

A *CYCLING DOF FACTOR 1 (CDF1)* gén szerepe a 'Désirée' burgonyafajtában

KARSAI-REKTENWALD FLÓRA, ODGEREL KHONGORZUL, GYULA PÉTER,
BÁNFALVI ZSÓFIA

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Genetika és Biotechnológia Intézet

E-mail: karsai-rektenwald.flora@uni-mate.hu

Összefoglaló

A burgonya (*Solanum tuberosum* L.) az egyik legfontosabb élelmisznövényünk, amit az egész világon termesztünk kedvező táplálkozás-élettani hatásai miatt, ezért a burgonyagumó fejlődésének megismerése különösen fontos feladat. Ismert volt, hogy a *CYCLING DOF FACTOR 1 (CDF1)* egy rövidnappalos *Solanum* alfajban, a *S. tuberosum* subsp. *andigena*-ban, a gumófejlődés időpontját határozza meg. Kísérleteink célja a *CDF1* gén szerepének tanulmányozása volt egy naphossztól független gumófejlődésű burgonyafajtában, a nagy területeken termesztett 'Désirée'-ben. A cél elérése érdekében célzott mutációt hoztunk létre a 'Désirée' burgonyafajta *CDF1* génjében, majd megvizsgáltuk ennek hatását a növények fenotípusára és gumófejlődésére. A mutánsok előállítására a CRISPR/Cas9 rendszert használtuk a *CDF1* 3' nem-transzlálódó régiójára tervezett „guide” RNS-ekkel. A módszer hatékonynak bizonyult, mivel 49-117 bp hosszúságú deléciókat hordozó mutánsokat kaptunk. Három kiválasztott mutáns növényen további vizsgálatokat végeztünk. A kópiaszám meghatározás és az expresszió vizsgálat igazolta a mutációk célzott régióban történt létrejöttét. Üvegházi körülmények között mindhárom *CDF1* mutáns vonalnál késett az összetett levelek fejlődése és szárvastagságuk is elmaradt a 'Désirée' kontrollhoz képest. Ebből arra következtettünk, hogy a 'Désirée'-ben a *CDF1* a vegetációs periódus elején befolyásolja a hajtásfejlődést. Egyik *CDF1* mutáns esetében a mutáció késői gumófejlődést eredményezett, míg egy másik mutáns esetében növelte a gumóhozamot, de ez nem volt összefüggésbe hozható az azonosított deléciók számával és hosszával. Ezért lehetséges, hogy vannak további nem azonosított mutációk is a *CDF1* mutáns növényekben. Eredményeink megalapozzák a *CDF1* gén burgonyában betöltött szerepének további vizsgálatát.

Kulcsszavak: *CDF1*, *Solanum tuberosum*, CRISPR/Cas9, növényi transzformáció, gumófejlődés

Bevezetés, irodalmi áttekintés

A burgonya (*Solanum tuberosum* L.) az egyik legfontosabb élelmiszernövényünk, amit megvastagodott szárképletéért, gumójáért termesztünk és fogyasztunk az egész világon (Máté 2010, Radics 1994). A burgonya kedvező táplálkozás-élettani tulajdonságokkal bír, értékes tápanyagokat tartalmaz és könnyen emészthető. Keményítőben gazdag, aminek mennyisége a fajtától és egyéb tényezőktől függően 14-18% között változik, fehérjetartalma átlagosan 2% és C-, B1- és B2-vitaminokat is tartalmaz (Balázs 2004; Hoffmann 2011; Radics 1994). A gyökérgumós és más gumós növények a világ élelmiszer-ellátásának jelentős részét képviselik. Ebből adódóan a burgonya termesztése és a gumó fejlődésének vizsgálata gazdasági és biológiai szempontból egyaránt fontos feladat (Natarajan et al. 2019; Radics 1994).

A burgonya Dél-Amerikából, az Egyenlítő környékéről, az Andok vidékéről származik (Spoonier et al. 2007). A vad *S. tuberosum* alfajok, mint például a *S. tuberosum* subsp. *andigena*, gumófejlődése kizárólag rövid nappalos körülmények között biztosított. A gumófejlődést a levélből származó floém-mobil jelek indítják. A gumók kialakulásának kezdetét az *SP6A*, *BEL5* és *CDF1* gének határozzák meg (Hannapel et al. 2017). A *CDF1* (CYCLING DOF FACTOR 1) a DOF transzkripciós faktorok családjába tartozik, és a gumófejlődés megindulásának időpontját határozza meg. A *CDF1*-et kódoló gén az 5. kromoszómán helyezkedik el, átírását a *BEL5* szabályozza (Kondhare et al. 2019). A *CDF1*-nek három allél variánsát ismerjük. A teljes hosszúságú *CDF1.1*-et egy késői érésű burgonyatípusban azonosították, míg a gén *CDF1.2* és *CDF1.3* változatát egy korai érésű burgonyatípusban találták. A *CDF1.2* 3' végén egy 7 bp-os inszerció korai stophoz vezet, míg a *CDF1.3* ugyanezen régiójában egy 825 bp-os inszerció 22 aminosavval hosszabb fehérjét eredményez úgy, hogy közben meg is változtatja az utolsó 52 aminosavat (Kloosterman et al. 2013). A *CDF1* gén 3' vége a gén expressziójának szabályozásában is szerepet játszhat. Kimutatták ugyanis, hogy a *CDF1* translációs start helyétől 3' irányban 2400 bp-pal kezdődően a *CDF1* mRNS-sel ellentétes szálon átíródik egy „long non-coding” RNS (lncRNS), ami 1203 bp-nyi *CDF1* mRNS-sel komplementer, s mint ilyen, annak géncsendesítés mechanizmus általi lebomlásához vezethet, főleg a szállítószövetben, ahol mind a *CDF1*, mind pedig a komplementer lncRNS jelenlétét kimutatták. Bár az is igaz, hogy a két RNS mennyiségének csúcspontja a nap két ellentétes szakára esik: a *CDF1* mRNS-ből a sötét periódus végén, míg a *FLORE*-nak nevezett lncRNS-ből a sötét periódus elején van a legtöbb (Gonzales et al. 2021). A *CDF1* a *CO1/2* expressziójának visszaszorításával serkenti a gumóképződést, ezáltal növeli a gumófejlődés pozitív szabályozójának, az *SP6A*-nak az átírását (Navarro et al. 2011). A *CDF1* közvetítő szerepet játszik a cirkadián óra jelei és az *SP6A* mobilizációs jel között a levélben (Kloosterman et al. 2013).

Háziasítása során azonban a burgonya elvesztette kizárólagos igényét a rövid nappalokra, alkalmazkodott az északi féltéke fényviszonyaihoz. A nálunk termesztett fajták, köztük a 'Désirée' gumófejlődése naphossztól független. Kíváncsiak voltunk arra, hogy milyen szerepe lehet a *CDF1*-nek egy naphossztól független, termesztett burgonyafajtában. Ezért célzott mutációt hoztunk létre a 'Désirée' burgonyafajta *CDF1* génjében és vizsgáltuk annak hatását a növények morfológiájára és gumófejlődésére.

Anyag és módszer

A célzott mutáció létrehozásához szükséges „guide” RNS-eket (gRNS-eket) a CRISPOR szervertel terveztük meg (<http://crispor.tefor.net>; Haeussler et al. 2016). A tervezésnél referenciagenomként

a *Solanum tuberosum* Phytozome V9 (Dec 2012) verzióját használtuk. Két gRNS-t terveztünk (1. táblázat) a *CDF1* 3' nem-transzlálódó (3'-UTR) régiójára. A CRISPR/Cas9 alapú genomszerkesztő génkonstrukciót Golden Gate szintézissel (Werner et al. 2012) hoztuk létre a moduláris klónozás (Weber et al. 2011) elvét követve. A modulokat és a klónozáshoz szükséges egyéb vektorokat tartalmazó MoClo Toolkit-et (Werner et al. 2012) az Addgene (<https://www.addgene.org>) cégtől szereztük be. A bináris vektor konstrukciót egy újabb Golden Gate reakcióban hoztuk létre a pAGM4723 vektorban. A terméket *Escherichia coli* DH5 α baktériumba transzformáltuk, majd a sejteket LB (Luria broth, Miller) +Km₅ lemezekre kentük ki. „Piros-fehér” szelekciót alkalmaztunk, mivel a pAGM4723 vektor egy piros színű pigment előállításáért felelős operont tartalmaz, ami a klónozás során kicserélődik az inszertre. A klónokat *EcoRI* tesztelésztéssel válogattuk ki és Sanger szekvenálással (Biomi Kft., Gödöllő) ellenőriztük. A rekombináns plazmidot a pRK2013 helper plazmid segítségével három-szülős keresztezéssel (Ditta et al. 1980) vittük át *E. coli*-ból az *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404-es törzsébe. A rekombináns plazmid jelenlétét az *Agrobacterium*-ban ugyanúgy ellenőriztük, mint *E. coli*-ban.

1. táblázat. Primerek és szekvenciáik

Kód	Név	Szekvencia (5'-3')
gRNS1	CDF1.1 gRNA1	TTGTGGACTGGCCCTTCCTC
gRNS2	CDF1.1 gRNA2	TGTACATTGACCTGTAGAGT
P1	CDF1.1 3' end FW	ACACTAGGTATCAGGAATGAG
P2	CDF1.1 3' end R	TGAGAAGTCAGTAAAACTTCAGCT
P3	gCDF1 qFW	TTGTGGACTGGCCCTTCCTCG
P4	gCDF1 qR	ACTCTACAGGTCAATGTACAAGGTACAC
P5	Actin FW	TGGACTCTGGTGTATGGTGTG
P6	Actin R	GGTTTCAAGTTCCTGCTCGT
P7	EF1 qFW	GACAAGCGTGTATTAGAGG
P8	EF1 qR	CACAGTGCAGTAGTACTTAGTG

Table 1. Primers and primer sequences. ¹ Code, ² Name, ³ Sequence (5'-3')

A 'Désirée' burgonya leveleket Dietze et al. (1995) szerint transzformáltuk. A transzformációhoz 3 hétig MS táptalajban (Murashige és Skoog 1962) nevelt burgonyanövények leveleit használtuk explantátumként. A hajtásregenerációt Km₅₀ szelekció mellett végeztük, az *Agrobacterium*-ot Cef₁₀₀-zal öltük el. A hajtásokat RM (MS táptalaj vitaminok nélkül) +Km₅₀+Cef₁₀₀ táptalajban gyökerezettük.

A *CDF1* génben deléciót hordozó, gCDF1 mutánsok megtalálására a transzformáció után 8-12 héttel Shure et al. (1983) alapján DNS-t izoláltunk a leggyökerezett hajtásokból, melyek csúcsát a vonal fenntartására friss táptalajba helyeztük. A deléciók kimutatása P1 és P2 primerekkel (1. táblázat) végzett PCR-rel történt. A primereket az NCBI primer tervező programjával (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) terveztük és az Integrated DNA Technologies-től (Leuven, Belgium) rendeltük meg. A reakciót Bio-Rad (Hercules, CA, USA) T100 Thermal Cycler készülékben, 25 μ l végtérfogatban végeztük, amihez 200 ng genom DNS-t, 50 pg „forward” és 50 pg „reverse” primert, 0,75 U DreamTaq DNS polimerázt (Thermo Scientific, Waltham, MA,

USA) és 5 mM dNTP-t használtunk. Reakció körülmények: 95°C 5 perc után 34 ciklusban 30 másodperc 95°C, 30 másodperc 55°C és 1 perc 72°C, amit 72°C 10 perc szintézis idő követett. A PCR-fragmentumokat etídium-bromidos agaróz gélen futtattuk meg. A deléciót hordozó fragmentumokat pGEM-T Easy vektorba ligáltuk a gyártó (Promega, Madison, WI, USA) protokollja szerint. *E. coli* transzformációt követően, Amp₁₀₀ és „kék-fehér” szelektiót (Sambrook et al. 1989) egyaránt alkalmaztunk. A fehér, feltehetően rekombináns plazmidot hordozó telepekből plazmid DNS-t izoláltunk és PCR-rel bizonyítottuk a klónozott fragmentum jelenlétét.

A DNS szekvencia meghatározást a Biomi Kft. (Gödöllő) végezte. A szekvenciák elemzéséhez az NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) és a Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) programokat használtuk. A *CDF1* és *gCDF1* mRNS-ek stop kodonja és poliadenilációs jele közti szakaszok feltételezett másodlagos szerkezetének ábrázolására a CentroidFold (<http://rtools.cbrc.jp/centroidfold/>) programot használtuk (Chang et al. 2017).

A *gCDF1* vonalakban a mutáció kópiaszámának meghatározására 50 ng genomi DNS-t használtunk. A kvantitatív PCR-t a P3 és P4 primerekkel (1. táblázat) indítottuk. A templát mennyiségének normalizálására az *ACTIN*-t használtuk referenciagénként Nicot et al. (2005) protokollja szerint. A *CDF1* gén expressziós szintjét RT-qPCR segítségével határoztuk meg mintánként 3-3 *in vitro* növény leveléből. Belső kontrollként az *ACTIN* és az *EF1* együttesen szolgált. A qPCR vizsgálatokat Light Cycler-96 készülékkel végeztük, Light Cycler®480 többüregű lemezben (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) és Luminaris Color HiGreen Fluorescein qPCR Master Mix-szel (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Az adatokat a Light Cycler-96 szoftver 1.1-es verziójával elemeztük. Negatív kontrollként cDNS nélküli mixet használtunk. Mindegyik mérést három technikai ismétléssel végeztük. A relatív expressziót a két referencia gén expressziójának geometriai átlaga alapján számítottuk ki.

A *gCDF1* mutánsok fenotipizálására az *in vitro* körülmények között nőtt növényeket a mesterséges táptalajból steril Tabaksubstrat (Stender GmbH, Schermbeck, Németország) földet tartalmazó 1,2 literes (14 cm-es) cserépekbe ültettük (2022. június 24.) és üvegházi körülmények között neveltük tovább. Vizsgáltuk a levelek morfológiáját, a szár vastagságát és a növények magasságát a nem transzformált ‘Désirée’ kontrollhoz képest. A fiatal növények gumószámának megismeréséhez a növényeket óvatosan kiborítottuk a cserépből, majd számolás után visszaültettük. A vegetációs idő végén (2022. szeptember 29.) a gumókat begyűjtöttük, meghatároztuk darabszámukat és tömegüket.

A gumóhéjak antocián méréséhez az üvegházból frissen betakarított érett, cserépben nevelt gumók héját lehúztuk. A mérést Toguri et al. (1993) egyszerűsített módszere szerint végeztük: 1 g gumóhéjat 10 ml 1%-os metanolos sósavban áztattunk egy éjszakán át 4°C-on. Az antocián pigmentek klorid formáinak relatív koncentrációját spektrofotometriásan határoztuk meg az abszorbancia mérésével 540 nm-en.

A szignifikáns különbségek kimutatására Tukey-próbával kiegészített variancia analízist (ANOVA) végeztünk.

Eredmények

CDF1 ‘Désirée’ mutánsok izolálása és szekvencia szintű jellemzése

A *CDF1* ‘Désirée’-ben betöltött szerepének megismerésére a CRISPR/Cas9 rendszer segítségével *CDF1* mutánsokat állítottunk elő. A *CDF1* a *CYCLING DOF* transzkripció családhoz tartozik, melynek tagjai nagy hasonlóságot mutatnak egymással. Hogy elkerüljük az ún. „off target” mutációk létrejöttét

a gRNS-eket a *CDF1* 3'-UTR-jére terveztük, reménykedve abban, hogy korábbi tapasztalatunknak (Bánfalvi et al. 2020) megfelelően, nagyméretű deléciókat kapunk, melyek esetleg elérhetik a *CDF1* 3' kódoló régióját is. A mutánsok előállítására a Cas9-et és gRNS-eket hordozó konstrukciót 'Désirée'-be juttattuk és a transzformánsokat szelektív táptalajon regeneráltattuk. A mutáció keresésére 75 növény genomi DNS-ét teszteltük PCR segítségével. A P1 és P2 primerekkel 11 olyan mutáns növényt találtunk, amelyekben agaróz gélen is látható méretű deléció volt. Ezek közül, a deléció mérete alapján, hármat választottunk ki további tesztelésre (1.A ábra). A 'Désirée' tetraploid. Olyan mutáns, amiben mind a négy *CDF1* alléban nagyobb deléció keletkezett volna, nem tudtunk azonosítani. A *CDF1* 3' kódoló régiójára is terveztünk primereket. Több primerkombinációt is kipróbáltunk, de nem találtunk olyan mutáns, amiben a deléció bizonyított módon elérte volna a kódoló régiót.

1. ábra. (A) gCDF1 mutánsok azonosítása P1 és P2 primerekkel végzett PCR-rel (M, marker; 1, 2, 3, kiválasztott mutáns vonalak; Des, 'Désirée' kontroll). (B) A *CDF1* gén kópiaszámának meghatározása P3 és P4 primerekkel végzett qPCR-rel. (C) A *CDF1* gén expressziójának vizsgálata levélből P3 és P4 primerekkel végzett RT-qPCR-rel. Az Y tengely a *CDF1* gén 'Désirée'-hez viszonyított relatív expressziós szintjét mutatja. A hibaszávok a technikai ismétlések (n=3) szórásértékeit reprezentálják. Az „a”, „b” és „c” betűk a szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbségek jelölésére szolgálnak.

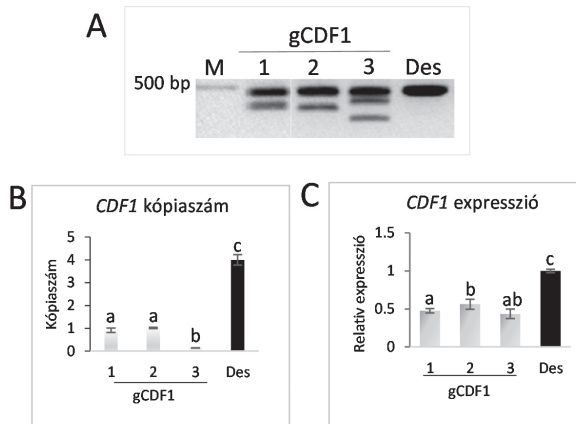


Figure 1. (A) Identification of gCDF1 mutants by PCR using the P1 and P2 primers (M, marker; 1, 2, 3 selected mutant lines; Des, 'Désirée' control). (B) Determination of the copy number of *CDF1* gene by qPCR using the P3 and P4 primers. (C) Expression level of the *CDF1* gene in leaves determined by RT-qPCR using the P3 and P4 primers. The Y-axis shows the relative expression values of the *CDF1* gene compared to 'Désirée'. Error bars indicate the standard deviations of technical repeats (n=3). Letters "a", "b" and "c" indicate significant differences ($p \leq 0.05$).

A kiválasztott három mutánsban *CDF1* kópiaszám és expresszió meghatározást végeztünk qPCR-rel, illetve RT-qPCR-rel a gRNS-eket is magába foglaló primerekkel. Bár a két meghatározás nem adott teljesen azonos eredményt (1.B és C ábra), azt mindkét vizsgálat megerősítette, hogy a mutáció a

CDF1 gént érintette és valószínűsítette, hogy a kiválasztott három mutáns közül egyik sem tekinthető null mutánsnak.

A deléciók pontos kiterjedésének meghatározására a P1 és P2 primerekkel kapott PCR-fragmentumokat (1.A ábra) klónoztuk és szekvenáltattuk. A kapott szekvenciát a *CDF1* Spud DB-ben (<http://spuddb.uga.edu>) fellelhető genomszekvenciájához hasonlítottuk (2.A ábra). A gCDF1/1-ben egy 68 bp-os és egy 64 bp-os, a gCDF1/2-ben egy 70 bp-os, a gCDF1/3-ban pedig egy 117 bp-os és egy 49 bp-os deléciót azonosítottunk. A deléciók elhelyezkedését a 2.B ábra mutatja.

2. ábra. (A) A burgonya *CDF1* génjének és transzkriptumainak vázlatos rajza. Az *X1* (XM_006355049.2), *X2* (XM_015312183.1) és *FLORE* (Ramirez Gonzales et al. 2021) transzkriptumokat a nyilak mutatják (chr05, V. kromoszóma; a számok a kromoszómán belüli pozíciót jelzik; ATG, translációs start kodon; TGA; translációs stop kodon). (B) A deléciók elhelyezkedése és mérete a gCDF1 mutáns vonalakban a 'Désirée' *CDF1* szekvenciájához hasonlítva. A deléciókat a fekete téglalapok jelzik, míg a vonalak egy-egy bázispár különbségre utalnak (P1, P2, primerek; gRNS1, gRNS2, „guide” RNS-ek). (C) A 'Désirée' és a gCDF1 mutánsok *CDF1* mRNS-ének másodlagos szerkezete a translációs stop kodontól a poliadenilációs jelig.

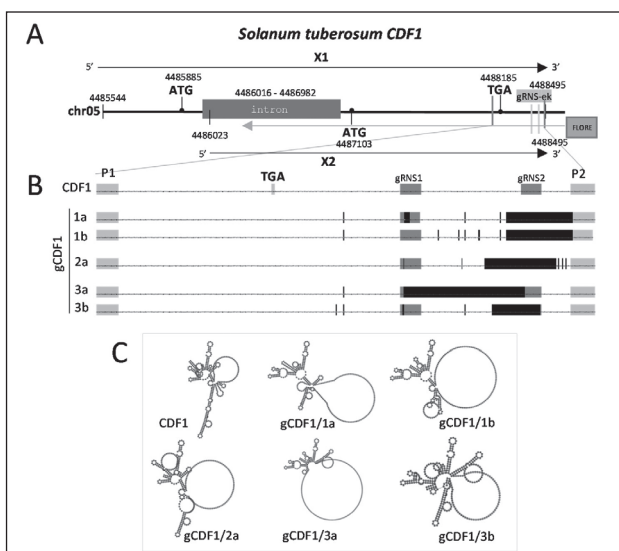


Figure 2. (A) Schematic diagram of the potato *CDF1* gene and transcripts. *X1* (XM_006355049.2), *X2* (XM_015312183.1) and *FLORE* (Ramirez Gonzales et al. 2021) transcripts are indicated by arrows (chr05, chromosome V; numbers indicate the positions within the chromosome; ATG, translation start codon; TGA; translation stop codon). (B) Location and size of deletions in gCDF1 mutant lines compared to the *CDF1* sequence of 'Désirée'. The deletions are indicated by the black rectangles, while the lines refer to one base pair difference (P1, P2, primers; gRNA1, gRNA2, guide RNAs). (C) Secondary structure of the *CDF1* mRNA extending from the translation stop codon until the polyadenylation signal in 'Désirée' and gCDF1 mutants.

Az eukarióta mRNS-ek 3' vége nem fordítódik át fehérjévé, de meghatározó szerepe van az átírás hatékonyságában. A 3'-UTR az AAUAAA szekvenciariészlet után elhasítódik, majd poliadenilálódik (Nyitrai és Pál 2013). Feltételeztük, hogy a gCDF1 mutánsokban a deléciók megváltoztatták a *CDF1* mRNS végszerkezetét. Ennek igazolására számítógépes predikciót végeztünk. A számítógépes elemzés beigazolta feltételezésünket, hogy a *CDF1* mRNS-ek végszekvenciájának szerkezete jelentősen eltér a 'Désirée' *CDF1* mRNS-ének végszekvenciájától (2.C ábra).

A *CDF1* funkció vizsgálata üvegházi körülmények között

Bár a kiválasztott három *CDF1* mutáns vonal közül egyikben sem érte el a deléció a kódoló régiót, de a gén bonyolult, a 3'-UTR-en is áthaladó, *FLORE*-nak nevezett lncRNS szabályozását figyelembe véve (Gonzales et al. 2021 és 2.A ábra) kíváncsiak voltunk a növények fenotípusára és gumóképzési tulajdonságaira. A vizsgálatokhoz a három gCDF1 vonal 10-10 egyedét *in vitro*-ból cserpekekbe ültettük és a 'Désirée' kontrollal együtt üvegházi körülmények között neveltük tovább.

3. ábra. (A) A gCDF1 mutánsok levélmorfológiája a 'Désirée' kontrollhoz viszonyítva a vegetációs időszak elején. (B) A gCDF1 növények szárvastagsága a 'Désirée' kontrollhoz viszonyítva a vegetációs időszak közepén. (C) A gCDF1 mutáns növények magassága a nem transzformált 'Désirée' kontrollhoz viszonyítva a vegetációs időszak végén. Az „a” betűk jelzik, hogy nincs szignifikáns különbség ($p \leq 0,05$) a vonalak között.

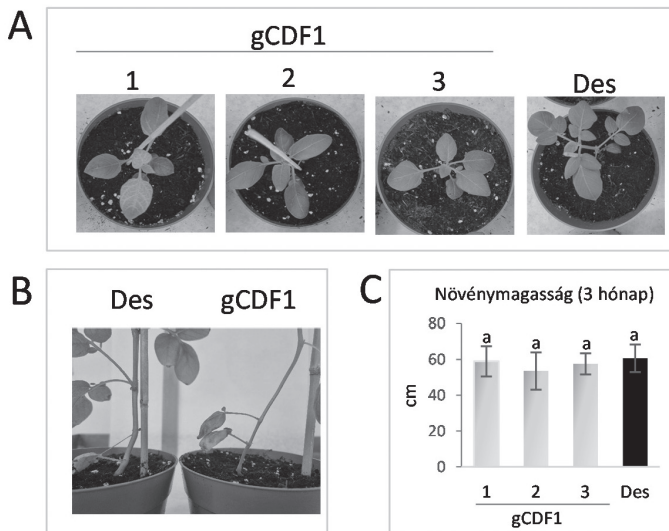


Figure 3. (A) Leaf morphology of gCDF1 mutants compared to the 'Désirée' control at the beginning of the growing season. (B) Stem thickness of gCDF1 plants compared to the 'Désirée' control in the middle of the growing season. (C) Height of gCDF1 mutant plants compared to the non-transformed 'Désirée' control at the end of the growing season. Letter "a" indicates no significant difference between the lines ($p \leq 0.05$).

A 3.A ábrán a gCDF1 mutánsok levélmorfológiája látható a vegetációs időszak elején. Megfigyeltük, hogy a gCDF1 növényeken az összetett levelek fejlődése később a kontrollhoz képest. A vegetációs időszak későbbi szakaszában azonban a gCDF1 mutáns növényeken is összetett levelek alakultak ki. A gCDF1 növények szára vékonyabb volt és szártagjaik is megnyúltak voltak a kontroll növény szártagjaihoz képest (3.B ábra). Kezdetben a gCDF1/1 növények alacsonyabbak voltak, mint a kontroll, de a vegetációs periódus végén magasságbeli különbség már nem volt a mutáns és a kontroll növények között (3.C ábra).

A gumófejlődés koraiságát az egy hónapos növények gumóinak megszámlálásával becsültük meg. A gCDF1/2 növényeken szignifikánsan kevesebb gumót találtunk, mint a többi növényen (4.A ábra). A számlálás után a növényeket tovább neveltük és a vegetációs időszak végén ismét megszámláltuk a gumókat és vizsgáltuk morfológiájukat (4.B és C ábra). Ekkor viszont már a gCDF1/2 növényeken szignifikánsan több, de kicsi gumó volt, mint a többiekén. A gumóhozam megállapítására megmértük az egy-egy növényen fejlődött gumók tömegét. A gCDF1/1 gumóhozama magasabb, míg a gCDF1/2 vonalé alacsonyabb volt, mint a kontrollé (4.D ábra). A 'Désirée' piros héjú burgonya. Szemrevételezés során a gCDF1/1 és gCDF1/3 vonal gumóit világosabbnak láttuk, mint a kontrollét. A gumó színét az antociánok adják. Megmértük a gumóhéjak antocián tartalmát, ami megerősítette, hogy ennek a két vonalnak valóban világosabb a gumóhéja, mint a 'Désirée'-nek, bár ez a különbség statisztikailag nem volt szignifikáns (4.E ábra).

4. ábra. (A) Gumószám a gumófejlődés kezdeti stádiumában. (B) Gumószám a vegetációs időszak végén. (C) A gumók morfológiája. Minden sor a három legnagyobb hozamú növény gumóit mutatja. (D) Gumóhozam a vegetációs időszak végén. (E) A gumóhéjak antocián tartalma. A meghatározás spektrofotometriával történt. Az „a”, „b” és „c” betűk a szignifikáns ($p \leq 0,05$) különbségek jelölésére szolgálnak.

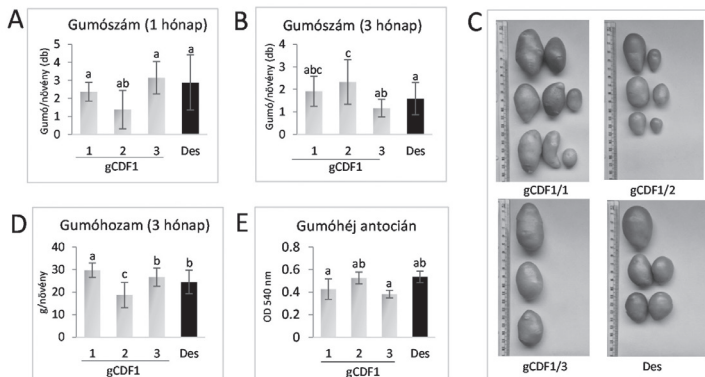


Figure 4. (A) Tuber number at the initial stage of tuber development. (B) Tuber number at the end of the growing season. (C) The morphology of tubers. Tubers of the three most productive plants are shown in each row. (D) Tuber yield at the end of the growing season. (E) Anthocyan content of tubers. The measurement was made by spectrophotometry. Letters “a”, “b” and “c” indicate significant differences ($p \leq 0.05$).

Következtetés

A CRISPR/Cas9 rendszer használata célzott mutagenézisre széleskörűen elterjedt módszerré vált az utóbbi időben. A burgonyában is sikerrel alkalmazták (Hofvander et al. 2022) és alkalmaztuk mi is korábban (Bánfalvi et al. 2020) ezt a technikát. A módszer hatékonynak bizonyult a *CDF1* mutánsok előállítására is: 15% gyakorisággal 49-117 bp hosszúságú deléciókat hordozó mutánsokat kaptunk. Három mutánt vizsgáltunk részletesen. Ezekben egy, illetve két deléciót tudunk szekvencia szinten pontosan behatárolni, de nem kizárt, hogy további, kisebb mutációk is jelen lehetnek ezekben a vonalakban, amiket még nem tudtunk azonosítani.

Mindhárom *CDF1* mutánsban késett az összetett levelek kialakulása és szárvastagságuk elmaradt a kontrollétól. Ebből arra következtettünk, hogy a *CDF1*, legalább is a 'Désirée'-ben, szerepet játszik a hajtásfejlődésben. Eddig burgonyában a *CDF1*-nek a gumófejlődés megindításában és a szárazságtűrés gyengítésében betöltött szerepe volt ismert (Kloosterman et al. 2013; Gonzales et al. 2021). Más növényfajokban viszont számos más folyamattal is kapcsolatba hozták már, így pl. a *C/N* anyagcserével, a fitokrómokkal, a fényre adott reakciókkal, a virágzás idejével, sőt olyan fejlődési folyamatokkal is, mint a szállítószövet kialakulása vagy a szárelágazás befolyásolása (Renau-Morata et al. 2020).

Ellentétben a hajtásfejlődéssel, a gumófejlődés és gumómorfológia szempontjából a három *CDF1* mutáns nem volt azonos. Míg az egyik mutánsban a gumófejlődés késett, majd sok kicsi gumó keletkezett, a másikban a gumók össztelege nagyobb volt, mint a kontrollé. Lehet, hogy ez összefüggésbe hozható olyan *CDF1* mutációkkal, amelyeket még nem sikerült azonosítanunk, de nem zárhatjuk ki az ún. „off-target” mutációk hatását sem a *gCDF1* mutánsokban. Mindemelllett a Cas9 jelenléte a mutánsokban sejszinten folyamatosan újabb és újabb mutációkat generálhat, amiket PCR-rel detektálni ugyan nem tudunk, de hatással lehetnek a gumófejlődésre.

A kimutatott deléciók egyike sem érte el a *CDF1* kódoló régióját, mégis fenotípusos változást okozott. Az mRNS-ek 3' nem-transzlálódó régióinak szerepe lehet az mRNS stabilitásában és transzportjában. Kötődhetnek hozzájuk fehérjék és mikroRNS-ek, amik befolyásolhatják a transzláció hatékonyságát (Nyitrai és Pál 2013). Bár a poliadenilációs jel kívül esik a *gCDF1* mutánsokban kimutatott deléciókon, a mutációk prediktálhatóan jelentős változást okoztak a *CDF1* mRNS 3' végének szerkezetében, ami megakadályozhatja az esetleges szabályozó fehérjék kötődését és csökkentheti a transzláció hatékonyságát. A deléciók lerövidítették a *FLORE* szabályozó lncRNS-t is, aminek szintén szerepe lehet a fenotípusos változásokban. Ennek pontos mechanizmusa azonban jelenleg még nem ismert.

Köszönetnyilvánítás

Köszönjük a technikai segítséget Kiss Monika Tekla laborasszisztensnek. A kutatást az NKFIH NN_124441 pályázat támogatta.

Felhasznált irodalom

1. Balázs S. 2004. Korai burgonya. In: Zöldségtermesztők kézikönyve. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 283-287.
2. Bánfalvi, Z., Csákvári, E., Villányi, V. and Kondrák, M. 2020. Generation of transgene-free *PDS* mutants in potato by *Agrobacterium*-mediated transformation. *BMC Biotechnology*, 20: 25. <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00621-2>
3. Chang, Y., Yan, M., Yu, J., Zhu, D. and Zhao, Q. 2017. The 5' untranslated region of potato *SbGLR* gene contributes pollen-specific expression. *Planta*, 246: 389–403. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2695-7>
4. Dietze, J., Blau, A. and Willmitzer, L. 1995. *Agrobacterium*-mediated transformation of potato (*Solanum tuberosum*). In: Potrykus I, Spangenberg G, editors. Gene transfer to plants. Springer-Verlag, 257-269. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2333-0_19
5. Ditta, G.S., Stanfield, D., Corbin, D. and Helinski, D.R. 1980. Broad host-range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(12): 7347-7351. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.12.7347>
6. Gonzales, L.R., Shi, L., Bergonzi, S.B., Oortwijn, M., Franco-Zorrilla, J.M., Solano-Tavira, R., Visser, R.G.F., Abelenda, J.A. and Bachem, C.W.B. 2021. Potato CYCLING DOF FACTOR 1 and its lncRNA counterpart *StFLORE* link tuber development and drought response. *The Plant Journal*, 105(4): 855-869. <https://doi.org/10.1111/tpj.15093>
7. Haeussler, M., Schönig, K., Eckert, H., Eschstruth, A., Mianné, J., Renaud, J.B., Schneider-Maunoury, S., Shkumatava, A., Teboul, L., Kent, J., Joly, J.S. and Concordet, J.P. 2016. Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biology*, 17(1): 148. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1012-2>
8. Hannapel, D.J., Sharma, P., Lin, T. and Banerjee, A.K. 2017. The multiple signals that control tuber formation. *Plant Physiology*, 174(2): 845-85. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00272>
9. Hoffmann S. 2011. A burgonya integrált termesztése. In: Ipari-és takarmánynövények termesztése. Debreceni Egyetem, Debrecen, 40-53.
10. Hofvander, P., Andreasson, E. and Andersson, M. 2022. Potato trait development going fast-forward with genome editing. *Trends in Genetics*, 38(3): 218-221. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.10.004>
11. Kloosterman, B., Abelenda, J.A., Gomez Mdel, M., Oortwijn, M., de Boer, J.M., Kowitzanich, K., Horvath, B.M., van Eck, H.J., Smaczniak, C., Prat, S., Visser, R.G. and Bachem, C.W. 2013. Naturally occurring allele diversity allows potato cultivation in northern latitudes. *Nature*, 495: 246–250. <https://doi.org/10.1038/nature11912>
12. Kondhare, K.R., Vetal, P.V., Kalsi, H.S. and Banerjee, A.K. 2019. BEL1-like protein (StBEL5) regulates *CYCLING DOF FACTOR1* (*StCDF1*) through tandem TGAC core motifs in potato. *Journal of Plant Physiology*, 241: 153014. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.153014>
13. Máté A. 2010. A burgonya termesztése (*Solanum tuberosum* L.). In: Szántóföldi növénytermesztés. SZIE, Gödöllő, 46-54.
14. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-479. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
15. Natarajan, B., Kondhare, K.R., Hannape, D.J. and Banerjee, A.K. 2019. Mobile RNAs and proteins: Prospects in storage organ development of tuber and root crops. *Plant Science*, 284: 73-81. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.03.019>
16. Navarro, C., Abelenda, J.A., Cruz-Oró, E., Cuéllar, C.A., Tamaki, S., Silva, J., Shimamoto, K. and Prat, S. 2011. Control of flowering and storage organ formation in potato by *FLOWERING LOCUS T*. *Nature*, 478: 119-122. <https://doi.org/10.1038/nature10431>

17. Nicot, N., Hausman, J.F., Hoffmann, L. and Evers, D. 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 56(421): 2907-2914. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri285>
18. Nyitray L. és Pál G. 2013. A biokémia és molekuláris biológia alapjai. Elméleti e-könyv. ELTE TTK, Budapest. <https://ttk.elte.hu/dstore/document/836/A%20biok%C3%A9mia%20%C3%A9s%20molekul%C3%A1ris%20biol%C3%B3gia%20alapjai.jav.pdf>
19. Radics L. 1994. Gyökér és gumós növények. In: Szántóföldi növénytermesztés. Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem, Kertészeti Kar, Budapest, 106-126.
20. Renau-Morata, B., Carrillo, L., Dominguez-Figueroa, J., Dominguez-Figueroa, J., Vicente-Carabajosa, J., Molina, R.V., Nebauer, S.G. and Medina, J. 2020. CDF transcription factors: plant regulators to deal with extreme environmental conditions. *Journal of Experimental Botany*, 71(13): 3803-3815. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa088>
21. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
22. Shure, M., Wessler, S. and Fedoroff, N. 1983. Molecular identification and isolation of the *Waxy* locus of maize. *Cell*, 35(1): 225-233. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90225-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90225-8)
23. Spooner, D.M., Nunez, J., Trujillo, G., Herrera Mdel, R., Guzman, F. and Ghislain, M. 2007. Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49): 19398-19403. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709796104>
24. Toguri, T., Umemoto, N., Kobayashi, O. and Ohtani, T. 1993. Activation of anthocyanin synthesis genes by white light in eggplant hypocotyl tissues, and identification of an inducible P-450 cDNA. *Plant Molecular Biology*, 23: 933-946. <https://doi.org/10.1007/BF00021810>
25. Weber, E., Engler, C., Gruetzner, R., Werner, S. and Marillonnet, S. 2011. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS ONE*, 6(2): e16765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016765>
26. Werner, S., Engler, C., Weber, E., Gruetzner, R. and Marillonnet, S. 2012. Fast track assembly of multigene constructs using Golden Gate cloning and the MoClo system. *Bioengineered*, 3(1): 38-43. <https://doi.org/10.4161/bbug.3.1.18223>

Rövidítések

Amp₁₀₀ = ampicillin 100 mg/l

Cef₁₀₀ = cefotaxim 100 mg/l

Des = 'Désirée' burgonyafajta

Km₂₅ = kanamicin 25 mg/l

Km₅₀ = kanamicin 50 mg/l

LB = Luria broth medium

lncRNS = „long non-coding” RNS

MS = Murashige-Skoog medium

RM = rooting medium

qPCR = kvantitatív PCR

UTR = untranslated region

Function of the *CYCLING DOF FACTOR 1 (CDF1)* in the potato cultivar ‘Désirée’

KARSAI-REKTENWALD, F., ODGEREL, K., GYULA, P., BÁNFALVI, Z.

Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Institute of Genetics and Biotechnology

E-mail: karsai-rektenwald.flora@uni-mate.hu

Summary

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the most important food crops cultivated all over the World due to its beneficial nutritional and physiological effects. Therefore, studying the tuber development is a particularly important task. It was known that *CYCLING DOF FACTOR 1 (CDF1)* determines the time of tuber development in the short-day tuberising *S. tuberosum* subsp. *andigena*. The aim of our work was to study the function of *CDF1* in the day length independent tuberising potato cultivar ‘Désirée’. To achieve this goal, targeted mutations were introduced into the *CDF1* gene of ‘Désirée’ using the CRISPR/Cas9 system with gRNAs designed into the 3'-UTR region of *CDF1*. Three selected mutants carrying deletions of 49-117 bps were tested in details. The copy number determination and the expression test confirmed the location of the mutations in the targeted region. Under greenhouse conditions, the development of compound leaves was delayed and the stems were thinner compared to the ‘Désirée’ control in all three *CDF1* mutant lines. Thus, we concluded that, at least in ‘Désirée’, *CDF1* affects shoot development at the beginning of the vegetation period. In one of the *CDF1* mutants, the mutation resulted in delayed tuber development, while in another one the tuber yield was increased. However, these phenomena were not in correlation with the number and length of the identified deletions. Thus, the existence of unidentified mutations in *CDF1* mutant plants cannot be excluded. This study lays foundation for further investigation of the function of *CDF1* gene in potato.

Keywords: *CDF1*, *Solanum tuberosum*, CRISPR/Cas9, plant transformation, tuber development

Szerzők

Karsai-Rektenwald Flóra (kapcsolattartó szerző), – PhD hallgató, tudományos segédmunkatárs, MATE, Genetika és Biotechnológia Intézet, Növénybiotechnológia Tanszék, Burgonyakutatás Csoport, 2100 Gödöllő Szent-Györgyi Albert utca 4.

Odgerel Khongorzul – PhD, tudományos munkatárs, MATE, Genetika és Biotechnológia Intézet, Növénybiotechnológia Tanszék, Burgonyakutatás Csoport, 2100 Gödöllő Szent-Györgyi Albert utca 4.

Gyula Péter – PhD, tudományos főmunkatárs, MATE, Genetika és Biotechnológia Intézet, Növénybiotechnológia Tanszék, Epigenetika Csoport, 2100 Gödöllő Szent-Györgyi Albert utca 4.

Bánfalvi Zsófia – DSc, csoportvezető, MATE, Genetika és Biotechnológia Intézet, Növénybiotechnológia Tanszék, Burgonyakutatás Csoport, 2100 Gödöllő Szent-Györgyi Albert utca 4.