

דו"ח שנתי לתכנית מחקר מספר 15-1060-203

ייצור זני אגס ותפוח בעלי פוריות עצמית באמצעות מוטציה נקודתית מונחיית מטרה

**Development of self-fertile apple and pear by site directed mutagenesis.**

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות.

ע"י

משה פליישמן, רעות פאר, ירדנה דהן, המכון למדעי הצמח, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני

מרטין גולדוואי מיגל, קריית שמונה

רפי שטרן מו"פ צפון, קריית שמונה

**Moshe Flaishman**, Institute of plant Sciences, ARO, Volcani Center P.O.B. 6 Bet-Dagan 50250.

Email: [vhmoshea@volcani.agri.gov.li](mailto:vhmoshea@volcani.agri.gov.li)

Reut Peer, Institute of plant Sciences, ARO, Volcani Center P.O.B. 6 Bet-Dagan 50250.

Yardena Dehan, Institute of plant Sciences, ARO, Volcani Center P.O.B. 6 Bet-Dagan 50250.

Martin Goldway, Migal, Kiriath Semona

Raffi Stern, Mop Tzafon, Kiriath Semona

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים

הניסויים אינם מהווים המלצות לחקלאים.

תאריך: 17.03.16

חתימת החוקר \_\_\_\_\_

אין להפיץ ולהעביר את הדו"ח.

## תקציר

בשנים האחרונות פותחו מספר מערכות ייחודיות המאפשרות לבצע עריכה גנומית ספציפית ומונחית מטרה באמצעות נוקלאזות שחותכות dsDNA. בהמשך לחיתוך, מנגנון תיקון ה-DNA הטבעי בצמח גורם לעיתים קרובות לתיקון לקוי ועל ידי כך גורם להכנסת מוטציה קבועה בגן המטרה. טכנולוגיה זו הינה אחת ההתפתחויות החשובות ביותר בביוטכנולוגיה של צמחים בשנים האחרונות ופותחת פתח ליכולות רבות בתחום ההשבחה. יתר על כן, בישראל אושר לאחרונה שימוש מסחרי ללא מגבלות של תוצרי מוטגנזה מונחית מטרה. לאחרונה, יושמה לראשונה במעבדתנו הטכנולוגיה ליצירת מוטגנזה נקודתית באמצעות ZFN בעצי תפוח (Peer et al., 2014).

מבין השיטות ליצירת מוטגנזה מכוונת מטרה למערכת ה-CRISPER/Cas9 יתרונות רבים. הצעת המחקר שהוגשה ל-6 שנים אושרה רק כתוכנית ייתכנות **לביסוס מערכת CRISPER/Cas9 לעריכה גנומית בתפוח**.

בשנת היתכנות שאושרה בחנו ישום של מערכת ה-CRISPER/Cas9 כמערכת ליצירת מוטגנזה מכוונת מטרה בתפוח בדרכים הבאות:

1. יצירת צמחים טרנסגניים בעלי ביטוי קבוע של הגן hCas9 ובהינת פעילות hCas9 בצמחים אילו.
2. בחינת יעילות המערכת של CRISPR/CAS9 בתפוח באמצעות ביטוי חולף תוך שימוש במספר מערכות ביטוי: א. מערכת המשלבת וקטור חיידקי ווקטור ויראלי בצמחי תפוח WT ובהינת פעילות hCas9 בצמחים אילו. ב. באמצעות אגרובקטריום בצמחי תפוח WT ובהינת פעילות hCas9 בצמחים אילו.
3. פיתוח מערכת ליצירת מוטגנזה מכוונת מטרה בפרוטופלסטים של תפוח.
4. יצירת צמחי תפוח טרנסגניים מזן גלקסי עם מוטצייה נקודתית להשתקה ספציפית של הגן לאי התאם עצמי S-RNase-3.

**סיכום ומסקנות:** הוכחנו כי באמצעות מערכת של CRISPER/Cas9 ניתן לקבל מוטציה נקודתית בתפוח במספר גישות. בנוסף, יצרנו צמחים מותמרים עם מוטציה ספציפית להשתקה הגן לאי התאם. ממצאי התוכנית ההקדמית ישמשו אותנו להגשת תוכנית מלאה.

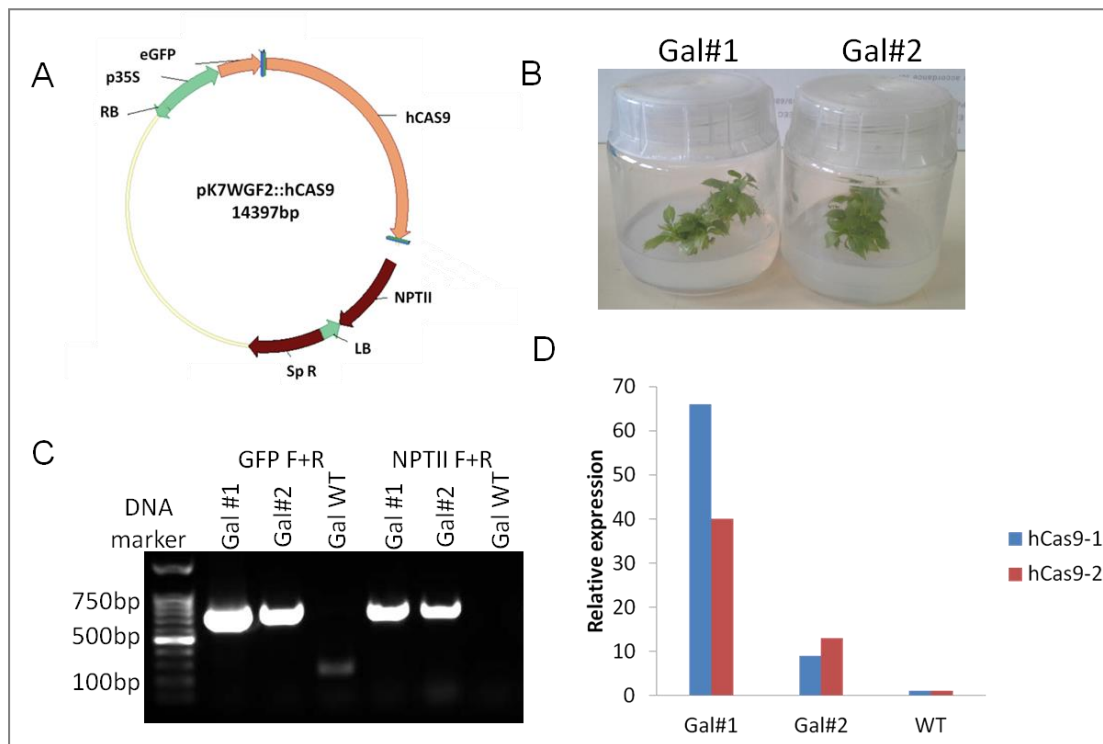
## מבוא

בשנים האחרונות פותחו מספר מערכות ייחודיות המאפשרות לבצע עריכה גנומית ספציפית ומונחית מטרה באמצעות נוקלאזות שחותכות ב-DNA. בהמשך לחיתוך, מנגנון תיקון ה-DNA הטבעי בצמח גורם לעיתים קרובות לתיקון לקוי של השבר ב-DNA ולהיווצרותה של מוטציה קבועה בגן המטרה. השימוש בטכנולוגיות ZFN, TALENs ולאחרונה CRISPR/CAS9 הוכח כשישם לביצוע שינויים גנטיים מכוונים במגוון רחב של תאים אנימאליים, חיות מודל, תאי אדם וכן צמחי מודל וצמחים בעלי ערך כלכלי. **טכנולוגיה זו מהווה**

את אחת ההתפתחויות החשובות ביותר בביוטכנולוגיה של צמחים בשנים האחרונות. יתר על כן, בישראל אושר לאחרונה שימוש מסחרי של תוצרי מוטגנזה מונחית מטרחה.

### תאור התוצאות

יצירת צמחי תפוח טרנסגניים בעלי ביטוי קבוע של הגן hCas9 ובחינת פעילות hCas9 בצמחים אילו. במטרה לבחון את פעילות hCas9 בתפוח יצרנו צמחי תפוח טרנסגניים בון גלקסי, המבטאים את הגן המקודד לחלבון hCas9 תחת הפרומוטר 35sP ומאוחה לחלבון GFP (תמונה 1A). התקבלו שני צמחים טרנסגניים לגדלו בתרביות על האנטיביוטיקה הסלקטיבית קנמיצין (תמונה 1B). החכה לקיומו של המחזר הטרנסגני בצמחי המותמרים התקבלה באמצעות PCR מיצוי DNA מהצמחים המותמרים (תמונה 1C). כדי לבחון את הביטוי של hCas9 בצמחים המותמרים נעשתה אנליזה לרמת הביטוי באמצעות real time PCR, ניתן לראות ביטוי חזק של hCas9 בצמחי GAL#1 ביחס לצמחי GAL#2 (תמונה 1D).



### תמונה 1- צמחי תפוח עם ביטוי קבוע של hCas9

**hCas9 transgenic Apple plants.** **A.** Schematic diagram of the binary vector used for Apple transformation, pK7WGF2::GFP that expresses the human codon usage Cas9 nuclease (Mali et al. Science 339, 823-826, 2013) with an N-terminal GFP tag from the 35S promoter in the plant tissue. **B.** Kanamycin treated transgenic Apple (Gal#1, Gal#2) lines. **C.** Transgene analysis of the kanamycin-resistance lines by PCR analysis of total DNA using different primers (as noted on the picture). **D.** Relative expression of hCas9

transcript- Two pairs of primers (**hCas9-1**, 5'-tcgaagagaacccgatcaac-3' and 5'-taccaaacaggccgttcttc-3'; **hCas9-2**, 5'-tcacgagcacatcgctaac-3' and 5'-ttgacgagttcatccacgac-3') were designed to test hCas9 expression level. cDNA of WT serves as the negative control.

לאחר ביסוס תרבית העלים הטרנסגנית לשדה יציב נעשו מספר ניסיונות רבים לבחון את פעילות hCas9 על ידי ביטוי חולף של פלסמידים שונים המכילים gRNA ספציפי לגן לאי התאם (לא מפורט). למרות הניסיונות הרבים שנעשו לא הצלחנו לגרום לשינויים בגן המטרה. יתכן, כפי שהוצע בעבר, שבצמחים המותמרים מתקיים מנגנון שמוריד את יעילות ההתמרה הנוספת. כיוון במערכת ההתמרה שביססנו בתפוח אין ברשותנו גורם סלקציה נוסף (אנטיביוטיקה או הרבציד שקיים במערכות אחרות) לא ניתן היה לבחון יצירת מוטציה במערכת קבועה. **לאור תוצאה זו החלטנו לבחון את יעילות המערכת של CRISPR/CAS9 בתפוח באמצעות ביטוי חולף תוך שימוש במספר מערכות ביטוי.**

**א. ביטוי חולף במערכת המשולבת וקטור חיידיקי ווקטור ויראלי בצמחי תפוח WT ובחינת פעילות hCas9 בצמחי תפוח.**

נבדקה היכולת לביטוי חולף של חלק ממרכיבי המערכת CRISPR/Cas9 באמצעות וירוס וקטור. לביטוי במערכת ויראלית יתרון היות וניתן לבטא את המרכיב הרצוי לתקופה הנדרשת ולאחר מכן לסלקו מהמערכת בקלות יחסית. לאחרונה הראו כי הוירוס TRV גורם להשתקת גנים בורדניים (Tian et al., 2014). אנו בוחנים כעת את השימוש של TRV בתפוח, בשיתוף עם מעבדתו של פרופ' סשה וינשטיין בפקולטה לחקלאות ברחובות.

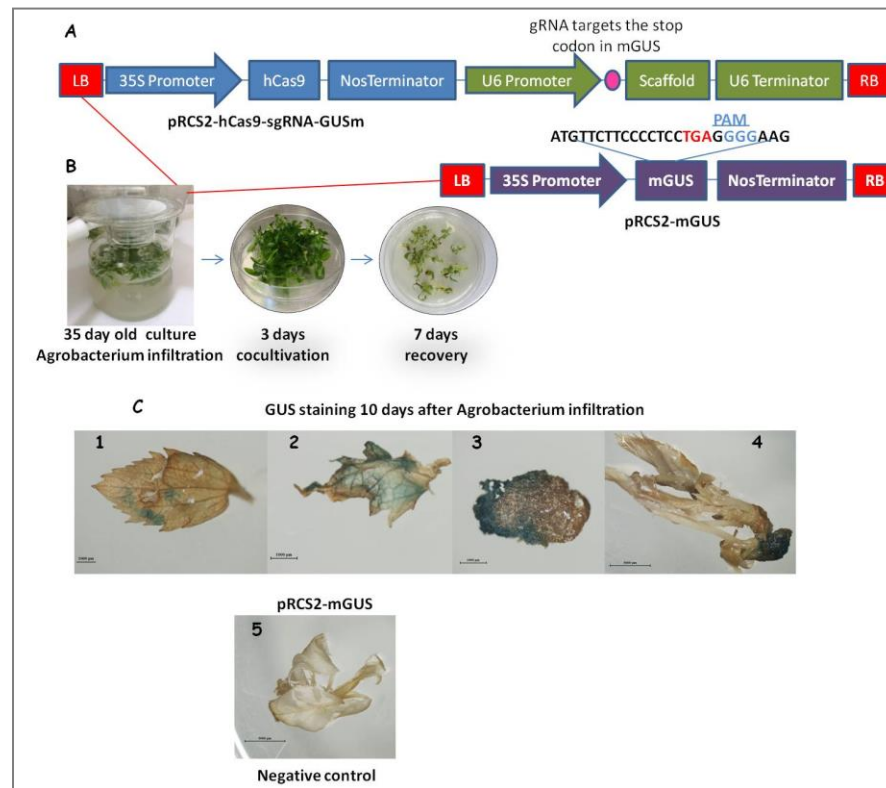
פעילות hCas9 בתרבית תפוח נבחנת באמצעות מבחן תיקון GUS מוטנטי. במערכת זו הוכנסה מוטציית STOP CODON לתחילת הגן uidA המקודד לחלבון GUS. מוטצייה זו גורמת לביטוי של חלבון לא פעיל בתאי הצמח (mGUS) (Tovkach et al. 2009). ביטוי חולף של הגן המדווח נעשה על ידי הוקטור הויראלי TRV, בעוד שמרכיבי המערכת hCAS9 ו-gRNA ספציפי כנגד המוטציה בוטאו על ידי וקטור בינארי באמצעות חיידיק אגרובקטריום. מערכת זו עדיין נבדקת ונכון לזמן כתיבת הדוח לא התקבלו תוצאות המעידות על פעילות hCas9 בצמחים המודבקים. אם זאת אנו מנסים שיטות הדבקה שונות וגילאי הדבקה שונים במטרה לייעל את תהליך ההדבקה.

**ב. באמצעות אגרובקטריום בצמחי תפוח WT ובחינת פעילות hCas9 בצמחים אילו במבחן תיקון של GUS מוטנטי.**

נבדקה פעילות hCas9 בתרבית תפוח באמצעות מבחן תיקון של mGUS (Tovkach et al. 2009). נבחן ביטוי חולף במקביל של שני פלסמידים הראשון מכיל את mGUS (pRCS2-35sP::mGUS), והשני את מרכיבי המערכת hCAS9 ו-gRNA ספציפי כנגד המוטציה mGUS

(CAS9 pRCS2-(Kan)-35sP::hCas9-U6::sgRNA-GUSm) שני המרכיבים בוטאו בוקטור בינארי באמצעות חיידק אגרובקטריום (תמונה 2). נעשה ביטוי חולף של מערכת זו בהתאם לפרוטוקולים שפותחו במעבדתנו (Peer et al., 2015). ניבחנו ביטוי של הגן המדווח GUS בעלים המודבקים. התקבלה צביעה של GUS המעידה על פעילות hCas9 בעלים ותיקון המוטציה בגן המדווח. צביעת ה-GUS התקבלה הן בעלים (תמונה 2C-1+2) והן בקאלוס (תמונה 2C-3+4). לא התקבלה צביעת GUS בעלי הביקורת אשר הודבקו הגן המוטנטי בלבד (תמונה 2C-5).

תוצאה זו מעידה כי באמצעות ביטוי חולף של מערכת CRISPR/Cas9 ניתן לייצר מוטגנזה מכוונת מטרה בתפוח.

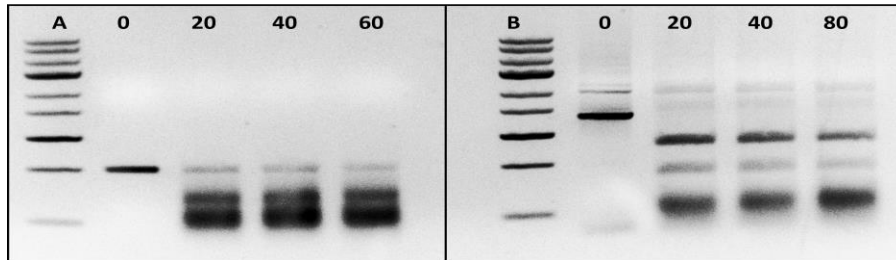


## תמונה 2- תיקון GUS מוטנטי באמצעות ביטוי חולף של מערכת CRISPR/Cas9

**A.** Schematic description of the two T-DNA. One contains 35s promoter-driven mGUS (pRCS2-35sP::mGUS) and the other contains 35s promoter-driven hCas9 and U6 promoter-driven gRNA targeting the STOP codon in the mGUS (pRCS2-(Kan)-35sP::hCas9-U6::sgRNA-GUSm). **B.** Two *A. tumefaciens* lines carrying each binary vector were mixed together and infiltrated into 35 day old Apple WT tissue culture by Agroinfiltration, following with 3 days cocultivation and 7 days of recovery. **C.** Histochemical GUS staining of 35-day-old tissue culture, 10 day after Agrobacterium infiltration.

### פיתוח מערכת ליצירת מוטגנזה מוכוונת מטרה בפרוטופלסטים של תפוח.

לאחרונה פורסמה עבודה שבה יצרו עריכה גנטית ללא ב-DNA זר וזאת על ידי הזרקת קומפלקס gRNA:Cas9 לתוך פרוטופלסטים (Woo et al., 2015). אנו מפתחים שיטה זו בתפוחים בשיתוף פעולה עם המעבדה של פרופ' אבי לוי במכון וייצמן. בשלב זה פותחו פרוטוקולים ליצירת פרוטופלסטים מתרבית רקמה. בנוסף פותח פרוטוקול ליצירת קומפלקס gRNA:Cas9 אשר הוכחה פעילותו *in-vitro* (תמונה 3).



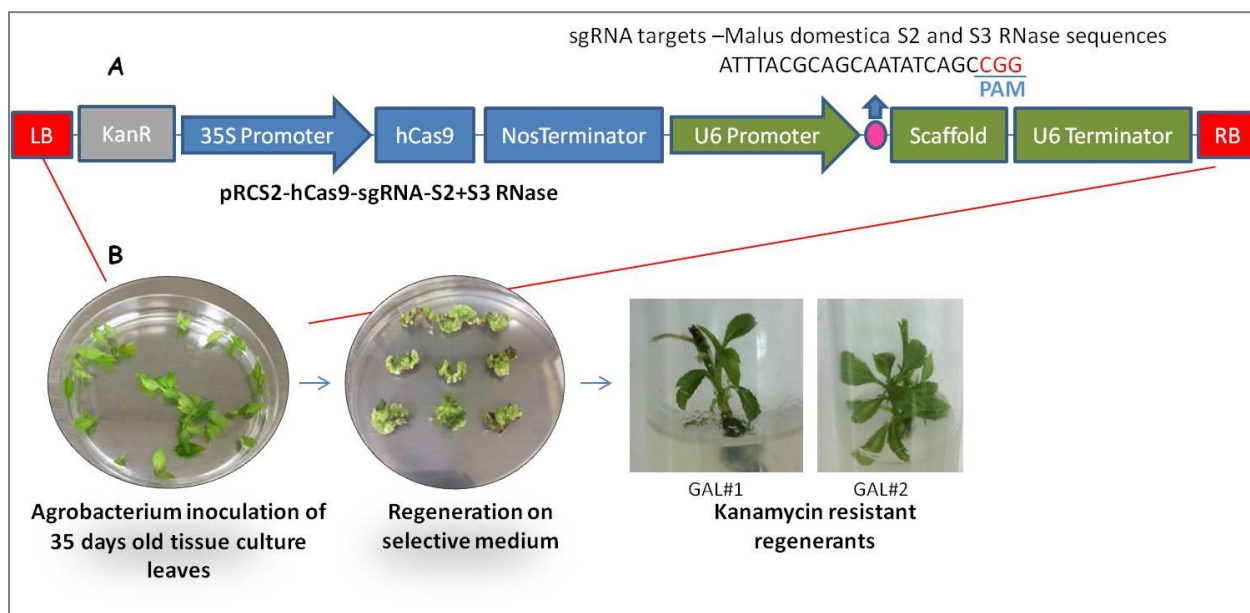
תמונה 3- יצירת קומפלקס gRNA:Cas9 ובחינת פעולתו *in-vitro*

#### **In-vitro cleavage of target S-RNases by preassembled gRNA:Cas9 complex. A.**

300bp PCR products of the S2-RNase cleaved to 170 and 130bp fragments. **B.** 600bp PCR products of the S5-RNase cleaved to 400 and 200bp fragments. Reactions were stopped at 20, 40 and 60 minutes and separated on a 2% gel-agarose.

### יצירת צמחי תפוח טרנסגניים מזון גלקסי עם מוטצייה נקודתית להשתקה ספציפית של הגן לאי התאם עצמי S-RNase-3.

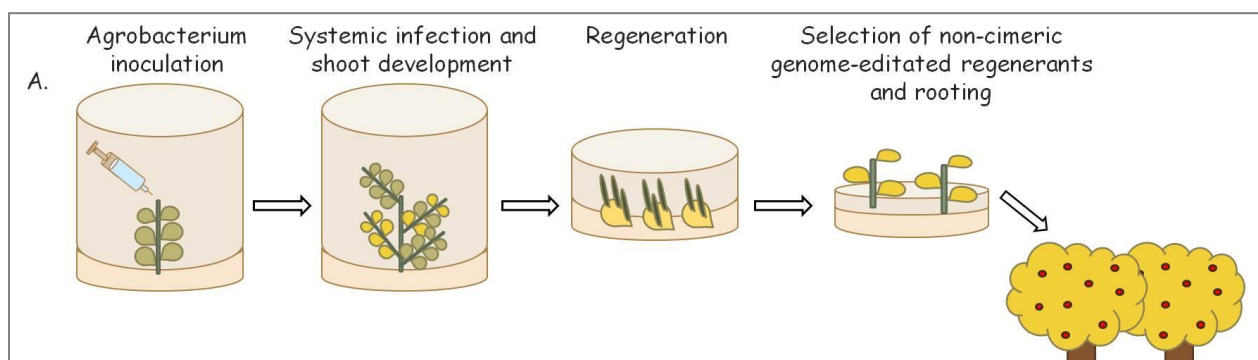
זני התפוח הגדלים כיום במטעים בישראל זקוקים להפריה, אי התאם העצמי מבוקר על ידי מנגנון תלוי RNase. השתקה של הגן המקודד ל-S-RNase 3 ניתן יהיה ליצור תפוחים ללא אי התאם עצמי. במטרה לבחון את פעילות hCas9 על גן אנדוגני בתפוח יצרנו צמחים טרנסגניים עם ביטוי מוגבר של hCas9-1 ו-gRNA כנגד הגן המקודד ל-S-RNase. בתמונה 4 ניתן לראות סכמה של מקטע ה-T-DNA שהוכנס לצמחים באמצעות טרנספורמציה קבועה עם אגרובקטריום (תמונה 4A). לאחרונה, התקבלו 2 צמחונים טרנסגניים (תמונה 4B) הגדלים על מצע סלקטיבי המכיל קנמיצין. נמצאים ברשותנו צמחים שמכיל את מנגנון יצירת המוטציה בגן המטרה לאי התאם. בכוונתנו להמשיך ולגדל צמחים אלו ולעקוב באמצעות PCR אנליזה מולקולארית וריצופים של המקטע על התפתחות מוטציה בגן המטרה בסקטורים שונים של הצמחים המתפתחים.



**תמונה 4- יצירת תפוחים טרנסגניים עם ביטוי קבוע של hCas9 ו-gRNA כנגד הגן לאי התאם עצמי**  
 Transgenic Apple plants. **a** Schematic diagram of the binary vector used for Apple transformation. **b** Kanamycin resistant -transgenic regenerates.

**סיכום ומסקנות**

בישראל אושר לאחרונה שימוש מסחרי ללא מגבלות של תוצרי מוטגנזה מונחית מטרה. הראנו בשנת המחקר הנוכחית כי במערכת של CRISPER/Cas9 ניתן לקבל עריכה גנומית ומוטציה בגן מטרה. בגישות העבודה השונות שפותחו ניתן באמצעות ביטוי חולף של מרכיבי המערכת לקבל מוצר אשר אינו מהונדס גנטית שיתאים ליישום במטעי ישראל. העברת המוטציה לעצים דורשת פיתוחים נוספים. בסכמת העבודה שמוצגת בתמונה מס' 5 ניתן לראות את מהלך העבודה המוצע על ידינו להשגת מטרה זו (בערך מתמונה שפורסמה ב- (Peer et al., 2015).



**תמונה 5- מהלך יצירת עץ בוגר המכיל מוטציה מוכוונת מטרה.**

## סיכום עם שאלות מנחות

<b>מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.</b>
כתוכנית ייתכנות לביסוס מערכת CRISPER/Cas9 לעריכה גנומית בתפוח.
<b>עיקרי הניסויים והתוצאות</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. יצירת צמחים טרנסגניים בעלי ביטוי קבוע של הגן hCas9 ובחינת פעילות hCas9 בצמחים אילו.</li> <li>2. בחינת יעילות המערכת של CRISPR/CAS9 בתפוח באמצעות ביטוי חולף תוך שימוש במספר מערכות ביטוי: א. מערכת המשלבת וקטור חיידקי ווקטור ויראלי בצמחי תפוח WT ובחינת פעילות hCas9 בצמחים אילו. ב. באמצעות אגרובקטריום בצמחי תפוח WT ובחינת פעילות hCas9 בצמחים אילו.</li> <li>3. פיתוח מערכת ליצירת מוטזנזה מכוונת מטרה בפרוטופלסטים של תפוח.</li> <li>4. יצירת צמחי תפוח טרנסגניים מזן גלקסי עם מוטציה נקודתית להשתקה ספציפית של הגן לאי התאם עצמי S-RNase-3. מצאנו כי באמצעות ביטוי חולף ניתן לקבל מוטציה נקודתית מונחיית מטרה בתפוח.</li> </ol>
<b>מסקנות מדעיות והשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדו"ח.</b>
מטרות תוכנית הייתכנות הושגו. הראנו כי מערכת של CRISPER/Cas9 ישימה בתפוח
<b>הבעיות שנתרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתרה לביצוע תוכנית המחקר.</b>
זו תוכנית יתכנות לשנה מטרות התוכנית הושגו ואנו מגישים אותה לתוכנית מלאה ליצירת מוטגנזה בגנים לאי התאם בתפוח.
<b>הפצת הידע בתקופת הדו"ח</b>
הידע לא הופץ.
<b>פרסום הדו"ח: אני ממליץ לא לפרסם את הדו"ח.</b>

## ספרות מצוטטת

Peer R., Rivlin G., Golobovitch S., Lapidot M., Gal-On A., Vainstein A., Tzfira T., Flaishman M. A., (2015). Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in perennial fruit trees. *Planta*. 241:941-951.

Tian, J., Pei, H., Zhang, S., Chen, J., Chen, W., Yang, R., ... & Ma, N. (2014). TRV-GFP: a modified Tobacco rattle virus vector for efficient and visualizable analysis of gene function. *Journal of experimental botany*, 65:311-322.



Tovkach A., Zeevi V., Tzfira T. (2010). Validation and expression of ZFNs in plant cells. *Methods Mol Cell Biol* 649:315–336.

Woo, J. W., Kim J., Kwon S.I., Corvalan C., Cho S.W., Kim H., Kim S., Kim S., Choe S., Kim J. (2015). DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *33*:1162–1165.