

Zadanie 3.18. Opracowanie systemu edycji genomu techniką CRISPR/Cas oraz optymalizacja metod regeneracji i transformacji wybranych gatunków roślin jagodowych.

Cel zadania:

- 1) Opracowanie wydajnej metody regeneracji pędów przybyszowych borówki wysokiej i maliny z różnych eksplantatów.
- 2) Opracowanie metody uzyskiwania protoplastów borówki wysokiej i maliny na potrzeby bezwektorowej strategii edycji genomu.
- 3) Ocena skuteczności transformacji genetycznej borówki wysokiej i maliny za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens* z wykorzystaniem genu reporterowego *gus*.
- 4) Wybór sekwencji docelowych do edycji genu kodującego enzym desaturazę fitoenową.

Opis zadania:

1) Optymalizacja metody regeneracji pędów przybyszowych z różnych eksplantatów wybranych genotypów borówki wysokiej i maliny z hodowlanej kolekcji ZHRO.

Do badań wybrano 2 genotypy borówki wysokiej: 17A i 21A i trzy genotypy maliny właściwej: 'Polana', L-41, L-15. Dla wybranych genotypów przeprowadzono ocenę zdolności do tworzenia pędów przybyszowych z wykorzystaniem blaszek liściowych, a dodatkowo dla maliny także z ogonków liściowych. Eksplantaty pobierano z kultur *in vitro*, zainicjowanych z pąków kątowych i mnożonych na pożywkach zoptymalizowanych dla każdego genotypu. W celu określenia optymalnych warunków efektywnej regeneracji pędów dla poszczególnych genotypów zastosowano pożywki zawierające różne stężenia cytokinin (zeatyna, TDZ lub BAP) zastosowane pojedynczo lub łącznie z auksyną (IAA, NAA lub NAA). Testowano również różne warunki świetlne podczas regeneracji, a także oceniano wpływ antybiotyków stosowanych do eliminacji *Agrobacterium tumefaciens*: cefotaksym i karbenicylina oraz antybiotyku selekcyjnego - higromycyny na regenerację pędów przybyszowych badanych genotypów. Dla obu genotypów borówki wysokiej najwyższą zdolność regeneracyjną obserwowano na pożywce z dodatkiem zeatyny w stężeniu 4 mg L⁻¹ bez obecności auksyny. Dla genotypu 17A zdolność regeneracyjną podwyższało umieszczenie kultur na 2 tygodnie w ciemności (78%), dla genotypu 21A umieszczenie kultur od początku na świetle (87%). W przypadku maliny wykazano wyższą efektywność regeneracji z ogonków liściowych niż z blaszek liściowych. Zdolność regeneracyjną znacząco podwyższało zastosowanie TDZ (0,5-1 mg·L⁻¹) w porównaniu z BAP i zeatyną. Dodanie auksyny do pożywki z cytokininą nie miało wpływu na regenerację lub w niektórych kombinacjach prowadziło do zamierania kultur. Najwyższą zdolność regeneracyjną wykazywał klon hodowlany L-15, a następnie 'Polana' i L-41 (kolejno 83% i 66,6%). Obecność antybiotyków w pożywce znacząco ograniczała tworzenie tkanki kalusowej i indukcję pędów przybyszowych u wszystkich badanych genotypów.

2) Opracowanie metodyki uzyskiwania protoplastów borówki wysokiej i maliny.

Podjęto trzy próby izolacji protoplastów z obu gatunków roślin jagodowych. Do izolacji protoplastów wykorzystywano liście z 2-tygodniowych pędów borówki oraz maliny pochodzących z kultur *in vitro*. W pierwszej kolejności przetestowano jednostopniową metodę izolacji protoplastów, w której materiał roślinny został umieszczony w roztworze enzymatycznym trawiącym ścianę komórkową, zawierającym 2 enzymy: Cellulase Onozuka i Pectolyase. Kolejne dwie próby izolacji protoplastów z obu gatunków obejmowały 2 etapy: trawienie ściany komórkowej z udziałem różnych enzymów celulolitycznych i pektynolitycznych (mieszanina 2 lub 3 enzymów), a następnie oczyszczanie uzyskanych protoplastów z resztek niestrawionych tkanek. Po oczyszczeniu protoplastów ustalono ich gęstość na poziomie 8 x 10⁵ protoplastów/na 1 ml pożywki płynnej za pomocą hemocytometru oraz przeprowadzono ocenę żywotności za pomocą barwienia błękitem trypanu. W przypadku obu gatunków ściana komórkowa nie została do końca strawiona w badanej mieszaninie enzymów i uzyskano częściowe uwolnienie protoplastów. Największą liczbę żywotnych protoplastów z mniejszą zawartością resztek niestrawionej tkanki uzyskano po zastosowaniu dwustopniowej metody izolacji protoplastów, w której do trawienia ścian komórkowych użyto mieszaniny 3 enzymów: Driselase, Cellulase RS i Pectolyase.

3) Ocena skuteczności transformacji genem reporterowym *gus* borówki wysokiej i maliny właściwej.

Blaszki liściowe badanych genotypów poddano próbie transformacji genetycznej za pośrednictwem bakterii *Agrobacterium tumefaciens* noszącej plazmid binarny pCambia1105.1r z genem reporterowym *gus*, kodującym β -glukuronidazę. Bakterie hodowane były w pożywce płynnej LB z dodatkiem antybiotyku selekcyjnego. Kultura bakterii była następnie odwirowywana i zawieszana w świeżej pożywce LB bez antybiotyku. Zawiesinę rozcieńczano pożywką LB do uzyskania pożądanej gęstości optycznej (OD): 0,35 lub 1.0. Eksplantaty inokulowano przez 3 minuty w zawiesinie bakteryjnej z dodatkiem acetosyringonu w stężeniu 200 μ M, następnie osuszano i wykładano na odpowiednie pożywki regeneracyjne. Kokultywację eksplantatów z bakterią prowadzono przez 3-6 dni w ciemności, po tym czasie blaszki liściowe płukano w antybiotyku (500 mg L⁻¹ cefotaksymu) i umieszczano na pożywkach regeneracyjnych zawierających 250 mg L⁻¹ cefotaksymu. Po 7 dobach eksplantaty przenoszono na pożywkę selekcyjno-regeneracyjną zawierającą 250 mg L⁻¹ cefotaksymu i 2 mg L⁻¹ higromycyny. Skuteczność transformacji komórek borówki wysokiej i maliny właściwej oceniano na podstawie analizy aktywności enzymu β -glukuronidazy metodą histochemiczną w reakcji z X-Gluc 7 dni po kokultywacji. Transformacji genetycznej uległy blaszki liściowe borówki wysokiej genotypu 17A oraz maliny właściwej genotypu L-41. Nie uzyskano pozytywnego wyniku transformacji blaszek liściowych borówki wysokiej genotypu 21A oraz ogonków liściowych u testowanych genotypów maliny i blaszek liściowych maliny genotypu L-15 oraz 'Polany'.

4) Wybór sekwencji docelowych do edycji genu kodującego desaturazę fitoenuową.

W przypadku obu gatunków, genem docelowym do edycji będzie gen *pds* kodujący desaturazę fitoenuową, enzym zaangażowany w biosyntezę karotenoidów. Sekwencja genu *pds* zarówno z borówki wysokiej jak i z maliny właściwej nie jest dostępna w literaturze ani w bazach danych, w związku z tym sekwencjonowanie tych genów u badanych genotypów było prowadzone w oparciu o sekwencje cDNA gatunków pokrewnych: jagody leśnej (*Vaccinium myrtillus*) i truskawki (*Fragaria* $\times$ *ananassa*). Sekwencje cDNA genów *pds* tych gatunków uzyskano z baz danych Genome Database for Vaccinium i NCBI (National Center for Biotechnology Information). Na bazie tych sekwencji zaprojektowano startery do amplifikacji fragmentów genów *pds*, dla obu gatunków zaproponowano po 10 par starterów. Fragmenty uzyskane w reakcjach PCR na matrycy materiału genetycznego wyizolowanego z borówki i maliny zostały zsekwencjonowane w firmie komercyjnej, a następnie zanalizowane. W przypadku borówki wysokiej (genotyp 21A) zidentyfikowano sekwencję kodującą genu *pds* o długości 1429 pz, która obejmuje większość egzonów wraz z kodonem start. Poznana sekwencja wykazuje podobieństwo do sekwencji genu *pds* z jagody leśnej na poziomie 97,1%. Dla maliny właściwej (genotyp L-41) uzyskano sekwencję o długości 1020 pz, która obejmuje środkową i końcową część sekwencji kodującej. Podobieństwo uzyskanej sekwencji z sekwencją *pds* z truskawki wynosi 62%. Rozpoczęto prace nad zaprojektowaniem sekwencji sgRNA do mutagenazy genu *pds* oraz identyfikacją miejsc off-target dla obu genotypów. Dla każdego genotypu zaproponowano po 2 cząsteczki sgRNA. Cząsteczki sgRNA dla borówki znajdują się w obrębie pierwszego egzonu genu *pds*, a ryzyko efektu off-target obejmuje jedynie 2 inne sekwencje w genomie tego gatunku. W przypadku maliny, miejsca docelowe sgRNA znajdują się w dalszych rejonach genu *pds*, ale zaletą zaprojektowanych cząsteczek jest brak ryzyka efektów off-target.

Wymierne/trwale rezultaty realizacji zadania:

Uzyskano ustabilizowane kultury wybranych genotypów maliny właściwej i borówki wysokiej. Dla wybranych genotypów borówki wysokiej i maliny właściwej oceniono potencjał regeneracyjny eksplantatów na pożywkach o różnym składzie fitohormonów. Oceniono skuteczność jednostopniowej i 2-stopniowej metody trawienia ścian komórkowych do izolacji protoplastów maliny właściwej i borówki wysokiej. Wykazano skuteczność transformacji genotypu 17A borówki wysokiej i genotypu L-41 maliny właściwej genem reporterowym *gus* za pośrednictwem bakterii *Agrobacterium tumefaciens* zawierającej plazmid binarny pCambia1105.1r. Uzyskano sekwencje cDNA genu *pds* z borówki wysokiej (genotyp 21A) i maliny właściwej (genotyp L-41) oraz wstępnie zaprojektowano cząsteczki sgRNA do ukierunkowanej mutagenazy dla tych genotypów.

Działania upowszechnieniowo-promocyjne:

W 2025 nie prowadzono działań upowszechnieniowych i promocyjnych w ramach zadania.

Wykonanie miernika:

Mierniki na 2025 r. dla zadania 3.18:

1. liczba wytypowanych przez hodowców genotypów borówki wysokiej do badań nad uzyskaniem roślin NTG: plan: 2, wykonanie: 2
2. liczba wytypowanych przez hodowców genotypów maliny właściwej do badań nad uzyskaniem roślin NTG: plan: 3, wykonanie: 3
3. liczba testowanych typów eksplantatów: plan: 2, wykonanie: 2
4. liczba podjętych prób uzyskania protoplastów: plan: 3, wykonanie: 3
5. liczba wytypowanych genów docelowych do edycji u borówki wysokiej: plan: 1, wykonanie: 1
6. liczba wytypowanych genów docelowych do edycji u maliny właściwej: plan: 1, wykonanie: 1