

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

Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, Justyna Góraj-Koniarska, Aleksandra Trzewik, Agnieszka Marasek Ciołakowska, Danuta Wójcik

*Instytut Ogrodnictwa Państwowy Instytut Badawczy,
ul Konstytucji 3go Maja 1/3, 96-100 Skierniewice*

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.

W procesie regeneracji pędów przybyszowych *in vitro* zoptymalizowano skład pożywek regeneracyjnych i selekcyjnych, a także warunków wzrostu roślin. Badane rośliny wykazały zróżnicowaną reakcję na zastosowanie cytokinin: BA, TDZ oraz auksyn: NAA, IBA i IAA. Ponadto, przeprowadzono ocenę wpływu antybiotyków kontrolujących wzrost *Agrobacterium* (cefatoksymu, karbenicyliny oraz higromycyny) na prowadzone kultury tkankowe ww. roślin.

Transformację genetyczną obu genotypów jabłoni wykonano w zawiesinie szczepu *Agrobacterium* LBA 4404, będącego wektorem plazmidu binarnego pCAMBIA z genem reporterowym *GUS*, kodującym β -glukuronidazę. Skuteczność transformacji oceniano na podstawie analizy aktywności β -glukuronidazy metodą histochemiczną w reakcji z X-Gluc 7-10 dni po kokultywacji. Aktywność β -glukuronidazy odnotowano w transformowanych eksplantatach obu genotypów.

Do edycji z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas9, wybrano gen *UFTG*, dla którego zaproponowano trzy cząsteczki sgRNA. Wybrany gen, o znanej sekwencji (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCF_002114115.1/) koduje Glukozylotransferazę, która stabilizuje pierścień barwnych antocyjanów poprzez przyłączenie cukrów.

Nasze badania umożliwią rozpoznanie roli genu w kontrolowaniu zawartości antocyjanów w tkankach roślin i owocach jabłoni. Zważywszy, że glukozylotransferaza indukuje produkcję barwnych antocyjanów, skutkującą wybarwieniem komórek docelowych zregenerowanych pędów (w odniesieniu do kontroli), spodziewamy się łatwego monitorowania roślin NTG.

Badania przeprowadzono w ramach dotacji celowej MRiRW – zadanie 3.19. Wstępna optymalizacja systemu regeneracji, transformacji oraz procedury ukierunkowanej mutagenyzy dla edycji genomów roślin drzewiastych (jabłoni, czereśni), z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas.