Optymalizacja sytemu transformacji genetycznej oraz wybór genu do edycji dla uzyskania roślin jabłoni o pożądanych cechach.

Sylwia Keller-Przybyłkowicz, Justyna Góraj-Koniarska, Aleksandra Trzewik, Maria Burian, Agnieszka Marasek Ciołakowska, Danuta Wójcik

Instytut Ogrodnictwa Państwowy Instytut Badawczy, ul Konstytucji 3go Maja 1/3, 96-100 Skierniewice.
E-mail: sylwia.keller@inhort.pl

Polska jest największym w Unii Europejskiej (3,4 mln ton) i czwartym na świecie producentem owoców jabłoni. Wzrost spożycia jabłek i ich przetworów oraz wprowadzenie do produkcji innowacyjnych odmian niosących pożądane cechy poprawi szanse zagospodarowania tak dużej produkcji. Rozwój nowych technik, takich jak CRISPR/Cas, daje możliwości precyzyjnej edycji genów i doskonalenia cech użytkowych tego gatunku.

Celem badań było opracowanie skutecznej metody edycji genomów dwóch genotypów jabłoni FR68 i Malus173 (kolekcja IO-PIB) zróżnicowanych pod względem zawartości prozdrowotnych antocyjanów w tkankach wegetatywnych i owocach (w kulturach in vitro odpowiednio wytwarzają pędy zielone i brunatne) oraz wybór genu do edycji przy użyciu systemu CRISPR/Cas. Prace obejmowały: 1.Opracowanie wydajnej metody regeneracji pędów przybyszowych wybranych genotypów jabłoni 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.

Materiały do analiz i zakres realizowanych badań.

Badania przeprowadzono dla dwóch genotypów jabłoni FR68 i Malus173 (hodowli IO-PIB), które stanowiły źródło eksplantatów liściowych do regeneracji i transformacji *in vitro*.

Opracowanie wydajnej metody regeneracji roślin jabłoni przydatnych do ukierunkowanej mutagenezy.

ETAP I: Inicjacja kultur – optymalizacja składu pożywek:

Do inicjacji kultur użyto pąki wierzchołkowe/boczne.
Zastosowano pożywkę o składzie
½ MS (Murashige i Skoog 1962)
30 g/l sacharozy, 10 mg/l inozytlou,
1 mg/l BAP,
1 mg/l IBA,
1 mg/l GA3,
8,7 g/l agaru Bacto
zestaw witamin z WPM (Lloyd &McCown).
Ustabilizowane kultury, przenoszono na pożywkę MS z dodatkiem regulatorów wzrostu:
BAP – 1,0 mg/l, / 0,8 mg/l,
IBA - 1,0 mg/l / 0,1 mg/l,
GA3 – 1,0 mg/l / 0,1 mg/l,
sacharoza 30g/l ,
8,7 g/l (Agar Bacto).

Tab. 1 Wpływ TDZ lub BA użytych w pożywce kondycjonującej lub indukcyjnej na regeneracje liści dwóch odmian jabłoni po 4 tygodniach kultury na pożywce indukcyjnej i po 8 tygodniach regeneracji, w pożywce kondycjonującej zarówno TDZ jak i BA użyto w stężeniu 1mg/l; w pożywce indukcyjnej stężenie TDZ i BA wynosiło odpowiednio 1 mg/l i 4 mg/l z **IBA 0,5 mg/l.**

Obecność TDZ lub BA	Malus173	FR68	Malus173	FR68
Pożywka kondycjonująca / pożywka indukcyjna	Eksplantaty formujące kalus lub pędy % (po 4 tyg.)		Liczba pędów na eksplantat (po 8 tyg.)	
TDZ / TDZ	100	100	7,52bc	0,88a
BA / TDZ	100	100	8,05c	1.28a
TDZ / BA	100	100	2,16a	0.84a
BA / BA	100	100	5,92b	1.16a

Oceniono wpływ auksyn i cytokinin na zdolności regeneracyjne **TDZ** (1 mg/l) lub **BA** (4 mg/l) w połączeniu z **NAA** (0,5 mg/l).

ETAP II: Ocena wpływu antybiotyków (niezbędne do selekcji roślin uzyskanych w wyniku ukierunkowanej mutagenezy) na wzrost i zdolności regeneracyjne wybranych genotypów jabłoni.

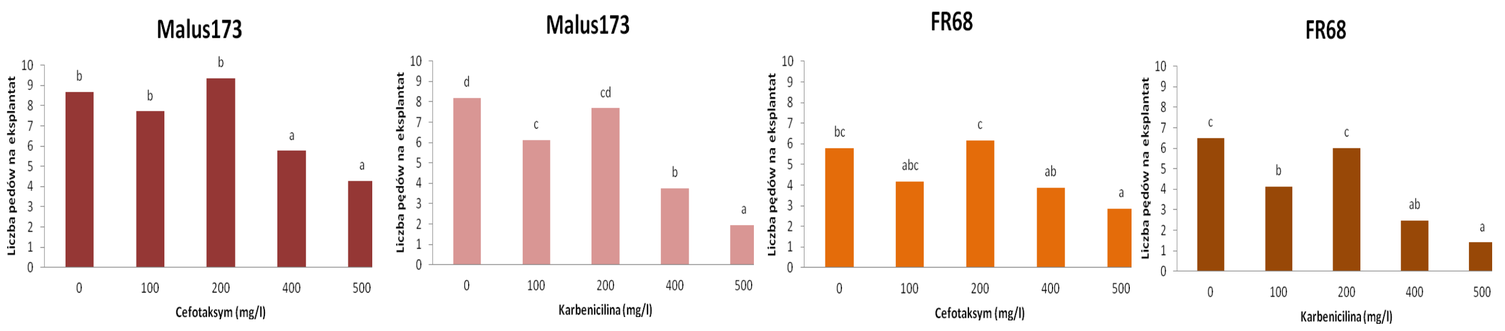
Oceniono wpływ antybiotyków:
Cefotaksymu—100 - 500 mg/l
Karbenicyliny—100 - 500 mg/l
Higromycyny—5 - 60 mg/l
na regenerację roślin wybranych genotypów jabłoni.

Higromycyna zastosowana w stężeniu już 5 mg / L powodowała obumieranie pędów obu genotypów jabłoni.

a) **Tab. 2** Wpływ antybiotyków na regeneracje pędów jabłoni odmian Malus173(a) i FR68(b) b)

Malus173		Malus173	
Cefotaksym (mg/l)	Liczba pędów na eksplantat	Karbenicilina (mg/l)	Liczba pędów na eksplantat
0	8.68b	0	8.20d
100	7.72b	100	6.12c
200	9.36b	200	7.68cd
400	5.76a	400	3.76b
500	4.28a	500	1.96a
Malus173		**Malus173**	
Cefotaksym (mg/l)	Regeneracja (%)	Karbenicilina (mg/l)	Regeneracja (%)
0	92	0	92
100	84	100	88
200	96	200	88
400	76	400	72
500	72	500	48

FR68		FR68	
Cefotaksym (mg/l)	Liczba pędów na eksplantat	Karbenicilina (mg/l)	Liczba pędów na eksplantat
0	5.8bc	0	6.48c
100	4.16abc	100	4.12b
200	6.16c	200	6c
400	3.88ab	400	2.48ab
500	2.84a	500	1.4a
FR68		**FR68**	
Cefotaksym (mg/l)	Regeneracja (%)	Karbenicilina (mg/l)	Regeneracja (%)
0	68	0	64
100	68	100	68
200	76	200	76
400	56	400	52
500	56	500	48



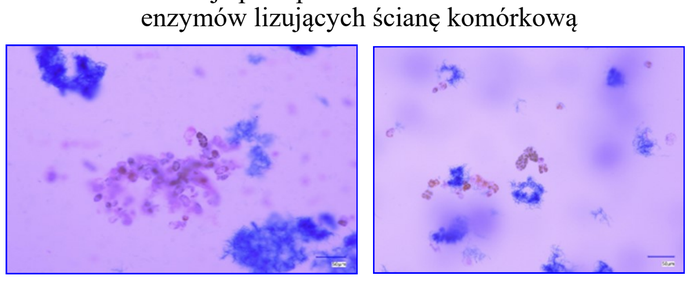
Wnioski:
- Zdolność i intensywność regeneracji była zależna od genotypu badanych roślin jabłoni, typu pożywki, rodzaju użytych regulatorów wzrostu, ich stężenia, od temperatury i światła.
- Największe możliwości regeneracyjne odnotowano dla genotypu Malus173.
- Cefotaksym i karbenicilina w zastosowanych stężeniach z różnym skutkiem wpływały na szybkość regeneracji badanych roślin.
- Cefotaksym w stężeniu 500 mg/l wybrano do kontrolowania wzrostu Agrobacterium po eksperymentach kokultywacji kultur *in vitro*.
- W dalszym etapie badań nad regeneracją roślin uzyskanych w wyniku nowych technologii genomowych higromycyna będzie użyta do selekcji pędów.

Ocena możliwości uzyskania protoplastów na potrzeby strategii bezwektorowej edycji genomu. Materiał roślinny - liście z 2-tygodnowych kultur *in vitro* jabłoni.

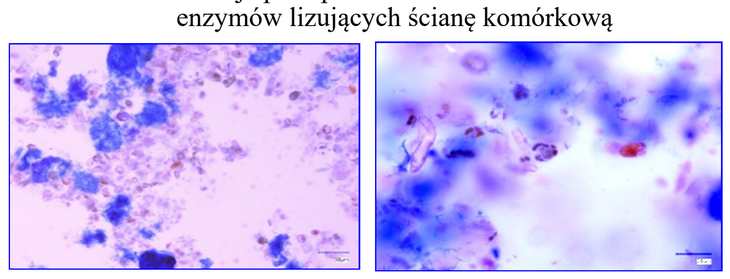
I> Metoda jednostopniowa:
Liza ściany komórkowej—1% Cellulase Onozuka R10, 0.1%, Pectolyase Y-23, 0.6 M Mannitolu, 20 mM , bufor MES oraz 5 mM MgCl2 x 6H2O.

***II> metoda kilkustopniowa*:**
a) Liza—2% Cellulase Onozuka R10, 0.5% Macerozyme R-10, 0.6 M Mannitol, 20 mM bufor MES oraz 5 mM MgCl2 x 6H2O.
b) Wirowanie w roztworze różnicującym– Sacharoza /MES (skład: 0.5M sacharoza, 1 mM bufor MES).
c) Płukanie w W5 (154 mM NaCl, 125 mM CaCl2 x 2H2O, 5 mM KCl, 5 mM glukoza).

Fot. 1. Izolacja protoplastów z zastosowaniem dwóch enzymów lizujących ścianę komórkową



Fot. 2. Izolacja protoplastów z zastosowaniem trzech enzymów lizujących ścianę komórkową



III> metoda z zastosowanie kombinacji enzymów lizujących:
A) Cellulase Onozuka R10 oraz Macerozyme R-10. **Fot. 1**
B) 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. **Fot. 2**

Preparaty barwiono błękitem trypanu (4% Trypan Blue, Sigma).

Wnioski:
- Żadna z zastosowanych procedur nie pozwoliła na uzyskanie czystych preparatów protoplastów, przydatnych do bezwektorowej edycji genomów roślinnych.
- Dalsza optymalizacja procedury obejmować będzie skuteczne usuwanie pozostałości niestrawionych tkanek w przygotowanych preparatach protoplastów.

Ocena skuteczności wprowadzania edycji genów u wybranych roślin za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens*, wybór genów przeznaczonych do edycji .

Wykorzystano *Agrobacterium tumefaciens*—zawiera plazmid/konstrukt pCAMBIA 1105.1 z sekwencją genu reporterowego *GUS*.

Etapy badawcze:

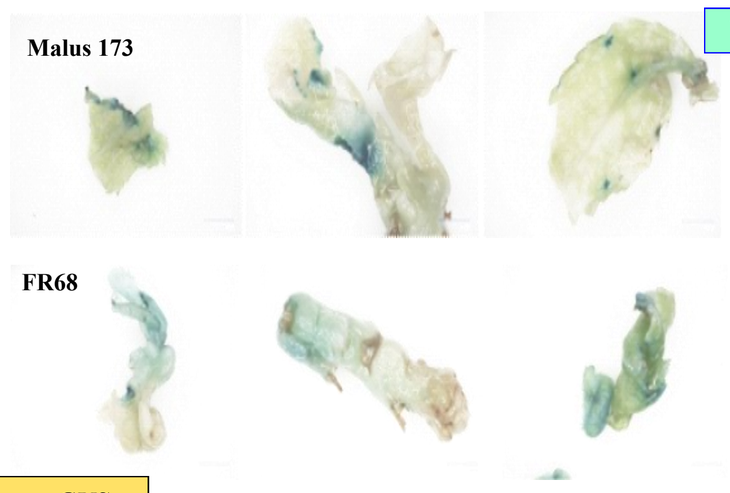
Inokulacja: płukanie (3 min.) eksplantatów liściowych/fragmentów łodyg (45- 50) w zawiesinie bakterii z acetosyringonem.

Regeneracja: MS z dodatkiem 1 mg/l TDZ i 0,5 mg/l NAA.

Selekcja i regeneracja: 250 mg/l cefotaksymu, 2 mg/l higromycyny.

Ocena skuteczności transformacji: Płukanie w roztworze z X-Glc (10 mg w 200 ul DMSO); 0,1% Tritonu, 0,2M NaH2PO4 ·H2O, pH 4,0; 0,2M NaH2PO4, pH 9,0 (ostateczne pH 7,0) - około 12 h.

Odpłukanie chlorofilu z próbek przy zastosowaniu etanolu w celu umożliwienia ekspozycji barwnej reakcji ekspresji genu *GUS*.



- Potwierdzono skuteczność metody wprowadzenia do tkanek roślin genu *GUS*.

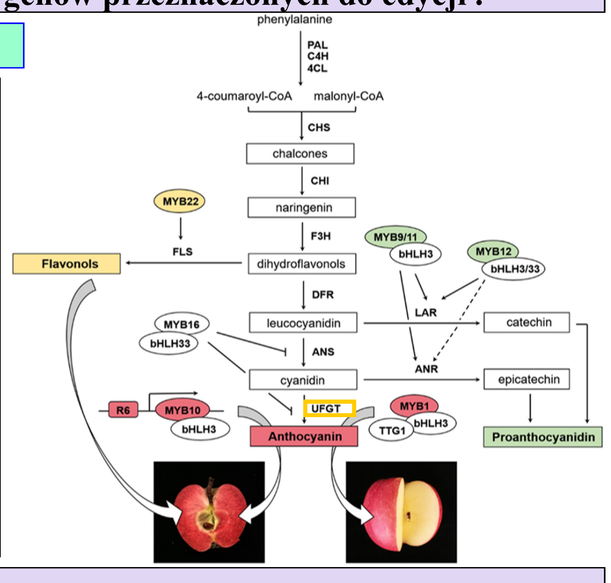
WYBÓR GENU DO EDYCJI

Do edycji CRISPR/Cas wytypowano gen ***MdUFGT***—koduje flavonoid-3-O-glucosyltransferazę,

Sekwencję genu wyekstrahowano z bazy danych ncbi: *Malus* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Zaprojektowano sekwencje siRNA:

TTAATCACTGATGTTGGGCAT
TAAATTGACAATATGCCCCTG
TATCGTCAGTGGTAGTAGCTG



Badania przeprowadzono w ramach zadań dotacji celowej finansowanej przez MRiRW – zadanie 3.19. Wstępna optymalizacja systemu regeneracji, transformacji oraz procedury ukierunkowanej mutagenezy dla edycji genomów roślin drzewiastych (jabłoń, czereśnia), z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas.