

## STRESZCZENIE

### Przygotowanie i zastosowanie ekspresyjnych konstrukcji genowych do modyfikacji tytoniu (*Nicotiana tabacum*) i sorgo (*Sorghum sp.*) w celu zwiększenia zawartości sacharozy na potrzeby produkcji bioetanolu II-generacji

Rosnące globalne zużycie ograniczonych zasobów paliw kopalnych i ich negatywne skutki klimatyczne napędzają obecnie poszukiwanie alternatywnych źródeł energii, które dają obietnicę bezpieczeństwa energetycznego i zrównoważonego rozwoju. Biopaliwa wytwarzane z biomasy roślinnej stanowią odnawialne źródło energii. Istotną rolę we współczesnej bioenergetyce może odegrać sorgo (*Sorghum bicolor*), jak i tytoń (*Nicotiana tabacum*). Ulepszenie sorgo oraz tytoniu jako uprawy na cele biopaliwowe można osiągnąć poprzez połączenie inżynierii genetycznej i praktyki agronomicznej. Poprzez zastosowanie inżynierii genetycznej można zmodyfikować skład ściany komórkowej i/lub zwiększyć zawartość sacharozy w biomacie. Zwiększenie zawartości sacharozy, jako preferencyjnego substratu fermentacji alkoholowej, przyczyni się do zwiększenia wydajności produkcji bioetanolu II generacji z biomasy roślinnej. W procesie syntezy sacharozy istotną funkcję pełnią następujące enzymy: syntaza sacharozy, syntaza sacharozofosforanu, pirofosforylaza UDP-glukozy i fosfataza sacharozofosforanu. Zwiększenie ekspresji genów kodujących enzymy zaangażowane w szlak syntezy sacharozy może prowadzić do wzrostu udziału sacharozy w cukrach produkowanych w roślinie.

Celem pracy było przygotowanie ekspresyjnych konstrukcji genowych do modyfikacji tytoniu zawierających geny kodujące enzymy zaangażowane w szlak syntezy sacharozy. Następnie uzyskanie linii transgenicznego tytoniu z potwierdzoną ekspresją zintegrowanych z genomem dodatkowych genów. Osiągnięcie tego celu zakładało: wprowadzenie przygotowanych konstrukcji z wykorzystaniem metody transformacji za pomocą bakterii *Agrobacterium tumefaciens*, prowadzenie kultur *in vitro* tytoniu szlachetnego, analizę integracji konstrukcji genowych z genomowym DNA, zbadanie ekspresji transgenu na poziomie mRNA oraz określenie liczby kopii wbudowanego transgenu. Dodatkowo zoptymalizowano warunki regeneracji i propagacji *in vitro* roślin sorgo. Poza tym podjęto się opracowania i optymalizacji metody transformacji roślin sorgo z wykorzystaniem bakterii *Agrobacterium tumefaciens* oraz metody mikrowstrzeliwania DNA.

W pierwszym etapie niniejszej pracy przygotowano trzy konstrukcje genowe do modyfikacji tytoniu zawierające sekwencje kodujące 3 geny: fosfatazę sacharozofosforanową

(SPP, EC 3.1.3.24), pirofosforylaze UDP-glukozy (UGPaza, EC 2.7.7.9) oraz syntaze sacharozy (SuSy, EC 2.4.1.13). Konstrukcje genowe wprowadzono do genomu tytoniu metoda z wykorzystaniem bakterii *Agrobacterium tumefaciens* szczep EHA101. Analiza integracji metoda PCR wykazala obecnośc transgenów u 22 roślin z genem SPP, 2 roślin z genem UGPazy oraz 2 roślin z genem SuSy. Wszystkie rośliny z pokolenia F1 posiadały wbudowane transgeny do genomowego DNA. Ekspresję transgenów potwierdzono na poziomie mRNA za pomocą metody RT-PCR dla pokolenia F0 i F1. Wynik analizy PCR w czasie rzeczywistym pozwolił określić bezwzględną liczbę kopii transgenów pomiędzy 1-48. W pracy opracowano metody regeneracji *in vitro* roślin sorgo z trzech typów eksplantatów: wierzchołków pędów, pierwszego węzła pędu oraz izolowanych osi zarodkowych. Przeprowadzono transformacje sorgo z wykorzystaniem dwóch metod – za pomocą bakterii *Agrobacterium tumefaciens* i mikrowstrzelania DNA. Potwierdzono obecność transgenu SPS u jednej rośliny sorgo zregenerowanej z wierzchołka pędu odmiany SR1 otrzymanej za pośrednictwem bakterii *Agrobacterium tumefaciens*. Nie uzyskano żadnej rośliny transgenicznej za pośrednictwem metody biobalistycznej.

Niemniej jednak, niska wydajność transformacji spowodowana w głównej mierze przez metabolity wtórne, produkowane przez wszystkie eksplantaty, co skutkowało hamowaniem wzrostu i rozwoju roślin, stanowi poważne wyzwanie w kontekście dalszego skutecznego udoskonalania odmian sorgo. Optymistyczne wydaje się wykorzystanie całych roślin tytoniu i odpadów organicznych jakie generuje przemysł tytoniowy z przeznaczeniem do produkcji bioetanolu II generacji.

Małgorzata Karasiewicz