

3.19. Wstępna optymalizacja systemu regeneracji, transformacji oraz procedury ukierunkowanej mutagenazy dla edycji genomów roślin drzewiastych (jabłoni, czereśni), z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas.

Kierownik zadania: dr inż. Sylwia Keller-Przybyłkiewicz

Cel zadania:

1. Opracowanie wydajnej metody regeneracji pędów przybyszowych wybranych genotypów jabłoni i czereśni z eksplantatów liściowych.
2. Ocena możliwości uzyskania protoplastów obu gatunków na potrzeby strategii bezwektorowej edycji genomu.
3. Ocena skuteczności wprowadzania edycji genów u wybranych roślin za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens*.
4. Wstępny wybór genów przeznaczonych do edycji w celu uzyskania roślin o pożądanych cechach agronomicznych.

Zakres rzeczowy zadania i przyjęte cele w 100% zrealizowano zgodnie z założeniami na 2025 rok.

Przygotowano kultury in vitro (zainicjowane z pąków wierzchołkowych / bocznych, a także łodyg i liści) roślin dwóch genotypów jabłoni (FR68 i Malus173, hodowli IO-PIB) i dwóch genotypów czereśni ('Tamara' i 'Regina'), które stanowiły źródło eksplantatów do regeneracji i ukierunkowanej mutagenazy. Współczynnik namnażania oszacowano odpowiednio: dla jabłoni 5-8 pędów, a dla czereśni od 2-5 pędów. Zoptymalizowano procedury regeneracji roślin obu gatunków poprzez wykorzystanie kombinacji: a) cytokinin (BA, TDZ) i auksyn (NAA, IBA, IAA). W przypadku jabłoni największe możliwości regeneracyjne odnotowano dla genotypu Malus173. W przypadku czereśni, mimo zastosowania dwóch innych auksyn IBA i IAA (0,1 mg/l) w kombinacji z TDZ lub BA regeneracja pędów nie przekroczyła 12%. b) antybiotyków: Cefotaksymu, karbeniciliny i higromycyny – zoptymalizowano najkorzystniejsze stężenie (500 mg/l). Zastosowanie higromycyny (5 mg/l), było toksyczne dla regenerowanych (nietransformowanych) eksplantatów liściowych jabłoni i czereśni (liście brązowiły i nie tworzyły kalusa). Antybiotyk ten wybrano do selekcji roślin NTG. Podjęto próby opracowania metody izolacji protoplastów komórkowych jabłoni i czereśni. Najlepsze efekty uzyskano po zastosowaniu roztworu enzymatycznego, który zawierał: 0.5% Driselase™ from Basidiomycetes sp., 0.25% Cellulase RS, 0.025% Pectolyase Y-23 - mieszaninę enzymów lizujących ścianę komórkową. Zastosowane 3 procedury nie spowodowały kompletnego strawienia ściany komórkowej i uwolnienia protoplastów, dlatego etap doczyszczania preparatów wymaga dopracowania. Przygotowano kompetentne komórki *A. tumefaciens* (zawierają plazmid pCAMBIA 1105.1), które wykorzystano do wprowadzania genu reporterowego gus.

W celu oceny skuteczności mutagenazy, eksplantaty roślinne umieszczono w roztworze zawierającym: X-Glc (10 mg w 200 µl DMSO); 0,1% Tritonu, 0,2M NaH₂PO₄ · H₂O, pH 4,0; 0,2M NaH₂PO₄, pH 9,0 (ostateczne pH 7,0) na około 12 h. Bazując na obserwacjach mikroskopowych, na blaszce liściowej/łodydze wytypowanych do badań roślin zaobserwowano niebieskie plamki - miejsca transformowanych komórek (ekspresja gus). Wytypowano geny docelowe, związanych z regulacją cech jakości owoców: jabłoni (UFGT koduje flavonoid-3-O-glucosyltransferazę – uczestniczy w szlaku biosyntezy antocyjanów) i czereśni (Aktyna – uczestniczy w stabilizacji cytoszkieletu komórkowego i odpowiada za jędrność tkanek). Zaprojektowano zarówno oligonukleotydy umożliwiające monitorowanie aktywności genów oraz sekwencje sgRNA do 'nockoutu' genów docelowych. Synteza konstruktów zawierających ww. sekwencje docelowe będzie przeprowadzona przez firmę zewnętrzną.

W ramach zadania 3.19 w 2025 r. wykonano następujące prace:

1) dobór roślinnego materiału do badań i inicjacja kultur in vitro oraz optymalizacja metody regeneracji wybranych genotypów jabłoni i czereśni z eksplantatów liściowych;

Z roślin wybranych dwóch genotypów jabłoni (FR68 i Malus173, hodowli IO-PIB) i dwóch genotypów czereśni (odmiany 'Tamara' i 'Regina') zainicjowano kultury in vitro (użyto pąki wierzchołkowe/boczne oraz liście), które stanowiły źródło eksplantatów do regeneracji i transformacji.

a) Inicjacja kultur – optymalizacja składu pożywek:

Pobrane eksplantaty, poddano sterylizacji powierzchniowej i wykładano na stałą pożywkę inicjalną o składzie: - **jabłoń:** ½ MS (Murashige i Skoog 1962) 30 g/l sacharozy, 10 mg/l inozytolu, 1 mg/l BAP,

1 mg/l IBA, 1 mg/l GA3, 8,7 g/l agaru Bacto oraz zestaw witamin z WPM (Lloyd & McCown). - **czereśnia:** ½ MS (Murashige i Skoog 1962).

Ustabilizowane kultury, przenoszono na pożywkę do namnażania: - **jabłoń:** pożywka podstawowa MS z dodatkiem regulatorów wzrostu: BAP – 1,0 mg/l, IBA - 1,0 mg/l i GA3 – 1,0 mg/l, sacharoza 30g/l (lub BAP - 0,8 mg/l, IBA - 0,1 mg/l, GA3- 0,1 mg/l), środek żelujący - 8,7 g/l (Agar Bacto), - **czereśnia:** sole MS oraz regulatory wzrostu: BAP - 0,8 mg/l, IBA - 0,01 mg/l, GA3 - 0,5 mg/l, sacharoza - 20 g/l, środek żelujący: 7,5 g/l (Plant Agar).

Kultury umieszczono w fitotronie (16 godzin oświetlenia i w temperaturze ok. 21±2°C). Następnie pędy o najwyższej żywotności, pasażowano co 3-4 tygodnie.

b) Ocena wpływu auksyn i cytokinin na zdolności regeneracyjne wybranych genotypów jabłoni i czereśni.

W tym celu pędy (obu gatunków) hodowano na podstawowym podłożu do namnażania z dodatkiem tidiazuronu (TDZ) lub 6-benzyloaminopuryny (BA), (1 mg/l). Zastosowano również kwas giberelinowy (GA3) i kwas indolilo-3-masłowy (IBA).

Z ustabilizowanych kultur pobierano trzeci i czwarty najmłodszy liść i hodowano na podłożu indukcyjnym w równoległych eksperymentach tj. w ciemności oraz przy oświetleniu białym.

W tych eksperymentach, wykorzystano podłoże uzupełnione regulatorami wzrostu roślin (PGR),

- dla jabłoni: TDZ (1 mg/l) lub BA (4 mg/l) w połączeniu z kwasem 1-naftylooctowym (NAA) (0,5 mg/l),

- dla czereśni: TDZ (1 mg/l) lub BA (2 mg/l) w połączeniu z kwasem 1-naftylooctowym (NAA) (0,1 mg/l).

c) Ocena stopnia regeneracji roślin jabłoni i czereśni

I. Regeneracja wytypowanych genotypów jabłoni:

Dla genotypu Malus173, doświadczenia prowadzono na dwóch podłożach MS (Murashige i Skoog, 1962) i WPM (Lloyd and McCown., 1980) - odmienny skład soli mineralnych.

Następnie, w celu regeneracji eksplantaty liści z kalusem hodowano na pożywce zawierającej BA (0,5 mg/l), GA3 (0,5 mg/l) i IBA (0,1 mg/l), sacharoza 30 g/l, fotoperiod 16/8 godzin. Zastosowanie tidiazuronu (TDZ) miało istotny wpływ na zwiększenie liczby pędów uzyskanych z 1 eksplantatu. Średnia liczba pędów przybyszowych uzyskana dla jednego eksplantatu w ciemności i na świetle (8 tyg.) wyniosła odpowiednio: 10,12 i 9,88. W przypadku zastosowania BA w pożywce zdolność do regeneracji wykazało 92% pędów w ciemności i 68% pędów na świetle.

W przypadku genotypu FR68 najlepszym okazało się podłoże (MS) wzbogacone o 1 mg TDZ. Odsetek indukowanych pędów wynosił odpowiednio w ciemności 64%, a na świetle - 52%. Dla FR68 48% pędów (6,00 pędu) podjęło organogenezę na pożywkach z BA w ciemności, podczas gdy na świetle 12% (1,33 pędu).

Porównywano wpływ auksyn: NAA, IBA oraz kwasu indolilo-3-octowego (IAA) w stężeniach 0,5 mg/l na możliwości regeneracyjne genotypów jabłoni- rosnących w ciemności na pożywkach MS z 1 mg TDZ lub 4 mg/l BA.

Dla genotypu Malus173 odsetek zregenerowanych eksplantatów na pożywce z TDZ w ciemności wynosił 100 % (10,12 i 9,12 pędu), natomiast na pożywce z IBA - 84% (8,05 pędów). W przypadku genotypu FR68, zastosowanie IBA wykazało najslabszy wpływ na regenerację pędów przybyszowych.

Wnioski:

1. Zdolność i intensywność regeneracji była zależna od genotypu badanych roślin jabłoni, typu pożywki, rodzaju użytych regulatorów wzrostu, ich stężenia, od temperatury i światła. Ważny był także rodzaj eksplantatu, jego wiek i pochodzenie.
2. Eksplantaty badanych roślin wykazały zróżnicowaną reakcję na zastosowane hormony roślinne. Największe możliwości regeneracyjne odnotowano dla genotypu Malus173.

II. Regeneracja wytypowanych genotypów czereśni

W przypadku, wytypowanych do badań dwóch genotypów czereśni, regeneracja przeprowadzona z eksplantatów liściowych okazała się mało wydajna. Zastosowanie zarówno TDZ jak i BA skutkowało inicjacją tkanki kalusowej po 4 tygodniach kultury (100% eksplantatów z kalusem), jednak tylko z

pojedynczych liści udało się uzyskać zregenerowane pędy. Eksplantaty liści z kalusem i regenerującymi pędami hodowano na pożywce regeneracyjnej zawierającej: BA (0,5 mg/l), i GA3 (0,5 mg/l) i IBA (0,01 mg), sacharozę 20 g/l, a następnie na standardowej pożywce do namnażania z fotoperiodem 16/8 godzin. Odsetek eksplantatów tworzących kalus na WPM wynosił 100% na MS 18% (liście żółkły).

Odnotowano także korzystniejszy wpływ zastosowania TDZ na zwiększanie liczby pędów uzyskanych z 1 eksplantatu.

W przypadku odmiany 'Tamara' najlepszy stopień zregenerowanych pędów uzyskano dla pożywki WPM wzbogaconej w TDZ (1 mg/l) i NAA (0, 1 mg/l) oraz warunków wzrostu w ciemności - 16% zregenerowanych pędów, z kolei 8% na świetle.

Dla pędów odmiany 'Regina' rosnących w warunkach ciemności uzyskano odpowiednio 12% zregenerowanych pędów. W warunkach oświetlenia odsetek eksplantatów nie przekroczył 8%.

Wnioski:

1. Mimo zastosowania dwóch auksyn IBA i IAA (0,1 mg/l) w kombinacji z TDZ lub BA regeneracja pędów dwóch odmian czereśni nie przekroczyła 12%.

2. Doświadczenia nad kulturami, prowadzonymi z liści czereśni, na pożywkach z cytokininami (BA, TDZ) i auksynami (NAA, IBA, IAA) skutkowało wysoką indukcją tkanki kalusowej, jednak próba wzbudzenia powstania organów przybyszowych poprzez pasażowanie jej na świeżą pożywkę regeneracyjną spowodowała zmniejszenie żywotności tej tkanki i jej słaby wzrost (tkanka brązowieła).

d) Ocena wpływu antybiotyków (niezbędne do selekcji roślin uzyskanych w wyniku ukierunkowanej mutagenazy) na wzrost i zdolności regeneracyjne wybranych genotypów jabłoni i czereśni

Celem badań była ocena wpływu antybiotyków cefotaksymu i karbenicyliny zastosowanych w stężeniach 100 - 500 mg/l oraz higromycyny w stężeniach 5 - 60 mg/l na regenerację dwóch odmian czereśni i jabłoni oraz wybór najlepszej kombinacji antybiotyków do zastosowania w etapie ukierunkowanej mutagenazy.

Wnioski:

1. Cefotaksym i karbenicilina w zastosowanych stężeniach z różnym skutkiem wpływały na szybkość regeneracji badanych roślin.

2. Cefotaksym w stężeniu 500 mg/l wybrano do kontrolowania wzrostu *Agrobacterium* po eksperymentach kokulturywacji kultur in vitro.

3. Cefotaksym w stężeniu 100-300 mg/l umożliwiał regenerację liści, a także sprzyjał wydłużaniu pędów.

Stężenie higromycyny 5 mg/l było toksyczne dla regenerowanych (nietransformowanych) eksplantatów liściowych jabłoni i czereśni (liście brązowieły i nie tworzyły kalusa)

Wniosek: W dalszym etapie badań higromycyna będzie użyta do selekcji pędów.

2) opracowanie metodyki uzyskiwania protoplastów komórkowych z materiału roślinnego jabłoni i czereśni;

Na początkowym etapie badań przetestowano metodę jednostopniową, w której materiał roślinny (liście z 2-tygodniowych kultur in vitro, jabłoni i czereśni) został umieszczony w roztworze enzymatycznym, trawiącym ścianę komórkową, który zawierał: 1% Cellulase Onozuka R10, 0.1% Pectolyase Y-23, 0.6 M Mannitolu, 20 mM buforu MES oraz 5 mM MgCl₂ x 6H₂O. W wyniku tej metody nie otrzymano uwolnionych żywotnych protoplastów. Dalsze prace nad optymalizacją metodyki obejmowały trawienie ściany komórkowej z udziałem różnych enzymów celulolitycznych i pektynolitycznych oraz oczyszczanie uzyskanych protoplastów z resztek niestrawionych tkanek.

a) Metoda podstawowa (kilkustopniowa) izolacji protoplastów z roślin

W podstawowej metodzie izolacji protoplastów (z modyfikacjami własnymi), liście badanych roślin jabłoni oraz czereśni inkubowano (wytrząsając 50 obr./min.) w roztworze enzymatycznym o następującym składzie: 2% Cellulase Onozuka R10, 0.5% Macerozyme R-10, 0.6 M Mannitol, 20 mM bufor MES oraz 5 mM MgCl₂ x 6H₂O (przez noc) w ciemności w temperaturze 26°C. Zawiesinę uwolnionych protoplastów przefiltrowano przez filtry komórkowe o średnicy porów 100 µm. I odwirowano (1000 obr./5 min.). Uzyskany osad rozdzielano w układzie dwufazowym składającym się z roztworu różnicującego – Sacharoza/MES (dolna warstwa, skład: 0.5M sacharoza, 1 mM bufor MES)

oraz roztworu myjącego W5 (górna warstwa, skład: 154 mM NaCl, 125 mM CaCl₂ x 2H₂O, 5 mM KCl, 5 mM glukoza). W końcowej fazie uzyskaną zawiesinę protoplastów umieszczono w pożywce CPP (skład: baza pożywki Kao&Michayluk, mikro- i makroelementy, hormony w zależności od wydajności izolacji protoplastów). Ustalono gęstość protoplastów na poziomie 8×10^5 w 1 ml pożywki płynnej (komora Fuchsa-Rosenthala) oraz przeprowadzono ocenę żywotności za pomocą barwienia błękitem trypanu (4% Trypan Blue, Sigma). Następnie kulturę protoplastów prowadzono w ciemności w temperaturze 26°C.

b) Izolacja protoplastów z zastosowaniem dwóch enzymów lizujących ścianę komórkową

Po przeprowadzeniu izolacji z zastosowaniem dwóch enzymów: Cellulase Onozuka R10 oraz Macerozyme R-10, otrzymano częściowe uwolnienie protoplastów ze struktur komórkowych. Zastosowanie w metodzie mieszanki ww. enzymów u obu gatunków nie spowodowało całkowitego usunięcia niestrawionych fragmentów ściany komórkowej, dlatego w następnej próbie izolacji protoplastów zastosowano kombinację trzech enzymów trawiących ścianę komórkową.

c) Izolacja protoplastów z zastosowaniem trzech enzymów lizujących ścianę komórkową

W celu poprawienia wydajności metody izolacji protoplastów skolekcjonowane liście jabłoni oraz czereśni dodatkowo potraktowano roztworem enzymatycznym o następującym składzie: 0.5% Driselase™ from Basidiomycetes sp., 0.25% Cellulase RS, 0.025% Pectolyase Y-23, 0.6 M Mannitol, 20 mM bufor MES oraz 5 mM MgCl₂ x 6H₂O. Uzyskano znacznie lepsze wyniki izolacji żywotnych protoplastów wyizolowanych z badanych genotypów jabłoni, jednak nadal zanotowano ślady niestrawionych tkanek. Dla czereśni odnotowano większą liczbę żywotnych protoplastów, co świadczy o skuteczniejszym działaniu ww. mieszanki enzymatycznej na struktury komórkowe tego gatunku. Dalsza optymalizacja procedury obejmować będzie skuteczne usuwanie pozostałości niestrawionych tkanek w przygotowanych preparatach protoplastów. Uzyskanie protoplastów o wysokiej czystości, bez fragmentów niestrawionych tkanek, będzie istotne w trakcie procesu regeneracji pędów na pożywkach regeneracyjnych.

3) ocena skuteczności wprowadzenia konstruktu edytującego wybranych roślin jabłoni i czereśni poprzez identyfikację genu reporterowego gus;

Przygotowano komórki bakteryjnego szczepu *Agrobacterium tumefaciens* (zawierają plazmid/konstrukt pCAMBIA 1105.1 - wykorzystany w procesie wprowadzania do uzyskanych roślinnych kultur komórkowych genu reporterowego gus).

W ramach prac prowadzono:

a) Przygotowanie bakterii do transformacji

Metodyka transformacji za pośrednictwem *Agrobacterium* obejmuje:

- (1) kokultywację - umieszczenie eksplantatów w zawieszynie bakterii,
- (2) odpłukanie bakterii z zawieszyny,
- (3) umieszczenie eksplantatów na pożywce z antybiotykiem w celu eliminacji kultur bakterii,
- (4) umieszczenie eksplantatów na podłożu z odpowiednim czynnikiem selekcyjnym,
- (5) regeneracja roślin, w warunkach selekcyjnych.

Transformację genetyczną eksplantatów jabłoni i czereśni wykonano w zawieszynie bakteryjnej (pożywka LB) o gęstości optycznej (OD) równej 0,35 z dodatkiem acetosyringonu w stężeniu 200 µM.

b) Inokulacja i kokultywacja eksplantatów roślinnych

Użyto 45- 50 eksplantatów liściowych/fragmentów łodyg z każdego genotypu czereśni i jabłoni. Próby moczone w zawieszynie bakterii z acetosyringonem przez 3 min., a następnie osuszano na sterylnej bibule i umieszczano na pożywce regeneracyjnej również z acetosyringonem. Kokultywację eksplantatów z bakteriami oraz regenerację eksplantatów z roślin kontrolnych (nietransformowanych) prowadzono w ciemności. Pożywka regeneracyjna dla jabłoni: zawierała sole mineralne i witaminy z pożywki MS (Murashige i Skoog, 1962) z dodatkiem 1 mg/l TDZ i 0,5 mg/l NAA; dla czereśni - sole mineralne i witaminy z pożywki WPM (Lloyd and McCown. 1980), 1 mg/l TDZ i 0,1 mg/l NAA.

c) Selekcja i regeneracja

Eksplantaty płukano przez 15 minut w roztworze sterylnej wody z dodatkiem 500 mg/l cefotaksymu, osuszano na bibule i przenoszono na pożywkę regeneracyjną z dodatkiem 250 mg cefotaksymu. Cefotaksym eliminował bakterie *A. tumefaciens* z kultur in vitro. Przez pierwszy tydzień kultury prowadzono w ciemności. Po tym czasie eksplantaty przeniesiono na pożywkę regeneracyjną zawierającą 250 mg/l cefotaksymu i 2 mg/l higromycyny (stanowiła czynnik selekcyjny, punkt 1, ppkt. d). Prowadzone są obserwację pojawienia się tkanki kalusowej, jej wzrostu oraz oceniany jest rozwój nowych pędów.

d) Ocena uzyskanych transformatów i skuteczności transformacji.

Po 7 – 10 dniach prowadzenia kultur badanych roślin wykonano test gus (β -glucuronidase) (kaseta pCAMBIA *A. tumefaciens* zawiera sekwencje operonu genu gus i sekwencje gus). Eksplantaty umieszczono w roztworze zawierającym: X-Glc (10 mg w 200 μ l DMSO); 0,1% Tritonu oraz NaH_2PO_4 na około 12 h. Następnie płukano je etanolem, celem umożliwienia ekspozycji barwnej reakcji ekspresji genu gus.

Bazując na obserwacjach mikroskopowych na blaszce liściowej/lodydze zarówno u dwóch odmian czereśni jak i jabłoni zaobserwowano niebieskie plamki - miejsca transformowanych komórek (ekspresja gus) wytypowanych do badań roślin.

Wniosek: Uzyskane wyniki potwierdziły skuteczność metody wprowadzenia do tkanek roślin NTG genu reporterowego gus, w kolejnym etapie rośliny uzyskane w wyniku ukierunkowanej mutagenazy będą poddane regeneracji do uzyskania produktu z cechą markerową (umożliwiającą monitorowanie uzyskanych roślin).

4) wybór genów przeznaczonych do edycji.

Na podstawie literatury, dostępnych baz danych (w tym dla jabłoni z bazy PGIHRS IO-PIB, zgromadzonej z sekwencjonowania transkryptomów *Malus*) wytypowano docelowe geny związane z regulacją cech jakości owoców jabłoni i czereśni.

W przypadku jabłoni wybrano gen MdUFGT (dla którego zaprojektowano sekwencje oligonukleotydów (PrimerPRO3); Forward: 5'-GTT GGC GAG TTC ATG TCT CC-3'; Reverse: 5'-AAT CCC CAC CAA GTT CAT CC-3', przydatnych do identyfikacji i monitoringu aktywności genu. Wytypowany gen koduje flavonoid-3-O-glucosyltransferazę, która uczestniczy w szlaku biosyntezy antocyjanów oraz warunkuje wybarwianie struktur roślinnych na kolor czerwony. Wytypowany gen pozwoli na monitorowanie zregenerowanych komórek jabłoni (zawierających sekwencje wybranego genu) poprzez ocenę stopnia ich wybarwienia, wynikającego z kumulacji antocyjanów w tkance roślin uzyskanych dzięki NTG.

W przypadku czereśni wytypowano gen aktywny (o znanych sekwencjach) PacACT1 (dla którego zaprojektowano sekwencje oligonukleotydów (PrimerPRO3): forward; 5'-ATGGTGAGGATATTCAACCC-3'; reverse 5'-CTTCCTGTGGACAATGGATGG-3'), PacACO1 (forward 5'-TYYTNAARCAYYTNCNGT-3'; reverse 5'-NGGYTCYTTNGCYTGRAA-3') przydatne do monitoringu obecności i aktywności genu aktywny – odgrywa szczególne znaczenie w zachowaniu stabilności szkieletu komórkowego, poprzez regulację oddziaływań pomiędzy subdomenami poszczególnych protomerów w filamencie.

Dla wytypowanych sekwencji zaprojektowano cząsteczki sgRNA (single guide RNA). W tym celu wykorzystano program <http://wmd3.weigelworld.org/>.

Zaprojektowane sekwencje przewodnikowego gRNA, wprowadzone będą do plazmidu pCAMBIA.

Wyjazdy zagraniczne:

- W terminie 1-12.12.2025 r. dr Danuta Wójcik oraz mgr Agnieszka Walencik uczestniczyły w szkoleniu z zakresu wykorzystania metod ukierunkowanej mutagenazy drzewiastych roślin sadowniczych. Szkolenie przeprowadzone zostało przez pracowników Instytutu Julius Kühn, Drezno-Pilnitz, Niemcy, (koszt szkolenia zaplanowano w zadaniach 3.18, 3.19). Szkolenie pozwoliło na poszerzenie wiedzy oraz uzyskanie doświadczenia w zakresie opracowania skutecznych metod uzyskiwania roślin NTG. Skolekcjonowane w trakcie szkolenia procedury będą sukcesywnie

adoptowane do warunków laboratoryjnych IO-PIB podczas uzyskiwania roślin o ulepszonych cechach agronomicznych roślin sadowniczych. Podczas wyjazdu uczestniczki nawiązały cenne kontakty z ekspertami w dziedzinie hodowli roślin z wykorzystaniem innowacyjnych technologii genomowych.

3. Wymierne/trwałe rezultaty realizacji zadania:

Przeprowadzono szeroko zakrojone prace obejmujące optymalizacje metod: uzyskiwania, namnażania, regeneracji roślin jabłoni i czereśni w warunkach in vitro, procedury izolacji protoplastów (do bezwektorowej mutagenyzy wytypowanych do badań roślin), skuteczności wprowadzania genu reporterowego gus. Opracowana metodyka w kolejnych latach realizacji zadania pozwoli na skuteczne i efektywne uzyskiwania roślin zawierających, wytypowane do edycji, geny docelowe.

Działania upowszechnieniowo-promocyjne:

Nie prowadzono działań upowszechnieniowo-promocyjnych.

Z uwagi na wieloletni charakter badań (w pierwszym roku realizacji zadania prowadzono prace obejmujące głównie optymalizację metod uzyskiwania roślin NTG), po uzyskaniu wstępnych wyników / efektów regeneracji roślin obu gatunków z wprowadzonym genem reporterowym gus, w kolejnych latach realizacji zadania podjęta zostanie próba upowszechnienia metod systemu regeneracji roślin NTG.

4. Wykonanie miernika:

Mierniki na 2025 r. dla zadania 3.19.:

1. liczba testowanych genotypów jabłoni: plan 2, wykonanie 2
2. liczba testowanych genotypów czereśni: plan 2, wykonanie 2
3. liczba podjętych metod uzyskania protoplastów: plan 3, wykonanie 3
4. liczba wytypowanych genów jabłoni przeznaczonych do edycji: plan 1, wykonanie 1
5. liczba wytypowanych genów czereśni przeznaczonych do edycji: plan 1, wykonanie 1