

## **Dati preliminari sull'utilizzo di due approcci di *editing* genico al fine di coniugare la presenza di licopene e di antocianine in frutti di arancio dolce**

**Salonia F.<sup>1,2</sup>, Ciacciulli A.<sup>1</sup>, Pappalardo H.D.<sup>1</sup>, Poles L.<sup>1,2</sup>, La Malfa S.<sup>2</sup>, Licciardello C.<sup>1</sup>**

concetta.licciardello@crea.gov.it

<sup>1</sup>CREA Centro di Ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura, Corso Savoia 190, 95024 Acireale (Catania)

<sup>2</sup>Dipartimento di Agricoltura, Alimentazione ed Ambiente (Di3A), Università di Catania, Via Valdisavoia 5, 95123 Catania

In letteratura è stato ampiamente descritto il ruolo antiossidante delle antocianine e del licopene, che svolgono un'azione benefica sulla salute umana. Questi caratterizzano gli agrumi in maniera mutualmente esclusiva e pertanto sarebbe di grande interesse disporre, in un prossimo futuro, di varietà arricchite in entrambi i pigmenti (rosso-porpora e rosa, rispettivamente). Oggi questo obiettivo è perseguibile, oltre che attraverso il *breeding* classico, anche sfruttando le Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA). Infatti, l'*editing* e la cisgenesi consentono di intervenire in maniera mirata sul genoma delle varietà di pregio, riducendo di gran lunga i tempi del *breeding* tradizionale. Il presente lavoro ha l'obiettivo di intervenire in varietà di arance a polpa pigmentata, mediante due approcci di *editing* genico finalizzati alla disattivazione del gene della b-ciclasina2 (bLYC2), responsabile della degradazione del licopene.

Per il *genome editing* è stata sfruttata la tecnologia GoldenBraid 3.0, che ha previsto il disegno di due *RNAguide* nella regione codificante di LYC2 al fine di disattivare il gene, o inducendo una delezione di 271bp compresa tra le due "guide", o causando una mutazione in almeno una delle "guide".

Parallelamente, è stato messo a punto un costrutto per *base editing* che sfrutta la tecnologia di PCR mutagenesi, al fine di indurre una mutazione puntiforme in LYC2 attraverso l'introduzione di un codone di stop prematuro, generando pertanto una proteina tronca non funzionante.

Entrambi i costrutti sono stati assemblati e utilizzati per la trasformazione genetica mediata dal ceppo EHA105 di *Agrobacterium tumefaciens*. Le trasformazioni sono state condotte su internodi di semenzali di Carrizo citrange (CC, "specie modello" per *Citrus*), Doppio Sanguigno (DS) e pompelmo Duncan FT (*terminal flower*, DFT). In quest'ultimo caso l'auspicio è quello di bypassare la lunga fase giovanile degli agrumi ed ottenere una possibile fioritura anticipata e quindi una valutazione del fenotipo in tempi ancora più ridotti. Gli espianti (210 di CC, 510 di DS, 300 di DFT), dopo la trasformazione, sono stati trasferiti in terreno selettivo (kanamicina 70mg/L). I germogli resistenti sono stati validati in PCR per *nptII* e per la proteina Cas9. Attualmente i risultati più promettenti sono stati ottenuti per CC, per il quale si dispone di diversi rigeneranti PCR-positivi che sono mantenuti in substrato radicante (0,5 mg/L acido alfa-naftalenacetico) allo scopo di rigenerare piante complete da avviare alle successive fasi di valutazione e da sequenziare per definire la natura dell'*editing* indotto.

I dati, seppur preliminari, rappresentano un incoraggiante esempio di TEA applicate al miglioramento di un carattere qualitativo del frutto.

**Parole chiave:** *Citrus*, licopene, beta ciclasina, tecnologie di evoluzione assistita, goldenbraid 3.0.