



Wstępne badania nad opracowaniem metodyki transformacji genetycznej i edycji genomu z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas9 u maliny właściwej (*Rubus idaeus* L.)

Wstęp

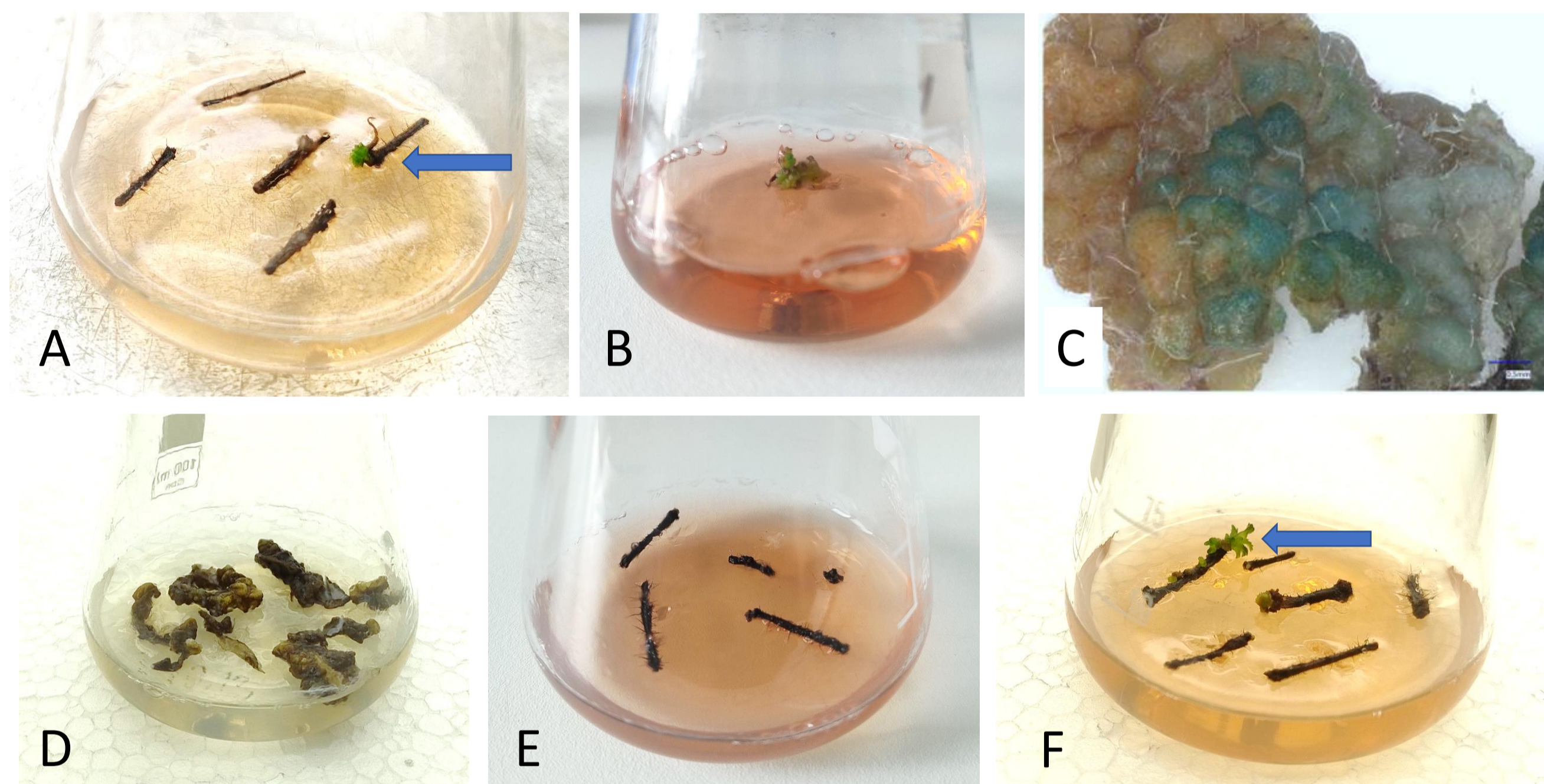
Malina właściwa (*Rubus idaeus* L.) jest ważnym gospodarczo gatunkiem uprawianym komercyjnie w Polsce. Według danych FAOSTAT, Polska z produkcją wynoszącą ok. 100 tys. ton rocznie zajmuje piąte miejsce na świecie i pierwsze w Europie wśród producentów tych owoców. Hodowla maliny właściwej realizowana była przez wiele lat w Sadowniczym Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Ogrodnictwa w Brzeznej, a od roku 2014 prowadzona jest także w Zakładzie Hodowli Roślin Ogrodniczych IO-PIB w Skierniewicach. Obecnie odmiany malin hodowli IO-PIB dostarczają około 2/3 całkowitej produkcji malin w Polsce. Wyzwania stojące przed hodowcami roślin jagodowych to przede wszystkim uzyskanie nowych odmian, łączących w sobie pożądane cechy takie jak odporność na choroby, wysoka jakość owoców (w tym zawartość związków prozdrowotnych) oraz ich długa trwałość pozbiorcza. Rozwój metod inżynierii genetycznej, w tym techniki edycji genomu z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas, umożliwia precyzyjne modyfikacje genów odpowiedzialnych za wyżej wymienione cechy, co daje nowe możliwości w hodowli roślin uprawnych.



Celem prezentowanych badań jest opracowanie metodyki transformacji genetycznej za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens* oraz edycji genomu z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas9 u maliny właściwej. Do badań wytypowano dwa klonu hodowlane maliny właściwej (*Rubus idaeus* L.) o symbolach L-15 i L-41, pochodzące z programu hodowlanego Zakładu Hodowli Roślin Ogrodniczych IO-PIB w Skierniewicach.

Transformacja maliny genem reporterowym *gus*

- Do transformacji użyto szczepu *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 niosącego plazmid binarny pCambia1105.1r. z genem reporterowym *gus*, kodującym β-glukuronidazę.
- Próbie transformacji poddano 2 rodzaje eksplantatów: blaszki liściowe i ogonki liściowe maliny pochodzące z pędów z ustabilizowanych kultur *in vitro*.
- Eksplantaty inokulowano w zawiesinie bakteryjnej o gęstości optycznej (OD) równej 0,35 z dodatkiem acetosyringonu w stężeniu 200 μM, przez 3 minuty.
- Kokultywację prowadzono przez 3 doby w ciemności, na pożywce MS zawierającej 0,5 mg L⁻¹ TDZ i 200 μM acetosyringon.
- Po kokultywacji eksplantaty płukano w roztworze antybiotyku cefotaksym w stężeniu 500 mg L⁻¹, a następnie wykładano na pożywkę regeneracyjną* zawierającą 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 (antybiotyk selekcyjny).
- Ocenę skuteczności transformacji komórek roślinnych prowadzono na podstawie analizy aktywności enzymu β-glukuronidazy metodą histochemiczną w reakcji z X-Gluc.
- Pozytywny efekt transformacji uzyskano dla genotypu maliny L-41. Reakcja histochemiczna potwierdziła ekspresję genu *gus* w tkankach transformowanych eksplantatów liściowych tego klonu, a na ogonkach liściowych uzyskano kultury kalusa aktywnie rosnącego na pożywce z dodatkiem antybiotyku selekcyjnego uzyskano. Transformacja blaszek i ogonków liściowych genotypu L-15 dotychczas się nie powiodła.

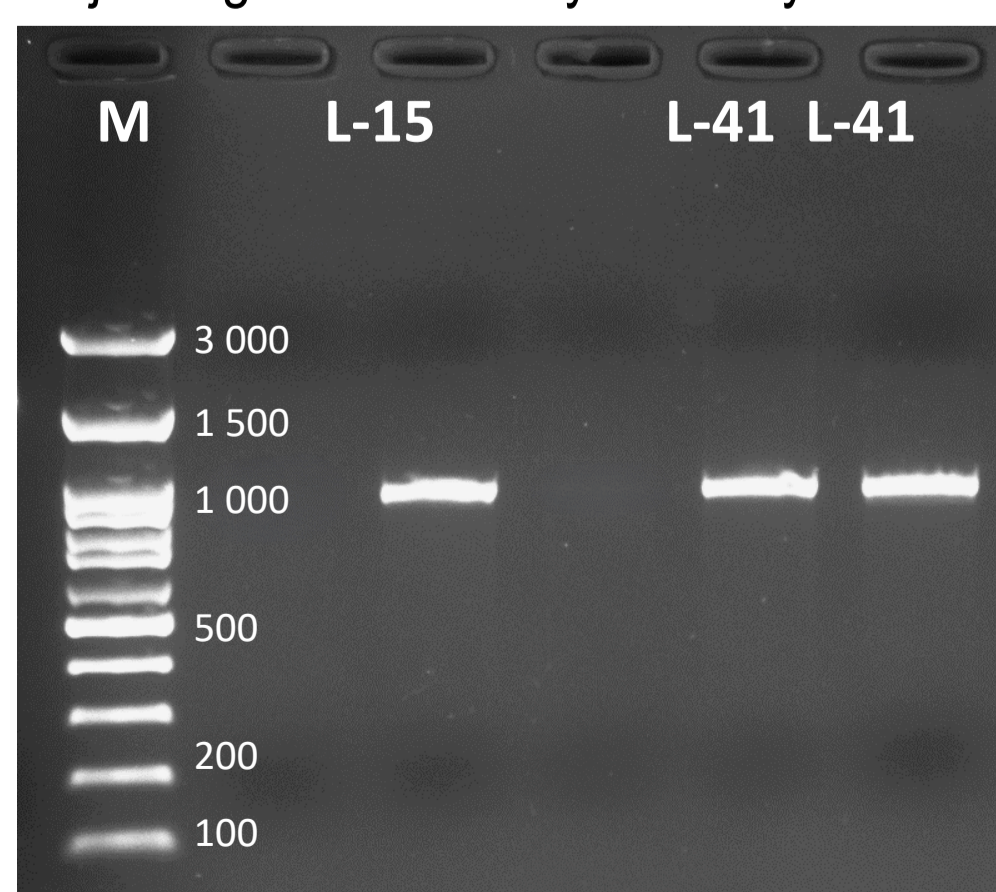


RYS. 1. Kalus uzyskany po transformacji ogonków liściowych genotypu L-41, rozwijający się na pożywce selekcyjnej (A i B); aktywność β-glukuronidazy w tkankach maliny L-41 (C); transformowane blaszki liściowe (D) i ogonki liściowe (E) maliny zamierające na pożywce selekcyjnej; pędy regenerujące z ogonków liściowych w kombinacji kontrolnej (F).

Badania nad optymalizacją pożywek regeneracyjnych dla maliny właściwej prezentowane są na plakacie Wojtania A. i in. „Ocena potencjału regeneracyjnego wybranych genotypów maliny właściwej (*Rubus idaeus* L.).”

Edycja genu desaturazy fitoenuowej (*pds*)

- Do edycji u maliny właściwej wybrano gen *pds* kodujący desaturazę fitoenuową (phytoene desaturase), enzym zaangażowany w biosyntezę karotenoidów, który jest genem markerowym powszechnie wykorzystywanym podczas opracowywania systemu edycji genomów roślinnych. Nokaut tego genu prowadzi do uzyskania fenotypu albinotycznego związanego z brakiem chlorofilu, co ułatwia odróżnienie zmodyfikowanych genetycznie roślin.
- Zaprojektowano startery komplementarne do sekwencji wyjściowej genu *pds* dla maliny, uzyskanej z bazy danych GDR (Genome Database for Rosaceae) i zamplifikowano początkowy fragment sekwencji genu *pds* z obu genotypów.
- Zamplifikowany fragment genu *pds* wklonowano do plazmidu pGEM-T® Easy, a następnie zsekwencjonowano. Uzyskana sekwencja ma długość 676 pz i obejmuje dwa pierwsze egzony (259 pz i 133 pz) i 2 introny (83 pz i 186 pz). Podobieństwo sekwencji uzyskanych z obu genotypów wynosi 99,0%.
- Zaprojektowano 5 cząsteczek sgRNA (single guide RNA), znajdujących się w obrębie 1 i 2 egzonu genu *pds*, wspólne dla obu klonów hodowlanych maliny oraz wykonano analizę występowania miejsc off-target dla tych cząsteczek (CRISPR RGEN Tools: Cas-Designer i Cas-OFFinder), która wykazała brak takich miejsc w genomie maliny dla wszystkich zaprojektowanych cząsteczek.



RYS. 2. Fragmenty genu *pds* z dwóch genotypów maliny właściwej (L-15 i L-41) zamplifikowane z użyciem starterów uniwersalnych M13 po wklonowaniu do plazmidu pGEM-T Easy; M - marker wielkości DNA (100 pz).

TAB. 1. Cząsteczki sgRNA zaprojektowane do mutagenyzy genu *pds* maliny właściwej.

Lp.	Sekwencja	Nić	%GC	On-score	Liczba miejsc off-target
Egzon 1					
1.	CGTAGTGGGCAATGGAGAAATGG	-	50	71,2	0
2.	GTTTATGAGGTTCAAGTTGGTGG	-	40	71,8	0
3.	AACGAGAGTGCAGTGCTTTGTGG	-	50	70,3	0
Egzon 2					
4.	CGGCTTAGTTGGGCGAGAAGAGG	-	60	67,5	0
5.	CAACCTCAACGGCTTAGTTGGG	-	45	82,8	0

ATGTGTCCGTCCAACCACCACTATCTCGCCACTCACGCACCATTAAAGCTCCATTTCTCCAT
TGCCCACTACGTTGTTTCGATAAAATGTCGCAGTGGGCTTGTGTCTCTGTCACCAACTTGAACC
TCATAAACACCCAAAATCCACAAAGCACTGCCTCTCGTTTCATGGCAGTGAGATTGTTGCT
CGCAATTTGAGATTTCTGGGCTCACAAGTTCTCTTGGTAAAAGGCCGAGGAAGGGTGTCT
CCCTTTGAAGGTTTgTTTcttcttcttcaagtatgctgtagctgtagattgttaaaaatgg
gaattaatttgtttcatttgtgatgatataggTGGTTTGTGTGGATTATCCAAGACCGGAGC
TTGATAATACTGTAAATTTCTTAGAAGCTGCGTACTTGTCTTCTCTTTCCGAACTCTTCT
CGCCCAACTAAGCCGTTGAAGGTTGTGATTGCTGGTGCAGGtgattgtaataagacaacttgt
cattatTTTTtagaaccttgaattgggttcatTTTatcttctggctataagcacataatt
atgcttgtgtaataatgaaccagaattttaggggttactgaatttacaatttctctttaa
ttatgtgcttctcctatgattaaatgcggaatttgcaggTTTGGCTGGGTTGTC

RYS. 3. Sekwencja fragmentu genu *pds* maliny właściwej (genotyp L-15), obejmująca 2 pierwsze egzony i 2 introny oraz lokalizacja zaprojektowanych cząsteczek sgRNA.