokrewnych gatunków w ramach jednego rodzaju.

Dostępność sekwencji referencyjnych umożliwia identyfikację genów kandydujących, odpowiedzialnych za warunkowanie ważnych gospodarczo cech roślin uprawnych, w oparciu o analizę loci cech ilościowych (quantitative trait loci; QTL). Klasyczna analiza QTL obejmowała konstrukcję populacji segregującej, jej fenotypowanie i genotypowanie, sporządzenie mapy sprzężeń genetycznych i identyfikację rejonów genomu sprzężonych z fenotypem. Obecnie jednak stosuje się podejście określane jako całogenomowe badanie asocjacyjne (Genome-wide Association Study; GWAS), wykorzystujące fenotypowanie osobników z niespokrewnionych populacji i ich wysokowydajne genotypowanie, co umożliwia znacznie precyzyjniejszą lokalizację genetycznych determinant fenotypu.

W celu weryfikacji poprawnego wytypowania genów kandydujących należy również je zbadać pod względem funkcjonalnym. W tym celu określa się profil ich ekspresji, pozycję w obrębie tzw. sieci regulatorowych (gene regulatory networks; GRN). Pełna charakterystyka strukturalna i funkcjonalna powinna ułatwić wskazanie tych spośród genów kandydujących, których edycja może pozwolić na uzyskanie oczekiwanego efektu fenotypowego.

Odmiany roślin NGT dopuszczone do uprawy

Rafał BARAŃSKI

Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

e-mail: rafal.baranski@urk.edu.pl

Nowe techniki genomowe (New Genomic Techniques; NGT) umożliwiają uzyskiwanie nowych cech lub ich modyfikowanie poprzez generowanie zmian genetycznych w zaplanowanych lokalizacjach w genomie. Indukowane zmiany mają charakter mutacji różnego typu: substytucji oraz delecji i insercji o różnej długości. Dlatego proces ich indukowania określa się terminem „ukierunkowana mutageneza”, a potocznie „edycja genomu”, z uwagi na precyzyjnie zaplanowaną lokalizację gdzie ma dojść do mutacji. Do edycji typuje się lokalizacje na DNA, w których mutacja może wywołać zmiany fenotypu, tj. bezpośrednio w genach lub elementach regulujących ekspresję genów.

W ostatnich latach zostały dopuszczone do uprawy odmiany uzyskane z wykorzystaniem NGT, w szczególności ODN i TALEN, a przede wszystkim CRISPR/Cas. Aktualnie liczba odmian tzw. NGT dopuszczonych do uprawy jest niewielka, jednak szybki postęp technologiczny i rozwój badań nad wykorzystaniem NGT oraz liberalizacja przepisów w zakresie stosowania roślin NGT w wielu krajach na świecie, sprzyja komercjalizacji tych odmian. Szczególnie techniki oparte o elementy systemu CRISPR/Cas, które są nieustannie modyfikowane i udoskonalane, stwarzają perspektywę przyspieszonego procesu hodowli odmian wykazujących cechy, których otrzymanie innymi metodami hodowlanymi byłoby niemożliwe lub długotrwałe i kosztowne.

Dotychczas dopuszczone do uprawy odmiany NGT charakteryzują się zmianami cech jakościowych, dla których uwarunkowania genetyczne są dobrze rozpracowane. Są to soja o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych, kukurydza o zmienionym składzie skrobi pomidor ze większą akumulacją GABA, kapusta liściowa pozbawiona ostrego smaku czy banany nie ulegające ciemnieniu. Dopuszczone są także odmiany tolerancyjne na herbicydy, soi, ryżu i lnu. Z reguły wprowadzone w nich mutacje mają charakter delecji powodujące knock-out wytypowanego genu.

Lista już dopuszczonych odmian jest zapewne znacznie dłuższa, lecz brak obowiązkowych rejestrów odmian NGT uniemożliwia ich identyfikację, o ile właściciel/hodowca odmiany nie upubliczni o niej informacji. Świadczyć o tym mogą liczne wnioski o wyłączenie roślin NGT spod regulacji dotyczących GMO składane np. w Argentynie, lecz niedostępne publicznie.

Wykorzystanie technologii OLIGO do indukcji ukierunkowanych zmian epigenetycznych w genomie roślinnym

Magdalena ŻUK¹, Aleksandra GÓRECKA¹, Cezary KRASNOŁĘBSKI¹, Amelia SZUKOWSKA²,
Julia KARPIŃSKA^{1,2}, Urszula KAŻMIERCZAK²

¹ Uniwersytet Wrocławski, Wydział Biotechnologii, Zakład Biochemii Genetycznej.

² Uniwersytet Wrocławski, Wydział Biotechnologii, Zakład Biologii Molekularnej Komórki.

e-mail: magdalena.zuk@uwr.edu.pl

Technologia OLIGO służy do epigenetycznej modulacji aktywności genu. W metodzie tej wykorzystuje się oligodeoksyrybonukleotydy, które łączą się komplementarnie do wybranej sekwencji kwasu nukleinowego (DNA genomowego, mRNA) i mogą prowadzić zarówno do wyciszenia, jak i nadekspresji badanego genu.

Technologia OLIGO jest alternatywą dla metod GMO – opierających się na wprowadzeniu do genomu, różnorodnych konstrukcji genetycznych oraz metody amiRNA (ang. artificial microRNA) opierającej się na tworzeniu zmodyfikowanych endogennych prekursorów miRNA, zaprojektowanych tak, by móc wyciszyć docelowy gen. W odróżnieniu od tych metod nie wymaga użycia wektorów i jest zdecydowanie mniej czasochłonna.

Zastosowanie sekwencji oligonukleotydowych komplementarnych do wskazanych (specyficznych) obecnych w komórce kwasów nukleinowych (zwykle cząstek mRNA) pozwala na nieinwazyjną modulację ich aktywności przy użyciu „naturalnych mechanizmów” regulacji genów aktywnych w komórce. Zwykle uzyskiwane zmiany mają charakter przejściowy i ich efekt utrzymuje się przez kilka dni. Możliwym jest również uzyskanie bardziej stabilnych zmian – przekazywanych kolejnym pokoleniom – dzieje się tak w przypadku wyidukowania mechanizmów stabilizacji zmian epigenetycznych poprzez np. indukcję zmian metylacji genomowego DNA.

Metoda ta, określana często nazwą ASO (Antisense oligonucleotides) jest stosowana również w komórkach ssaczych i istnieją już nawet terapie chorób genetycznych (wynikających z zachwiania poziomu konkretnych białek) opierające się na tej metodzie.

Adaptacja takiej metody do komórek roślinnych jest możliwa i wykonano już ją skutecznie dla szeregu roślin np.: *Arabidopsis thaliana*, lnu, ziemniaka, ogórka, jęczmienia. Dodatkową zaletą takiej metody jest możliwość użycia jej na rosnącej w glebie roślinie (transformacja pojedynczych liści), na młodych roślinach, różnorodnych tkankach (liście, korzenie, łodyga) jak również na kulturach zawieszinowych.

Oligonukleotydy mogą być dostarczane do komórek poprzez infiltracje do liści lub całej rośliny w warunkach obniżonego ciśnienia, lub przez wtłoczenie w przestwory między komórkowe. Możliwe jest również aktywne pobranie oligonukleotydów przez roślinę wraz z cukrem (sacharozą). Metoda ta pozwala na zachowanie pełnej kondycji modyfikowanej rośliny i umożliwia zastosowanie tej techniki poza laboratorium i na większą (półprzemysłową) skalę.

Edycja genomu zbóż (jęczmień, pszenica, pszenżyto) z wykorzystaniem CRISPR/Cas9 – badania Zakładu Genomiki Funkcjonalnej IHar-PIB na rzecz ulepszania cech agronomicznych

Anna NADOLSKA-ORCZYK

Zakład Genomiki Funkcjonalnej, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Błonie

e-mail: a.orczyk@ihar.edu.pl

Początek badań nad technologią edycji genów i ukierunkowanej mutagenезy (CRISPR/Cas9) w naszym Zakładzie obejmował opracowanie technik regeneracji *in vitro* oraz transformacji zbóż, takich gatunków jak jęczmień, pszenica, pszenżyto i owies. Ze względu na dużą i złożoną strukturę genomów, szczególnie gatunków allopoliploidalnych, prowadzenie badań molekularnych i hodowlanych tych roślin jest długotrwałe i wymagające uwzględnienia ich struktury genetycznej. Transformację genetyczną realizujemy głównie przy użyciu *Agrobacterium* oraz metodą biolistyczną, a nasze badania koncentrują się również na opracowaniu bezwektorowych technologii edycji genomu.

W 2018 roku opracowaliśmy i opatentowaliśmy pierwszy wektor CRISPR/Cas9 dostosowany do edycji pszenicy. Na jego podstawie edytujemy geny jęczmienia, pszenicy i pszenżyta, uzyskując ukierunkowane mutacje, które pozwalają zarówno na prowadzenie badań podstawowych dotyczących funkcji genów w tych gatunkach (finansowanych przez NCN), jak i na ulepszanie cech użytkowych w liniach hodowlanych oraz odmianach zbóż (badania finansowane przez MRiRW).

W naszym zespole modelowym obiektem edycji genów zbóż jest odmiana *Golden Promise* jęczmienia. Pozwala ona, przy wykorzystaniu adaptowanej przez nas technologii CRISPR/Cas9, uzyskać wysoką wydajność edycji, sięgającą od kilku do kilkudziesięciu procent w zależności od modyfikowanego genu. Diploidalny genom tego gatunku umożliwia uzyskanie homozygot już w roślinach pokolenia T₀ oraz prostą segregację mutacji w pierwszym pokoleniu generatywnym. Wstępne badania przeprowadzone na tym modelu stanowią podstawę do rozszerzenia analiz na gatunki poliploidalne, takie jak pszenica i pszenżyto.

W ramach badań podstawowych analizujemy funkcje genów jęczmienia i pszenicy, które mogą być kluczowe dla ulepszania odmian uprawnych. Badania wdrożeniowe koncentrują się na wprowadzaniu ukierunkowanych mutacji w liniach, rodach i odmianach wskazanych przez hodowców, co pozwala na uzyskanie lub polepszenie pożądanych cech, takich jak zwiększona produktywność oraz lepsza tolerancja na stresy biotyczne i abiotyczne.

Finansowanie: NCN, OPUS 19, grant UMO-2020/37/B/NZ9/00744;

Dotacja Celowa MRiRW, zad. 4.1

Edycja genomu w gryce: duża roślina – duże możliwości

Artur PINSKI¹, Magdalena ZARANEK¹, René PÉREZ-PÉREZ¹, Alicja TOMASIAK¹,
Manfred BECKMANN², Luis A.J. MUR², Katarzyna NOWAK¹, Magdalena ROJEK-JELONEK¹,
Anna KOSTECKA-GUGAŁA³, Przemysław PETRYSZAK³, Bożena SKUPIEN-RABIAN⁴,
Urszula JANKOWSKA⁴, Xabier Simón MARTÍNEZ DE GOÑI⁵, Usue Perez LOPEZ⁵, Aneta SŁOMKA⁶,
Agnieszka PŁĄŻEK⁷, Przemysław KOPEC⁸, Kamila GODEL-JĘDRYCHOWSKA¹,
Katarzyna SALA-CHOLEWA¹, Katarzyna NOWAK¹, Ewa KURCZYŃSKA¹,
Ewa GRZEBELUS³, Alexander BETEKHTIN¹

¹Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Śląski w Katowicach

²Instytut Nauk Biologicznych, Środowiskowych i Rolniczych, Uniwersytet Aberystwyth, Wielka Brytania

³Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

⁴Pracownia Proteomiki i Spektrometrii Mas, Małopolskie Centrum Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński

⁵Wydział Biologii Roślin i Ekologii, Uniwersytet Kraju Basków, Leioa, Hiszpania

⁶Instytut Botaniki, Wydział Biologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

⁷Katedra Fizjologii, Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Wydział Rolniczo-Ekonomiczny, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

⁸Instytut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk, Kraków

e-mail: artur.pinski@us.edu.pl, alexander.betekhtin@us.edu.pl

Gryka stanowi cenne źródło pożywienia, zawierając różnorodne związki fenolowe, zwłaszcza rutozyd, kwercetynę oraz C-glikozyloflawony, a także witaminy o pozytywnych właściwościach terapeutycznych i dietetycznych wspierających zdrowie człowieka. Do tej pory zidentyfikowano 22 gatunki gryki, z których większość to gatunki dzikie. Dwa najczęściej uprawiane to obcocylna gryka zwyczajna (*Fagopyrum esculentum*) oraz samocylna gryka tatarska (*Fagopyrum tataricum*). Gryka zwyczajna jest bardziej rozpowszechniona niż gryka tatarska, a jej zasięg obejmuje Europę, Japonię i region Indo-Mjanmański. Niski poziom uprawy gryki w Europie wynika głównie z jej niewielkiego plonu, nawyków żywieniowych konsumentów oraz braku wiedzy wśród producentów żywności na temat jej wartości odżywczej i właściwości. Największym ograniczeniem w jej uprawie jest krótka żywotność kwiatów, które utrzymują się zaledwie jeden dzień. Ponadto gryka charakteryzuje się wyjątkowo krótkim okresem wegetacyjnym (70–90 dni) i dużą wrażliwością na przymrozki, wysokie temperatury oraz suszę, co może prowadzić do intensywnego zrzucania kwiatów i zamierania zarodków.

W tej prezentacji skupimy się na naszych aktualnych wynikach badań nad gryką (*F. esculentum* i *F. tataricum*). Obejmują one rozwój skutecznych technik hodowli protoplastów oraz uzyskanie somatycznych hybryd poprzez elektrofuzję. Po raz pierwszy uzyskaliśmy stabilne transformanty *F. tataricum* z wykorzystaniem wektorów zawierających GFP i GUS. Co więcej, opracowanie metody transformacji genetycznej gryki pozwoliło nam na wyłączenie genu desaturazy fitoenu za pomocą systemu CRISPR/Cas9. Uzyskaliśmy także mutanty z zinktywowanymi genami związanymi z metylacją DNA, które wykazują zaburzenia w plonowaniu. Wszystkie te osiągnięcia otwierają nowe możliwości zarówno dla podstawowych, jak i aplikacyjnych badań nad gryką.

Finansowanie: Badania zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki, Polska, projekty OPUS 19 (2020/37/B/NZ9/01499 przyznany AB) oraz SONATA BIS 10 (2020/38/E/NZ9/00033 przyznany AB).

Zastosowanie CRISPR/Cas9 do edycji genomu rzepaku, ziemniaka i traw – analizy funkcji wybranych genów prowadzone w IGR PAN

Danuta BABULA-SKOWROŃSKA, Agnieszka KIEŁBOWICZ-MATUK, Izabela PAWŁOWICZ,
Arkadiusz KOSMALA

Instytut Genetyki Roślin PAN

e-mail: akos@igr.poznan.pl

Badania prowadzone w IGR PAN przy wykorzystaniu technologii CRISPR/Cas9 u gatunków uprawnych dotyczyły jak dotąd analizy funkcji wybranych genów w rzepaku, ziemniaku uprawnego i traw pastewnych. U rzepaku (*Brassica napus* L.) technologię tę zastosowano w celu poznania funkcji czterech homologów genu *BnaHB6* (kodującego czynnik transkrypcyjny z rodziny HD-Zip I) w regulacji odpowiedzi roślin na stres suszy i zasolenia. Wcześniejsze badania funkcjonalne wykazały, że geny *BnaHB6* są częścią złożonej sieci regulatorowej w rzepaku, która umożliwia roślinom przystosowanie się do niekorzystnych warunków środowiskowych. Wykonano eksperymenty celem edycji wszystkich czterech homologów *BnaHB6* lub ich wybranych par. Uzyskano kilkanaście roślin transgeniczných dla każdego układu badawczego. Obecnie trwają prace zmierzające do określenia typu modyfikacji badanych genów u otrzymanych transformantów (NCN OPUS 12; 2016/23/B/NZ9/02175). Kolejnym tematem badań jest analiza funkcji trzech homologów genu *chl* (kodującego chloropląstową lipokalinę) w stabilizowaniu aparatu fotosyntetycznego podczas stresu oksydacyjnego u tetraploidalnej odmiany kostrzewy trzcinowej (*Festuca glaucescens* Boiss.). W obrębie grupy otrzymanych transformantów uzyskano linię z delecją we wszystkich trzech homologach genu *chl* (NCN OPUS 20; 2020/39/B/NZ9/02488). Kierunkiem innych badań jest poznanie funkcji białek zawierających palce cynkowe typu B-box, tj. StBBX20, StBBX4, StBBX22 i regulatora ich transkrypcji – białka StZPR1 w procesach wzrostu i rozwoju ziemniaka uprawnego (*Solanum tuberosum*), a przede wszystkim w mechanizmach regulacji czasu kwitnienia i tuberyzacji (NCN OPUS 15; 2018/29/B/NZ9/01457). Uzyskano rośliny transgeniczne z mutacją typu knockout we wszystkich czterech allelach genu *StBBX22*. Analiza fenotypowa uzyskanych linii wykazała, że białko StBBX22 może być pozytywnym regulatorem rozwoju generatywnego, bowiem mutanty *stbbx22* charakteryzowały się znacznie mniejszą liczbą kwiatów w porównaniu do roślin kontrolnych. Dodatkowo przy zastosowaniu techniki CRISPR/Cas9 podjęto próby otrzymania mutantów typu knockout dla genów *StBBX4*, *StBBX20* i *StZPR1*. Szczegółowa analiza transformantów wykazała, że większość uzyskanych linii była w stanie heterozygotycznym, a u niektórych z nich odnotowano substitucję pojedynczego nukleotydu w obrębie sekwencji badanego genu, która nie wpłynęła na zmianę sekwencji aminokwasowej białka.

Zastosowanie CRISPR/Cas9 w edycji regulatorów szlaku sygnałowego brassinosteroidów u jęczmienia w celu zwiększenia odporności na stresy środowiskowe

Yuliya KLOC¹, Marta DMOCHOWSKA-BOGUTA¹, Paulina ŻEBROWSKA-RÓŻAŃSKA²,
Łukasz ŁACZMAŃSKI², Anna NADOLSKA-ORCZYK¹, Wacław ORCZYK¹

¹ Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Genomiki Funkcjonalnej, Błonie

² Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki, Wrocław

e-mail: y.kloc@ihar.edu.pl

Brassinosteroidy (BR) są ważną grupą roślinnych hormonów, które regulują wzrost, rozwój oraz tolerancję na stresy środowiskowe. Szlak sygnalizacyjny BR jest kontrolowany przez dwa czynniki transkrypcyjne, BZR1 i BES, które ulegają inaktywacji w wyniku fosforylacji przez białko GSK3.

Głównym celem badań było poznanie funkcji genu *HvGSK1.1* w kształtowaniu cech agromicznych jęczmienia. W tym celu edytowano ten gen przy użyciu technologii CRISPR/Cas9, a następnie analizowano cechy fenotypowe uzyskanych mutantów.

Wykonano cykl badań pozwalający na edycję genu *HvGSK1.1* w jęczmieniu odmiany Golden Promise. Zaprojektowano sgRNA i skonstruowano wektor zawierający kasetę Cas9-sgRNA. W wyniku transformacji tym wektorem uzyskano 57 roślin T₀. W tej grupie, 50 roślin zawierało T-DNA z kasetą Cas9-sgRNA, a w 29 roślinach (58%) potwierdzono obecność mutacji w edytowanym regionie *HvGSK1.1*, przy użyciu endonukleazy T7EI.

Sekwencjonowanie NGS wykazało szerokie spektrum mutacji m.in. zmiany pojedynczych nukleotydów, krótkie insercje, delecje. Molekularnym efektem większości tych zmian był przedwczesny kodon Stop i terminacja translacji (tzw. mutacje knockout).

Wybrane mutanty knockout genu *HvGSK1.1* porównane do niezmutowanej kontroli wykazywały istotnie większą biomasę siewek uprawianych zarówno w warunkach normalnych jak i w warunkach stresu zasolenia. Masa tysiąca ziaren (MTZ) w tych liniach porównana z MTZ roślin kontrolnych była większa o ponad 10%. Jeden z mutantów z delecją 6 nukleotydów i tym samym oczekiwaną delecją dwóch aminokwasów wykazywał mniejszą biomasę siewek w warunkach normalnych oraz nie wykazywał istotnych różnic w MTZ.

Zaadaptowano biotest (kątów nachylenia liści) do ilościowej oceny ścieżki sygnałowej BR i reakcji roślin na obecność brassinosteroidów (BR). Wyniki biotestu wykazały, że mutacje typu knockout w edytowanym genie *HvGSK1.1* wzmocniły sygnalizację zależną od BR, co potwierdza funkcję *HvGSK1.1* jako negatywnego regulatora szlaku BR.

Wyniki wskazują, że ukierunkowana edycja *HvGSK1.1* może być efektywną strategią uśkiwania roślin jęczmienia o podwyższonej tolerancji na stres zasolenia i lepszych parametrach plonowania. Ten cykl może być adaptowany do wybranych materiałów hodowlanych jęczmienia lub innych gatunków zbóż.

Finansowanie: Narodowe Centrum Nauki (NCN), grant Preludium 17, 2019/33/N/NZ9/00880 (YK).

Edytowanie genów *eIF4E* jęczmienia w celu uzyskania roślin o podniesionej odporności na wirusy

Wacław ORCZYK, Marta DMOCHOWSKA-BOGUTA, Yulia KLOC, Anna NADOLSKA-ORCZYK

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Genomiki Funkcjonalnej, Radzików, Błonie

e-mail: w.orczyk@ihar.edu.pl

W badaniach nad mechanizmami odporności roślin istotne jest pojęcie tzw. genów podatności gospodarza. Kodowane przez te geny białka są wykorzystywane przez patogeny do skutecznej infekcji. Jednym z najlepiej poznanych białek roślinnych, które odgrywa kluczową rolę w tym procesie, jest eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 4E (eIF4E). Uczestniczy on w translacji eukariotycznej oraz poprzez wiązanie z białkiem VPg wirusa umożliwia cykl infekcyjny wirusów z rodziny *Potyviridae*. Mutacje w genie *eIF4E* warunkują recesywnie dziedziczną odporność na potywirusy w wielu gatunkach roślin. W jęczmieniu zidentyfikowano kilkanaście alleli *rym* (*resistance to yellow mosaic*) warunkujących taką odporność.

Całogenomowa analiza jęczmienia pozwoliła zidentyfikować cztery paralogi *eIF4E* i określić ich lokalizację na chromosomie 1H, 3H i 4H. Odpowiadało to lokalizacji przynajmniej sześciu znanych genów odporności oraz sześciu innych jeszcze niepoznanych. Wszystkie te geny są aktywne transkrypcyjnie, a infekcja wirusowa w niewielkim stopniu modulowała ich wzór ekspresji. Dwa paralogi *eIF4E*, charakteryzujące się około 10x wyższą ekspresją niż pozostałe, wybrano jako cele edycji. Zaprojektowano *sgRNA* oraz skonstruowano zestaw trzech wektorów zawierających gen *Cas9* i sekwencje kodujące *sgRNA* dla wybranych genów docelowych. Przygotowano dwa wektory z pojedynczym *sgRNA* dla każdego z wybranych genów oraz jeden wektor przeznaczony do jednoczesnej edycji obu genów.

Po Agrotransformacji ponad 2500 zarodków uzyskano 120 transgenicznych roślin T₀. Analiza przesiewowa z wykorzystaniem enzymu T7EI potwierdziła wystąpienie mutacji w pierwszym genie u 25 roślin, w drugim u 13 roślin, a w obu genach jednocześnie u 6 roślin. W pokoleniu T₁ analiza metodami T7EI, enzymami restrykcyjnymi oraz sekwencjonowaniem Sangera potwierdziła obecność mutacji w genach docelowych. Sekwencjonowanie NGS amplikonów mutowanych regionów umożliwiło szczegółową charakterystykę typów mutacji w indywidualnych roślinach pokolenia T₁ i T₂. Obserwowano dużą różnorodność rodzajów mutacji i genotypów. Z wybranych roślin uzyskano kolekcję linii mutantów homozygotycznych pozbawionych T-DNA. Obecnie linie te są namnażane i jednocześnie analizowane pod kątem odporności na wybrane wirusy.

Finansowanie: MRiRW, Postęp Biologiczny w Produkcji Roślinnej, Zad.13.

Edycja (knockout) genów marchwi – układ modelowy i badanie funkcji genów

Magdalena KLIMEK-CHODACKA, Tomasz OLESZKIEWICZ, Dominik HUBER, Rafał BARAŃSKI

Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

e-mail: m.chodacka@urk.edu.pl

Technologia edycji genów za pomocą systemu CRISPR/Cas9 zrewolucjonizowała badania nad funkcjami genów w roślinach. Dzięki tej metodzie możliwe jest precyzyjne wprowadzanie zmian w sekwencji DNA, co pozwala na dokładne określenie roli poszczególnych genów w procesach biologicznych. Wykorzystanie CRISPR/Cas9 umożliwia zarówno knock-out genów, jak i ich knock-in, co jest szczególnie przydatne w analizach funkcjonalnych. Dodatkowo, technologia ta pozwala na jednoczesne edytowanie wielu genów pozwalając tym samym na efektywne badania złożonych szlaków metabolicznych. W kontekście roślin uprawnych, takich jak marchew, CRISPR/Cas9 stanowi narzędzie do modyfikacji genetycznych, umożliwiając poprawę cech agronomicznych oraz badanie funkcji genów związanych chociażby z odpornością na stresy środowiskowe.

W przeprowadzonych badaniach, system CRISPR/Cas9 został zastosowany w kulturach kalusa oraz protoplastów. Badania skoncentrowały się głównie na genie *f3h*, który w marchwi jest odpowiedzialny za biosyntezę antocyjanów. Edycja tego genu zarówno w kalusie, jak i protoplastach spowodowała utratę akumulacji antocyjanów. Analizy molekularne potwierdziły zajście mutacji, które najczęściej skutkowały przesunięciem ramki odczytu oraz powstaniem przedwczesnego kodonu stop. Przeprowadzone analizy molekularne pozwoliły na zaobserwowanie różnych typów mutacji, tj. delecji i insercji pojedynczych nukleotydów, małych delecji w miejscach docelowych DNA oraz długich delecji (33–152 nt) między miejscami docelowymi gRNA. Mutacje te występowały z różną wydajnością, osiągając do 12% w przypadku długich delecji, podczas gdy ogólna skuteczność edycji była bardzo wysoka i osiągnęła 71%.

Opracowany przez nas system modelowy jest intensywnie wykorzystywany do badania funkcji genów w marchwi. W wyniku równoległych analiz zidentyfikowaliśmy kluczowe geny zaangażowane w biosyntezę karotenoidów (*psy1* i *psy2*) oraz w odpowiedź roślin na stres zasolenia (*opr2* i *tcp*). Ponadto, wytypowaliśmy miRNA uczestniczące w regulacji reakcji na stresy abiotyczne, takie jak zasolenie i wysoka temperatura. Nasze badania koncentrują się na funkcjonalnej charakterystyce tych genów i miRNA, co może przyczynić się do opracowania nowych strategii hodowlanych zwiększających odporność marchwi na niekorzystne warunki środowiskowe.

Uczestnicy konferencji NGT

WYKŁADOWCY

- 1 **BARAŃSKI Rafał, prof. dr hab.**
Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa,
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
- 2 **DIMA Oana, PhD**
Science policy manager EU-SAGE Executive Manager
VIB-UGent Center for Plant Systems Biology, Uniwersytet Gent, Belgia
- 3 **GRZEBELUS Dariusz, prof. dr hab.**
Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa,
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
- 4 **KLIMEK-CHODACKA Magdalena, dr, prof. URK**
Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa,
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
- 5 **KLOC Yuliya, dr**
Zakład Genomiki Funkcjonalnej, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
– Państwowy Instytut Badawczy
- 6 **KOSMALA Arkadiusz, prof. dr hab.**
Instytut Genetyki Roślin PAN
- 7 **KRAJEWSKI Paweł, prof. dr hab.**
Instytut Genetyki Roślin PAN
- 8 **MARCINIAK Karol, dr inż.**
Prezes PIN oraz Prezes Zarządu HR Smolice
Polska Izba Nasienna; Hodowla Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR
- 9 **NADOLSKA-ORCZYK Anna, prof. dr hab.**
Zakład Genomiki Funkcjonalnej, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
– Państwowy Instytut Badawczy

10 ORCZYK Wacław, prof. dr hab.

Zakład Genomiki Funkcjonalnej, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
– Państwowy Instytut Badawczy

11 PIŃSKI Artur, dr

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska,
Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Śląski w Katowicach

12 WOŹNIAK Małgorzata

Naczelnik Wydziału Bezpieczeństwa Białkowego i Roślinnych Zasobów Genowych
Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, Departament Hodowli i Ochrony Roślin

13 ZIMNY Tomasz, dr

Instytut Nauk Prawnych PAN

14 ŻUK Magdalena, dr hab., prof. UWR

Zakład Biochemii Genetycznej, Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski

ZAPROSZENI GOŚCIE**15 DOBRZYŃSKA Nina**

Dyrektor Departamentu Hodowli i Ochrony Roślin MRiRW
Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi

16 BERSKA-WOŹNICKA Tatiana

Główny specjalista, Wydział Bezpieczeństwa Białkowego i Zasobów Genowych
Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, Departament Hodowli i Ochrony Roślin

17 KOSTRZEWA Małgorzata

Kierownik Sekcji Programów Krajowych
Narodowe Centrum Badań i Rozwoju

18 KRAMEK Agnieszka

Koordynator projektu, Sekcja Programów i Konkursów Krajowych
Narodowe Centrum Badań i Rozwoju

19 LESYNG Karolina

Dyrektor Działu Dotacji Krajowych i Funduszy UE
Narodowe Centrum Badań i Rozwoju

20 **MARSZAŁEK Krystian, prof. dr hab. inż.**

Przewodniczący Komisji Nauk o Życiu

Narodowe Centrum Nauki

21 **NAJDA-JĘDRZEJEWSKA Izabela**

Zastępca Dyrektora Departamentu Innowacji i Rozwoju

Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego

UCZESTNICZY**– członkowie Komitetu Biotechnologii PAN**22 **BARCISZEWSKI Jan, prof. dr hab.**

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

23 **BARTOSZEWSKI Grzegorz, prof. dr hab.**

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

24 **HRYNKIEWICZ Katarzyna, prof. dr hab.**

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

25 **ŁOJKOWSKA Ewa, prof. dr hab.**

Przewodnicząca Komitetu Biotechnologii PAN

Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

26 **SŁOMSKI Ryszard, prof. dr hab.**

Instytut Genetyki Roślin PAN

27 **STĘPIEŃ Łukasz, prof. dr hab.**

Instytut Genetyki Roślin PAN

28 **TWARDOWSKI Tomasz, prof. dr hab.**

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

29 **ZEYLAND Joanna, dr hab., prof. UPP**

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

UCZESTNICZY**– członkowie Komitetu Nauk Agronomicznych PAN**30 **BŁASZCZYK Lidia, dr hab.**

Instytut Genetyki Roślin PAN

- 31 **FRĄC Magdalena, prof. dr hab.**
Przewodnicząca Komitetu Nauk Agronomicznych PAN
Instytut Agrofizyki PAN
- 32 **JĘDRYCZKA Małgorzata, prof. dr hab.**
Członek korespondent PAN
Instytut Genetyki Roślin PAN
- 33 **MARASEK-CIOŁAKOWSKA Agnieszka, prof. IO**
Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy
- 34 **PODWYSZYŃSKA Małgorzata, prof. dr hab.**
Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy
- 35 **RAPACZ Marcin, prof. dr hab.**
Katedra Fizjologii, Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Wydział Rolniczo-Ekonomiczny,
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
- 36 **STOJAŁOWSKI Stefan, prof. dr hab.**
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

UCZESTNICY reprezentujący jednostki naukowe

- 37 **CZEMBOR Paweł, dr hab., prof. IHAR-PIB**
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
- 38 **KWIATEK Michał, prof. dr hab.**
Zastępca dyrektora ds. Naukowych IHAR-PIB
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
- 39 **OLSZEWSKI Marcin, dr hab. inż., prof. PW**
Katedra Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków,
Politechnika Warszawska
- 40 **PACAK Andrzej, dr hab., prof. UAM**
Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
- 41 **ROKICKI Michał, dr inż.**
Dyrektor IHAR-PIB
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

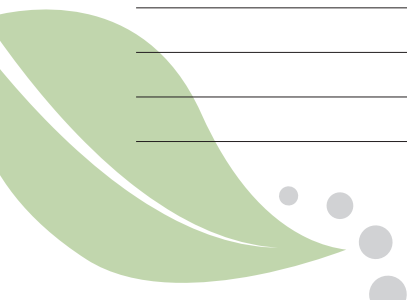
UCZESTNICY reprezentujący hodowlę roślin

- 42 **BECH Aleksandra**
Starszy specjalista ds. Hodowli
Hodowla Ziemniaka Zamarte Sp. z o.o. Grupa IHAR
- 43 **BUJAK Henryk, prof. dr hab.**
Dyrektor COBORU
Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych
- 44 **BRODA Michał**
Pomorsko Mazurska Hodowla Ziemniaka Sp. z o.o., Strzekęcino
- 45 **GACEK-BOGUCKA Katarzyna, dr**
Dyrektor ds. Badań i Rozwoju
Hodowla Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR
- 46 **GRYNIA Joanna, dr inż.**
Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o.o., Oddział Wiatrowo
- 47 **HANEK Monika**
DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o.
- 48 **JACKOWSKI Piotr**
Prezes HZiNR Polanowice
Hodowla Zwierząt i Nasiennictwo Roślin Polanowice Sp. z o.o.
- 49 **JASIŃSKA Dorota, dr inż.**
Dyrektor ds. Hodowli – Naczelny Hodowca
Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o.o., Oddział Wiatrowo
- 50 **KIDACKA Agnieszka**
Dyrektor ds. Hodowli Roślin
Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o.o., Krajowa Grupa Spożywcza
- 51 **LUTY Marek**
Dyrektor Działu Marketingu i Rozwoju Produktu
Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR
- 52 **MATYSIK Przemysław, dr**
Dyrektor Pionu Hodowli Roślin
Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR

- 53 **NIEWIŃSKA Małgorzata**
Dyrektor Zakładu
DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o.
- 54 **RYSIŃSKA Maria**
Speyside Group
- 55 **SĘCZKOWSKI Dominik**
Kutnowska Hodowla Buraka Cukrowego Sp. z o.o.
- 56 **SITARSKI Adam**
Dyrektor ds. Hodowli/Główny Hodowca
Kutnowska Hodowla Buraka Cukrowego Sp. z o.o.
- 57 **SOWUL Przemysław**
Przedstawiciel firmy Sowul & Sowul Sp. z o.o.
- 58 **TURCZYNOWICZ Sławomira**
Pomorsko Mazurska Hodowla Ziemniaka Sp. z o.o., Strzekęcino
- 59 **WÓJCIK Krzysztof**
Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o.o.
- 60 **ZAJĄC Marek**
Zastępca Dyrektora Wykonawczego Segmentu Nasiennego-Rolnego KGS S.A.
Krajowa Grupa Spożywcza S.A.

SEKRETARIAT KONFERENCJI

- 61 **BOCIAN Joanna**
Doktorantka
Szkola Doktorska AgroBioTech PhD, IHAR-PIB
- 62 **POZNAŃSKI Paweł**
Doktorant
Szkola Doktorska AgroBioTech PhD, IHAR-PIB

This image shows a blank sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and extend across the width of the page. In the bottom-left corner, there is a green decorative element consisting of several overlapping curved shapes, resembling stylized leaves or a modern logo. The overall appearance is that of a clean, unused piece of stationery.

A decorative graphic in the bottom right corner featuring a large, stylized green leaf with a white outline, and several smaller grey circles of varying sizes arranged in a curved path to its left.

