

Genome editing applicato agli agrumi per l'induzione di apirenia nei mandarini

Poles L.^{1,2}, Ciacciulli A.¹, Salonia F.^{1,2}, Pappalardo H.D.¹, Distefano G.², Gentile A.², La Malfa S.², Licciardello C.¹

lara.poles@crea.gov.it

¹CREA, Centro di Ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura, Acireale, Italia

²Dipartimento di Agricoltura, Alimentazione e Ambiente, Università di Catania, via Valdisavoia 5, 95123, Catania, Italia

Il comparto dei mandarini e mandarino-simili è uno tra i più dinamici nell'ambito dell'agrumicoltura nazionale ed internazionale ed il carattere dell'apirenia è tra quelli maggiormente apprezzati e studiati. Nell'ambito del progetto *CITRUS Citrus improvement by sustainable biotechnologies* (finanziato dal MIPAAF) sono state definite alcune strategie di intervento, mettendo appunto dei costrutti plasmidici per *genome editing* allo scopo di ottenere individui apireni. I geni bersagli considerati sono *iku1* e *iku2* che intervengono nella regolazione della dimensione del seme e, in Arabidopsis, bloccano lo sviluppo dell'endosperma allo stadio sinciziale. Il costrutto *pIKU-editing_GB* è stato ottenuto sfruttando la tecnologia GoldenBraid a doppia guida ed è stato validato mediante digestioni enzimatiche e sequenziamento. Il vettore plasmidico contiene, in particolare, le sequenze per le 2 guide (*sgIKU10* e *sgIKU4*) disegnate al fine di creare una delezione di 350bp del gene *iku1* e/o mutazioni in corrispondenza delle singole guide, la cassetta della proteina *Cas9* e quella per la resistenza a kanamicina. Il costrutto è stato inserito nel ceppo EHA105 di *Agrobacterium tumefaciens* ed utilizzato per esperimenti di trasformazione, impiegando a tal fine sia specie modello (citrange Carrizo e pompelmo Duncan), sia varietà di mandarino caratterizzate da buona qualità ma con elevato numero di semi (Mandarino Tardivo di Ciaculli e Mandarino Avana). Il protocollo di trasformazione, opportunamente ottimizzato, ha previsto l'utilizzo di internodi ottenuti da piantine di origine nucellare, che dopo l'infezione con l'agrobatterio sono stati posti in coltura su terreno selettivo; i germogli rigenerati sono stati microinnestati *in vitro* su citrange Carrizo (per pompelmo Duncan e per i mandarini) o posti a radicare (per il citrange Carrizo), quindi ambientati e sottoposti a verifica PCR per la presenza del transgene.

Al momento, tra i rigenerati, sono stati verificati, con i primer per la presenza delle regioni *nptIII* e *Cas9*, 7 espianti di citrange Carrizo (su 78 analizzati) ed 1 per il pompelmo Duncan (su 13 analizzati).

Le trasformazioni dei mandarini sono tuttora in corso, utilizzando sia internodi da piante giovani, sia da piante mature, per ovviare alla problematica della lunga fase giovanile che caratterizza gli agrumi.

Il sequenziamento della regione genica comprendente le 2 guide sugli espianti trasformati consentirà di verificare l'avvenuto *editing* e di caratterizzare il tipo di mutazione indotta dalla proteina *Cas9*. Parallelamente all'approccio di *genome editing*, sono stati disegnati, e sono attualmente in corso i sequenziamenti per verificare il corretto assemblaggio, anche dei costrutti che consentono di applicare il *base editing* ai geni bersaglio, interrompendo prematuramente la sintesi della proteina bersaglio.

Parole chiave: biotecnologie sostenibili, trasformazione, *Citrus*, mandarini, CRISPR/Cas9.