

תוכן עניינים:

1	תוכן עניינים
2	דף שער
3	תקציר
4	סכום עם שאלות מנחות
5	מבוא
5-6	מטרות המחקר והקדמה
6-21	פירוט עיקרי הניסויים-תוצאות (כולל איורים וטבלאות)
22	דיון וסכום
23	רשימת ספרות

דו"ח מסכם לתכנית מחקר מספר 132-1692-15

פיתוח מערכת של מוטגנזה 'מונחית גן מטרה' בעצי פרי ממשפחת הוורדניים ליצירת

פירות שאינם מתרככים.

**Development of site specific mutagenesis in Rosaceae fruit trees for
development of slow ripening fruits.**

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ע"י:

מחלקה למחלות צמחים וחקר עשבים, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן	עמית גל-און -
מחלקה מדעי עצי פרי, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן	משה פלישמן -
מחלקה חקר תוצרת חקלאית לאחר הקטיפה, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן	חיה פרידמן -
גנטיקה והשבחה, אוניברסיטה העברית, לחקלאות רחובות	אלכסנדר ויינשטיין -
חקר ירקות וגידולי שדה, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן	משה לפידות -
מחלקה חקר תוצרת חקלאית לאחר הקטיפה, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן	סוזן לוריא -

Amit Gal-On - Dept. Plant Pathology and weed science, ARO, amitg@volcani.agri.gov.il

Moshe Flaishman - Plant Sciences, Fruit Tree Sciences ARO, vhmshoa@volcani.agri.gov.il

Haya Friedman - Dept. Postharvest Science of Fresh Produce, ARO, hayafr@volcani.agri.gov.il

Alexander Vainstein - The Hebrew University of Jerusalem. Faculty of Agriculture,
alexander.vainstein@mail.huji.ac.il

Moshe Lapidot - Dept. Vegetable Research, ARO, lapidotm@volcani.agri.gov.il

Susan Lurie - Dept. Postharvest Science of Fresh Produce, ARO slurie43@volcani.agri.gov.il

הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים אינם מהווים המלצות לחקלאים

תאריך: 07/03/2015



חתימת החוקר

רשימת פרסומים שנבעו מהמחקר: פרסום אחד (Peer et al., 2014) והפרסום השני בהליכי הגשה.

תקציר

הצגת הבעיה: תהליך הקטיף בגלעיניים נמשך מספר רב של ימים ונסמך על העסקת כוח אדם רב בשתי תקופות עיקריות: הדילול וקטיף הפרי. הבשלה לא אחידה של הפירות על גבי העץ והתרככותם המוקדמת מחייבת העסקת עובדים לקטיף סלקטיבי וגורמת לאובדן תוצרת חקלאית ולנזקים כלכליים. היפותזה המחקר שעיקוב תהליך הבשלה והאחדתו יאפשר צמצום מועדי הקטיף, חיסכון בכוח עבודה.

מטרות המחקר: להאט את תהליכי ההבשלה וההתרככות בתפוח, על ידי פגיעה בגנים לבקרת יצירת אתילן בפרי, באמצעות הנוקלאזות מהונדסות zinc finger nuclease (ZFN) להשריית מוטציות בגני מטרה בתפוח.

שיטות העבודה: הנדסת ZFN לחיתוך גנים בתפוח ובמערכת מודל. בניית מערכת ויראלית לביטוי חולף של ה-ZFN מההונדס בתפוח. בחינה פיסולוגית ומולקולרית של ביטוי הגנים בזני תפוח המעורבים בתהליכי ההבשלה וההתרככות.

תוצאות עיקריות של המחקר: 1. בדיקת ייתכנות למוטגנזה במערכת המודל בתפוח - ייצרנו צמחוני תפוח מותמרים המבטאים גן מדווח מוטנטי שאינו פעיל של אנזים β -glucoronidase (GUS). באמצעות טרנספורמציה של ZFN מההונדס לזיהוי רצף המטרה, קבלנו צמחי תפוח בהם נעשו שינויים גנטיים בגן הפגום GUS ובחלק מהשינויים נעשה התיקון ב-DNA שהחזיר את הפעילות האנזימית של GUS. **2. בדיקת ייתכנות לפעילות ZFN מהונדסים לאתר המטרה של הגן ACS1 -**

נבנתה מערכת ZPNs להשתקת הגן ACS-1 של תפוח. בכדי לבחון את יעילות החיתוך של ZFN-AcsI נבנתה מערכת מודל בטבק לבחינת פעילותו באמצעות יצירת טבק טרנסגני המכיל את הגן המוטנטי GUS עם רצפי המטרה של הגן ACS1 מתפוח. במערכת מודל זו הצלחנו להראות פעילות ב-transient, אבל לא הצלחנו להראות פעילות יעילה של הנוקלאז מההונדסת (ZFN-AcsI) ולכן לא נעשה שימוש בתבניות אלו בתרביות של תפוח. **3. בחינת ביטוי גנים לבקרת הבשלה**

והתרככות - מצאנו שהביטוי של גנים מסוימים ממשפחת ה ACS דומה בשני זני התפוחים בעלי כושר אחסון; 'גלקסי' ו'גולדן דלישס', ושונה מאוד מפרופיל הביטוי בזן 'ענה' בעל כושר האחסון הנמוך. הגן ACC synthase-ACS3A מתבטא באופן שונה ב'ענה' בהשוואה לשני הזנים האחרים, ורמתו עולה בשלב שלפני הגדילה המסיבית. כמו כן, נבדקה רמת הביטוי בגנים המעורבים בהבשלה מקבוצת ה-MADS, ונמצא פרופיל ביטוי שונה בין 'ענה' לזנים האחרים בגנים ממשפחת

ה-SQUAMOSA וה-SEPALLATA והגן MADS8. **4. פיתוח וקטור ויראלי להשריית מוטגנזה בוורדניים.** הווירוס ACLSV שקיומו היה ידוע בארץ נבחר כווירוס המתאים לביטוי ZFN. נעשתה סריקה של עצי תפוח ממקומות שונים בארץ ואותרו עצים נגועים באזורי גידול שונים. אפיינו מספר תבדידים של הווירוס בארץ שלהם רצפים שונים. נבנה קלון שלם של הווירוס ACLSV בוצעו ניסויים להדבקה של הקלון השלם אך לא התקבל אינפקטיביות של הווירוס על צמחי בוחן שונים.

כמערכת אלטרנטיבית, התקבל במעבדה קלון של הווירוס ALSV. נבנה קלון אינפקטיבי של ALSV המבטא את הגן GFP ומשתיק את הגן PDS בדלועים. נעשו מספר רב של ניסיונות הדבקה של תפוח עם וקטור זה ולא התקבלה הדבקה. אנו מניחים שצריך לבחון זנים נוספים של תפוח לקבלת הדבקה. **מסקנות והמלצות:** במחקר זה הצלחנו לפתח מערכת מודל מוטגנזה של ZFN ולאפיין גנים אפשריים שמעורבים בהתרככות הפרי. לא הצלחנו להנדס ZFN יעיל לחיתוך אתר המטרה של הגן ACS1 במערכת מודל של טבק ולא הצלחנו לבנות מערכת של וירוס וקטור יעיל לביטוי ZFN בתפוח. לאור היעילות הנמוכה של ZFN קבוצות המחקר המעורבות במחקר החלו לבצע מחקרים מקבילים עם CRISPR/Cas9.

סכום עם שאלות מנחות:

✓ מטרת המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.

1. פיתוח תשתית למוטגנזה בתפוח באמצעות הנדסת ZFN.
2. אפיון מהלך הביטוי של גנים מבקרי יצירת אתילן והתרככות בתפוח.
3. הנדסת אנזימי רסטריקציה ZFN ייחודיים ליצירת מוטציות בגנים אלו.
4. בחינת פעילות של ZFN מהונדס לחיתוך הגן *ASCI* במערכת מודל בטבק.
5. בניית מערכת של וירוס וקטור לביטוי חולף של ZFN בתפוח.
6. השתקת הביטוי של גנים מבקרי יצירת אתילן והתרככות הפרי בתפוח.

✓ אלו ממטרות המחקר הושגו בעבודת המחקר הנוכחית.

המטרות 1-4 הושגו ברובן, בעוד שמטרה 4-5 הושגו בחלקן ומטרה 6 לא הושגה.

✓ עיקרי התוצאות.

- הוכחה היתכנות למוטגנזה מכוונת בצמחונים של תפוח באמצעות במערכת מודל עם הגן המדווח GUS.
- אופיינו גנים מועמדים המעורבים בהתרככות הפרי באמצעות השוואת הביטוי בזן 'ענה' בו ההתרככות מהירה לעומת הזנים 'גלקסי' ו-'גודלן דל'ס'.
- הונדסו נוקלאזות ZFN ייחודיות ליצירת מוטציות בגן הנבחר *ASCI*.
- נבנו שני וקטורים ויראליים לביטוי חולף של ZFN. האחד *ACLSV* שלא היה אינפקטיבי והשני *ALSV-GFP* שהיה אינפקטיבי על צמחי מודל טבק ומלפפון ולא על תפוח.

✓ המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו:

- המחקר פיתח יכולות טכנולוגיות למוטגנזה מכוונת בתפוח שמהווים תשתית מדעית להמשך.
- במחקר אופיינו מספר גנים קנדידטים המעורבים בהתרככות התפוח, ויש לבחון מוטגנזה בהם.
- השימוש בוורוסים כווקטורים אינו ישים בטכנולוגיות החדשות בעצים.

✓ בעיות שונות/או השינויים שחלו במהלך העבודה.

- לאור ההתפתחויות הטכנולוגיות החדשות בתחום של עריכה גנטית, יש להשתמש ביידע שנצבר במחקר הנוכחי לשימוש בטכנולוגיה של CRISPR/Cas9. במחקר הנוכחי לא הגענו לשלב של בידוד תאים מוטנטים וקבלת צמחונים מתאים אלו. לאור ההצלחה שפורסמה ביישום הטכנולוגיה בפרוטופלאסטים, יתכן שזו דרך מועדפת ליצירת צמחונים מוטנטים בתפוח וכדאי לבחון זאת.

✓ האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח.

כן, פורסם מאמר (Peer et al., 2014) ומאמר נוסף בתחום של גנים המעורבים בהבשלת תפוח ישלח בקרוב.

✓ אני ממליץ לפרסם את הדוח.

מבוא ותיאור הבעיה

תהליך התפתחות הפרי עד להבשלתו הוא תהליך דינמי המושפע מגורמים רבים, משתתפים בו אנזימים רבים הקשורים לתהליכי פירוק עמילן ויצירת סוכרים, אנזימים הקשורים לפירוק חומצות אורגניות, ליצירת חומרי טעם וריח ולהתרככות הפרי. רכיבים מולקולאריים התגלו גם בפירות ממשפחת הורדניים ועבור רבים מהם קיימות גם הוכחות ישירות למעורבותם בתהליך ההבשלה. ביסוד תוכנית המחקר הנוכחית עומד הרעיון של שימוש בטכנולוגיות חדישות של עריכה גנומית באמצעות zinc finger nuclease (ZFN). הכוונה לבטא חלבוני ZFN במערכות שונות בכדי לפגוע בגנים מבקרי הבשלת הפרי ללא גרימת השינויים האופייניים הנובעים מהחדרת דנ"א זר באמצעות התמרה גנטית. המחקר מציע להשרות מוטציות ממוקדות בגנים מווסתי אתילן ACC סינתז ו-ACC אוקסידז שהם הכרחיים לתהליך הבשלת והתרככות הפרי.

מטרות המחקר

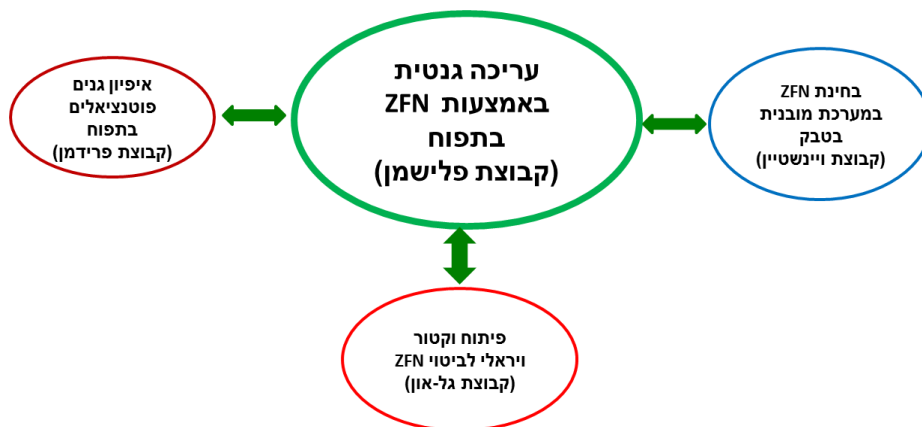
מטרת המחקר היא פיתוח זני תפוח בהם ההבשלה וההתרככות של הפירות יואט. מטרת המחקר תושג על ידי פיתוח מערכת מוטגנזה ספציפית בגנים לבקרת יצירת אתילן בפרי, המערכת מתבססת על הנדסת נוקלאז ZFN להשריית מוטציות קבועות בגני מטרה בצמחים, ועל השימוש בווקטור-וירוס וטרנספורמציה חולפת ליצירת צמחים מוטנטים שאינם טרנסגניים. באופן ספציפי אנו מציעים לבצע:

- א. פיתוח פלטפורמה מבוססת אגרובקטריום לביטוי חולף (ללא התמרה גנטית קבועה) של נוקלאזות מהנדסות-ZFN לצורך השתקה סימולטנית של מספר גנים במסלול ביוסינטיזת האתילן בתפוח.
- ב. אפיון מהלך הביטוי של גנים ידועים מבקרי יצירת אתילן והתרככות בתפוח.
- ג. הנדסת נוקלאזות ZFN ייחודיים ליצירת מוטציות בגנים אלו.
- ד. השתקת הביטוי של גנים מבקרי יצירת אתילן והתרככות הפרי בתפוח.

ראוי לציין, שהמחקר המקורי נכתב לשש שנים ואושר לשלוש שנים, ולכן מטרות המחקר התמקדו רק במוטגנזה של תפוח.

הקדמה:

המחקר שבוצע הוא מחקר אינטרדיסציפלינרי שכלל ארבע קבוצות מחקר: קבוצת המחקר של דר' פליישמן שעסקה בהנדסת ZFN לחיתוך גן המטרה ופיתחה את המוטגנזה בתפוח; קבוצת המחקר של דר' ויינשטיין שבחנה את פעילות ה-ZFN המהונדסים במערכת מודל של טבק; קבוצת המחקר של דר' גל-און שעסקה בפיתוח וקטור ויראלי לביטוי חולף של ה-ZFN המהונדס; וקבוצתה של דר' פרידמן שאפיינה את הגנים הקנדידטים בתפוח המעורבים בהתרככות הפרי. מבנה הפעילות של המחקר והקשר המחקרי בין הקבוצות מוצג בסכמה הבאה:

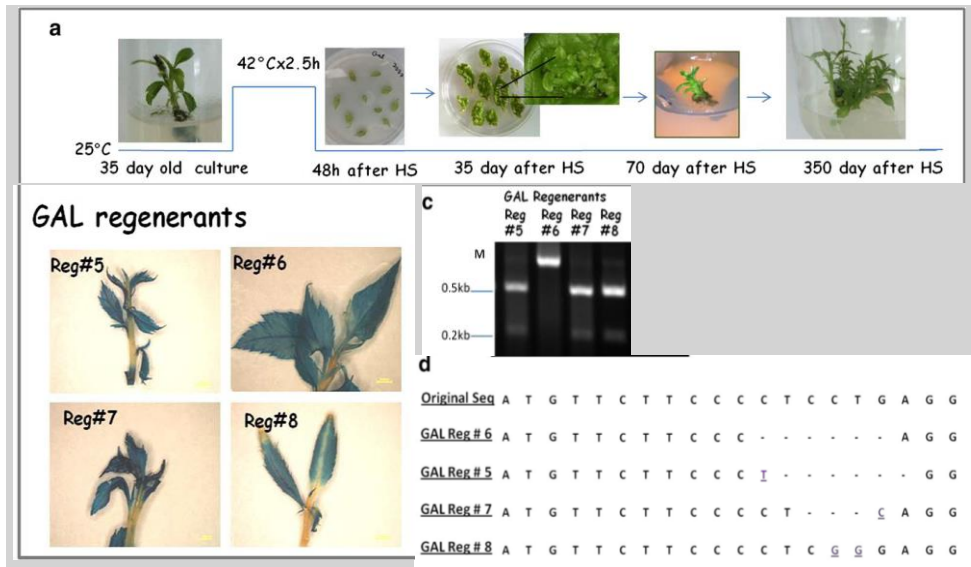


עריכה גנטית (Genome Editing) היא דרך להחדרת שינויים ממוקדים בגנים נבחרים. טיפוח בדרך זו יתרונו שהוא מבוצע ישירות בקווי טיפוח או בזנים מסחריים. קימות ארבע טכנולוגיות עיקריות לעריכה גנטית בצמחים המבוססות על נוקלאזות מכוונות מטרה ZFN, Mega-nuclease, TALEN, CRISPR/Cas9 (Gaj et al., 2013; Liu et al., 2016). באת כתיבת הצעת המחקר הטכנולוגיה המועדפת הייתה של ZFN ובגלל המומחיות שהייתה ברשותנו, הדרכה של מדענים מובילים בתחום דר' צבי צפירה שהדריך את צוות המחקר של דר. פלישמון ודר' ויינשטיין שפיתה מערכת דומה בפרחים. במהלך המחקר הופיעו פרסומים ראשונים על שימוש במערכת יעילה ומתקדמת יותר בצמחים של CRISPR/Cas9. המחקר הנוכחי נמשך על פי תוכנית העבודה ובמקביל נערכנו לעבור לשימוש ב-CRISPR/Cas9. ראוי לציין, שלמיטב ידענו מרבית המעבדות בעולם הפסיקו את השימוש ב-ZFN בצמחים בדומה לנו.

פעילות עיקרי הניסויים - תוצאות:

1. בחינת מערכת לעריכה גנומית בתפוח באמצעות ZFNs.

כתחילה בחנו את היתכנות של יצרת מוטציות מכוונות בתפוח. לשם כך, יצרנו צמחי תפוח מזן Galaxy המבטאים את הגן המדווח GUS-m שהוכנסה בו מוטציה frameshift mutation- כך שהוא אינו מבטא את האנזים. הראנו כי ניתן לקבל תיקון באמצעות אנזים ZFN מהונדס ספציפי לרצף המוטציה. קבלנו צמחי תפוח בהם נעשה התיקון והם הראו צביעה כחולה אופיינית לגן המדווח GUS. מצאנו כי בתפוח מתקבלות מוטציות חסר שונות. בהמשך בנינו מערכת רגנרציה לקבלת צמחים אחידים בהם יש את המוטציה (איור מס' 1a). מצאנו כי מרבית הרגנרנטים הם כימרים למאט רגנרנט מס' 6 (איור 1b-d). המערכת שיצרנו סוכמה במאמר (Peer et al., 2014). המחקר הראה שניתן לבצע עריכה גנומית בתפוח באמצעות ZFNs. קבלנו צמחי תפוח בהם נעשה התיקון. בחנו על ידי ריצוף ה-DNA את מהות התיקון והמוטציות האחרות שהתקבלו באמצעות הפעלת ZFN. מצאנו כי בתפוח מתקבלות מוטציות שונות בהמשך בנינו מערכת רגנרציה לקבלת צמחים אחידים בהם יש את המוטציה.



איור 1. הוכחת ייתכנות של מוטגנזה ספציפית בגן GUS הפגוע.

1. בחינת מערכת יתכנות ל-ZFN בתפוח

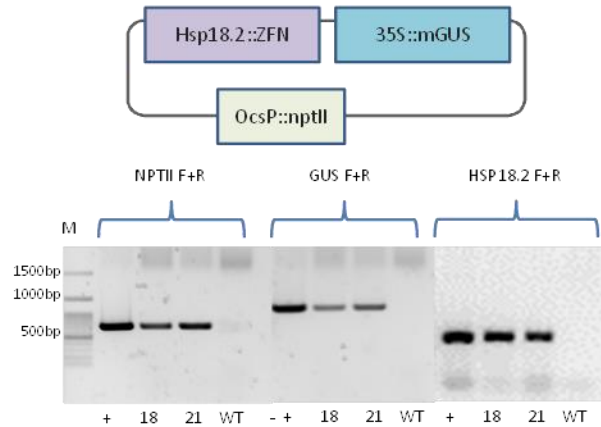
בעבודה זו לראשונה נבדקה ההיתכנות של ZFN בתפוח. על מנת לבחון את הייתכנות של ZFN בתפוח מון Galaxy ייצרנו צמחי תפוח מותמרים המבטאים גן המדווח שהוכנסה בו מוטציה. בחנו את האפשרות לקבל את תיקון המוטציה באמצעות אנזים ZFN ספציפי לרצף המוטציה. מערכת המבחן התבססה על הגן המדווח המקודד לחלבון GUS. הגן מקודד לאנזים β -glucuronidase המפרק סובסטרט שנקרא X-Gluc לתוצר יציב בעל צבע כחול שניתן לראותו. קבלנו צמחי תפוח בהם נעשה התיקון. בחנו על ידי ריצוף ה-DNA את מהות התיקון והמוטציות האחרות שהתקבלו באמצעות הפעלת ZFN. מצאנו כי בתפוח מתקבלות מוטציות שונות בהמשך בנינו מערכת רגנרציה לקבלת צמחים אחידים בהם יש את המוטציה.

בחינת הייתכנות של ZFN ביצירת מוטציה מכוונת מטרה בתפוח

א. יצירת צמחי תפוח מותמרים גנטית המבטאים את המקטע HSP18.2::ZFN-35sP::mGUS ליצירת צמחי תפוח מותמרים השתמשנו בפלסמיד הבינארי pRCS2-35sP::mGUS-HSP18.2::ZFN אשר התקבל ממעבדתו של ד"ר צבי צפירה מהמחלקה למדעי החיים, באוניברסיטת בן-גוריון. בפלסמיד זה הגן המדווח Beta-glucuronidase (GUS) נמצא תחת הבקרה של הפרומוטר הקונסטיטוטיבי 35sP, ומכיל מוטציה אשר הופכת אותו ללא פעיל. על מנת לתקנו יש צורך בביטוי של Zinc Finger Nuclease (ZFN) ספציפי המתוכנן כך שיזהה את המוטציה ויתקנה. בפלסמיד זה האנזים ZFN נמצא תחת הבקרה של Heat Shock Promoter (HSP), פרומוטר שפעיל בעקבות חשיפה לעקת חום. חשיפה של הפרומוטר לחום תגרום להפעלתו ולשעתוק של הגן המקודד ל-ZFN.

התקבלו 2 קווים מותמרים בלתי תלויים, #2318 וקו #2321. באיור 2 ניתן לראות אנליזת PCR של קווים אילו מול צמח .WT

pRCS2-(Kan)-(Hsp18.2::ZFN)-(35S::mGUS)

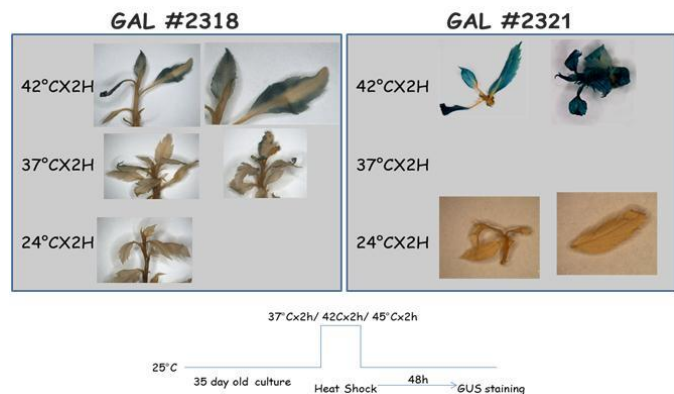


איור 2: צמחי תפוח מותמרים המכילים את המקטע pRCS2-35sP::mGUS-HSP18.2::ZFN

על מנת לבדוק האם הקווים המותמרים שהתקבלו מכילים את המקטע הרצוי הופק DNA מהעלים, ובאמצעות PCR עם פרימרים ספציפיים לכל גן נבדקה נוכחות הגן המקודד לעמידות לקנמיצין (*NPTII*), הגן המקודד לגן המדווח *GUS*, והמקטע המכיל את הפרומוטר *HSP18.2*. הפלסמיד המקורי שימש כביקורת חיובית ו-DNA מצמח לא מותמר (Wild Type) שימש כביקורת שלילית.

ב. בדיקת פעילות ZFN בצמחי (תפוח איור 3)

על מנת לבחון את פעילות ZFN בתפוח תרבית גידול יציבה בת 35 ימים נחשפה לעקת חום, 42°C למשך 2.5 שעות. הצמחים הועברו להתאוששות בחדר גידול בטמפרטורה 25°C למשך 48 שעות, ולאחר מכן נעשתה צביעת *GUS* במטרה לראות האם ZFN תיקן את המוטציה בגן המקודד ל-*GUS*. באיור 2 ניתן לראות ש-ZFN הצליח לתקן את המוטציה בגן המקודד ל-*GUS* בצמחי התפוח המותמרים. חשיפה של הצמחונים המותמרים ל- 42°C הובילה לביטוי של ZFN ובעקבותיו תיקון של המוטציה הנקודתית בגן המקודד ל-*GUS*, ניתן לראות שהתקבלה פעילות גבוהה של *GUS* בעלים ואף בגבעולים.



איור 3: בחינת הביטוי והפעילות ZFN בצמחי תפוח מותמרים.

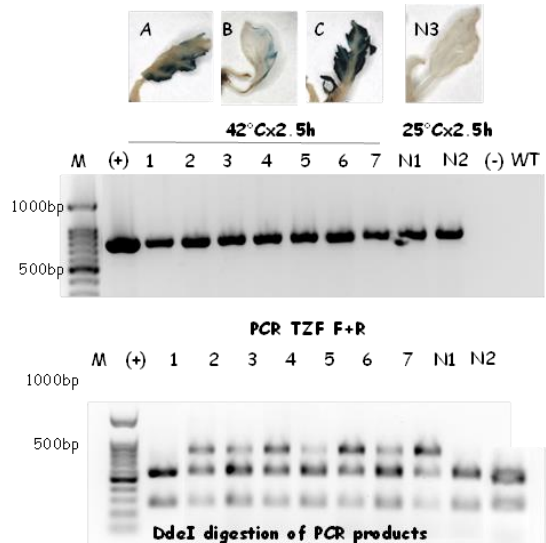
ג. אנליזה מולקולארית של תיקון הגן GUS באמצעות ZFN בתפוח (איור 4)

במטרה לבדוק את השינויים שנעשו ברצף הנוקליאוטידים נעשתה אנליזה מולקולארית לאתר התיקון של ZFN. צמחי התפוח המותמרים נחשפו לעקת חום (42°C למשך שעתיים וחצי), לאחר מכן הועברו לחדר גידול למשך 48 שעות ב- 25°C . באיור 3A ניתן לראות צביעת GUS של צמחים שנחשפו לחום וצמח ביקורת שלא נחשף לחום.

במטרה להגביר את האזור שעובר תיקון על ידי ZFN נעשתה ריאקציה PCR עם פרימרים ספציפיים התוחמים את אזור המוטציה משני צדדיה, כביקורת חיובית נלקחה דוגמת DNA של הפלסמיד המקורי pRCS2-35s:GUSm- HSP18.2:ZFN. באיור 3B ניתן לראות מקטע בן 800bp שהתקבל בצמחים המותמרים ולא התקבל בון הבר (WT).

על מנת להקל את ההבחנה ברצפים שעברו תיקון על ידי ZFN, המוטציה הקיימת בגן GUS תוכננה כך שבאתר ההכרה של ZFN במוטציה בגן המקודד ל-GUS קיים אתר חיתוך של אנזים ההגבלה *DdeI*. תיקון של המוטציה על ידי ZFN יוביל לשינוי ברצף הנוקליאוטידים ויבטל את אתר החיתוך של האנזים *DdeI*. על מנת לבדוק האם אכן נעשה תיקון של הרצף המוטנטי על ידי ZFN נעשה חיתוך של מקטעי ה-PCR המכילים את אתר התיקון על ידי אנזים ההגבלה *DdeI*. החיתוך נעשה בטמפרטורה של 37°C למשך שעה. כביקורת חיובית לחיתוך נעשה חיתוך של מקטע ה-PCR שהתקבל על

בסיס הפלסמיד המקורי. באיור 3C ניתן לראות את המקטעים שהתקבלו לאחר החיתוך. בדוגמאות שלא נחשפו לעקת החום, כמו גם בדוגמת הביקורת (+) התקבל חיתוך מלא של תוצר ה-PCR והתקבלו 2 מקטעים בגדלים 550bp ו-250bp. בדוגמאות שנחשפו לעקת החום (1-7), בהם קיימת תערובת של תאים שעברו תיקון ונצבעו בכחול ותאים שבהם לא התרחש תיקון ולכן לא נצבעו בכחול, התקבל חיתוך במקטעים שלא עברו תיקון ובנוסף ניתן לראות מקטע בן 800bp שלא נחתך. מקטע זה מעיד על כך שבדוגמאות אילו קיימים תאים בהם נעשה תיקון של המוטציה על ידי ZFN וכתוצאה מכך התבטל בהם אתר החיתוך לאנזים ההגבלה *DdeI*.



איור 4: אנליזה מולקולארית לתיקון הגן המוטנטי על ידי ZFN. A. צביעת GUS של צמחים מותמרים, B. ריאקציה PCR על דוגמאות DNA שהופקו מצמחים מותמרים, C. חיתוך תוצרי ה-PCR עם אנזים החיתוך *DdeI*. מקטעי ה-PCR שלא עברו חיתוך, משמע עברו תיקון של המוטציה והורדת אתר החיתוך של *DdeI*, בודדו מהגל, הוכנסו לפלסמיד pTZ57, ונשלחו לאנליזת ריצוף.

באיור 5 ניתן לראות את תוצאות הריצוף. באדום מסומן הרצף המקורי המכיל את המוטציה. בתחתית הטבלה, דוגמה N,

ניתן לראות רצוף של צמח הביקורת שלא נחשף לעקת חום, הרצף זהה לרצף המקורי ומכיל את אתר המוטציה.

בשאר הדוגמאות התקבל תיקון של אתר המוטציה, והורדה של מספר נוקליאטידים (מוצג כרבע ריק) ו/או הוספה של מספר נוקליאטידים (מסומן באדום). בדוגמאות 49 ו-51 התקבל תיקון תקין של הגן ונשמר הפריים לתרגום לחלבון.

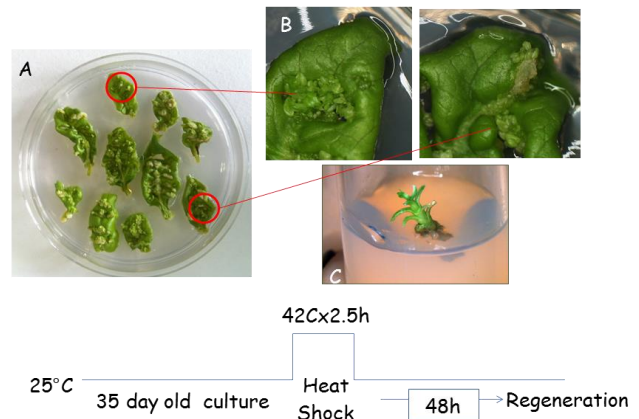
		Me	Se	Se	Pr	Se	*	Val	Glv	Al																		
		A	T	G	T	T	C	T	T	C	C	C	C	T	C	C	T	G	A	G	G	G	A	A	T	T	A	
G	4	A	T	G	T	T	C	T	T	C	C	C	T						G	G	G	G	A	A	T	T	A	
a	5	A	T	G	T	T	C	T	T	C	C	C	C	T					A	G	G	G	G	A	A	T	T	A
#	1	A	T	G	T	T	C	T	T	C	C	C	C	T					A	G	G	G	G	A	A	T	T	A
2	1	A	T	G	T	T	C	T	T	C	C	C	C	T					A	G	G	G	G	A	A	T	T	A
3	1	A	T	G	T	T	C	T	T	C	C	C	C	T					A	G	G	G	G	A	A	T	T	A
1	1	A	T	G	T	T	C	T	T	C	C	C	C	T					A	G	G	G	G	A	A	T	T	A
8	1	A	T	G	T	T	C	T	T	C	C	C	C	T					G	G	G	G	A	A	T	T	A	
G	2	A	T	G	T	T	C	T	T	C	C	C	C						G	G	G	A	A	T	T	A		
a	2	A	T	G	T	T	C	T	T	C	C	C	C	T					G	G	A	A	G	A	A	T	T	A
#	2	A	T	G	T	T	C	T	T	C	C	C	C	T					A	G	G	G	G	A	A	T	T	A
2	4	A	T	G	T	T	C	T	T	C	C	C	C	T	C	G	G	G	A	G	G	G	G	A	A	T	T	A
3	5	A	T	G	T	T	C	T	T	C	C	C	C	T					G	A	G	G	G	A	A	T	T	A
1	1	N	A	T	G	T	T	C	T	T	C	C	C	T	C	C	T	G	A	G	G	G	A	A	T	T	A	

איור 5: תוצרי הריצוף של מקטעי ה-PCR באזור המוטציה.

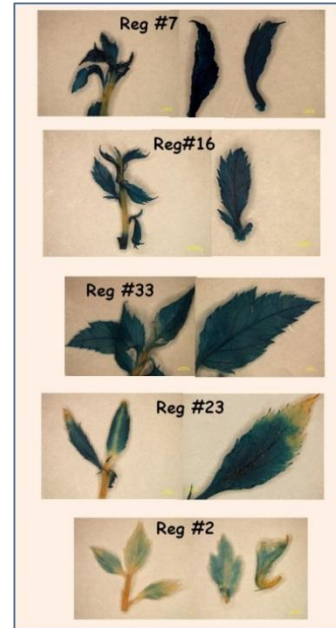
ד. יצירת צמח שלם המכיל את הגן המתוקן באמצעות רגנרציה

במטרה לצור צמח שלם המכיל את תיקון המוטציה צמחים מותמרים נחשפו לעקת חום במטרה לגרום לביטוי ZFN, 48 שעות לאחר מכן עלים הועברו לצלחות גידול עם מצע המעודד רגנרציה. 35 ימים לאחר החשיפה לחום התקבלו רגנרנטים (איור 6).

איור 6: התפתחות רגנרנטים מעלים של צמחים מותמרים לאחר חשיפה לעקת חום.



הרגנרנטים הועברו למצע גידול אופטימאלי. והועברו כל 35 ימים למצע טרי. לאחר 5 העברות נבדקה פעילות GUS בעלים. באיור 7 ניתן לראות שהתקבלה פעילות גבוהה של GUS במספר רגנרנטים, ניתן ללמוד מכך שהתיקון של המוטציה על ידי ZFN הינו יציב, ושניתן לקבל צמח מוטנטי שלם על ידי רגנרציה מעלים של צמחים שטופלו ב-ZFN.



איור 7: צביעת GUS של רגנרנטים שהתקבלו מעלים של צמחים שטופלו על ידי ZFN.

התוצאות המוצגות מלמדות שניתן לצור מוטציה מכוונת מטרה בתפוח באמצעות ZFN. מעבר לכך, המוטציה שהתקבלה הייתה יציבה והועברה בתרבויות לרגנרנטים.

2. הנדסת ZFN ליצירת מוטציה נקודתית בגן MdACS-1 בתפוחים מזן ענה וגלקסי

על סמך הידוע בספרות נבחר הגן MdACS-1 כגן פוטנציאלי אשר פגיעה בו תיתכן ותוביל לירידה בהתרככות הפרי. בשלב ראשון חיפשנו רצפים פוטנציאליים לקישור של ZFN לאורך הגן. רצף הגן מתפוח גולדן (*Malus Domestica*) הוכנס לתוכנה ZIFIT. נמצא רצף קישור פוטנציאלי - target sequence

ZFN-SP-5-1

2258 CTCCTCCTACTTCTTAGGTTGGCa 2282

2258 tGAGGAGGATGAAGAATCCAACCGt 2282

בין שני אתרי הקישור קיים רצף חיתוך של אנזים החיתוך Dde1 (CTTAG) שיתבטל במקרה של יצירת מוטציה נקודתית. בשלב שני נבדקה ההומולוגיה של רצף הקישור הפוטנציאלי בתפוח מהזן ענה ובתפוח מהזן גלקסי. בשני המקרים נמצאה זהות מלאה. בשלב שלישי נבחר רצף לסילנתות המקטעים המקודדים לאנזימי ה-ZFN אשר יקשרו לרצפי המטרה. הרצפים המסונתזים כפי שהוצעו באתר ZIFIT-

> Left-ZFN-SP-5-1

GAAAAAATCTAGACCCGGGAGCGCCCTTCCAGTGTGCGATTTGCATGCGGAACCTTTT
CGCGTCAGATGAACTTGGACCGTCATACCCGTAATCATAACCGGTGAAAAACCGTTTCAGT
GTCCGATCTGTATGCGAAATTTCTCCCGTCAGGACAACCTGGGTGTCATCTACGTACGC
ACACCGGCGAGAAGCCATTCGAATGCCGAATATGCATGCGCAACTTCAGTCGTCCAGAAAT
CTTTGCGTCCACACCTAAAAACCCACCTGAGGGGTTCCAAGAAGGA

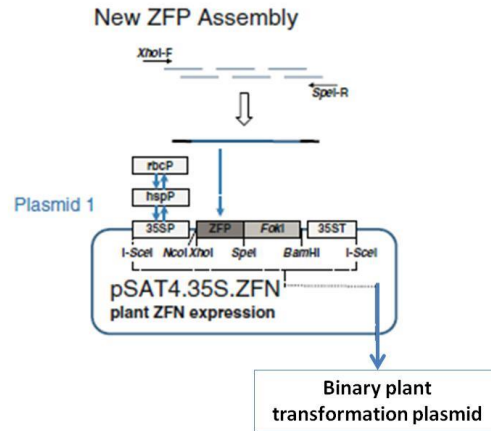
> Right-ZFN-SP-5-1

GAAAAAATCTAGACCCGGGAGCGCCCTTCCAGTGTGCGATTTGCATGCGGAACCTTTT
CGGCACCATCTAAATTGAAACGTCATACCCGTAATCATAACCGGTGAAAAACCGTTTCAGT

GTCGGATCTGTATGCGAAATTTCTCCATAAATCTTCTTTGACCCGTCATCTACGTACGC
 ACACCGGCGAGAAGCCATTCCAATGCCGAATATGCATGCCCAACTTCAGTCGTCCAGAAT
 CTTTGGCACCCACACCTAAAAACCCACCTGAGGGGa *TCCAAGAAGGA

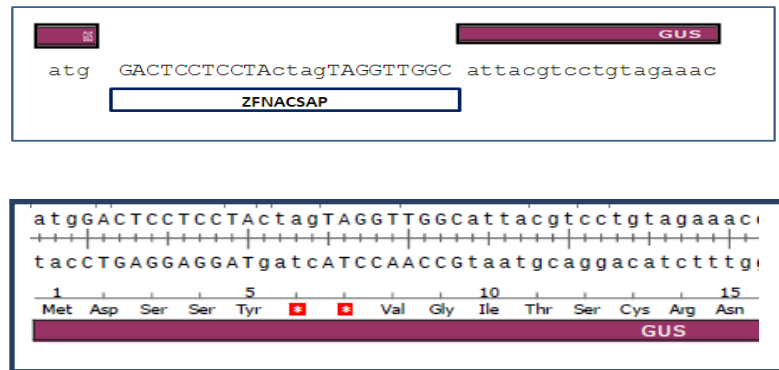
* T הוחלף ב-A על מנת לבטל אתר חיתוך של BamHI.

הרצפים הוכנסו לפלסמיד pUC5, ועל ידי שיבוט הועברו לפלסמיד המכיל את הנוקלאזה FokI-NLS-sp4.35-p, על ידי חיתוך עם אנזימי החיתוך XhoI ו-SpeI (איור 3). פלסמיד זה הועבר למעבדה של דר' סשה ויינשטיין להמשך שיבוט בפלסמיד בינארי. איור 3. תבנית בינארית של שיבוט הגן הסינטטי ZFN



3. הכרת רצפים וחיתוך רצפים ספציפיים בתפוח עץ.

מטרת המחקר היא לבדוק יכולת ZFN שהוכן, להכיר ולחתוך רצפים ספציפיים של MdACS-1 מתפוח עץ (AP). למטרה זו היה עלינו לבנות ולהחדיר רצף רלוונטי של ACS לתוך מסגרת הקריאה של GUS.

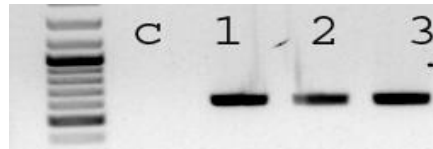


יצירת צמחי המטרה (Target) טרנסגנים לקונסטרקט GUS:zfn-ACSAP

בנתה תבנית המכילה את הגן GUS, ובתחילתו מקטע של הגן ACC synthase מתפוח עץ, המכיל קודון פסק. מקטע דנ"א זה הינו רצף מטרה לאנדונוקלאז ZFN שבמטרתנו לייצר במהלך מחקר זה. הקונסטרקט שנבנה, הוחדר לפלסמיד בינארי pCGN 1559 תחת בקרת פרומוטור 35S וטרמינטור OCS, הפלסמיד שהתקבל נקרא GUS:zfnACSAP

pCGN הפלסמיד הבינארי הוחדר לאגרובקטריום מזן AGLO ונעשתה טרנספורמציה לצמחי טבק. התקבלו צמחונים בתרבית שגודלו על סלקציה Kanamycin.

נבחרו להמשך העבודה 3 קווים שכוננו: 1,2,3 העמידים למצע הסלקציה. קווים אלו אומתו לנוכחות המחדר ע"י PCR (איור 8). ריצופו של המקטע הגנומי הוכיח את שלמות רצף המטרה, ללא שגיאות.



איור 8: אימות נוכחות המחדר GUS:zfnACSAP בצמחי טבק. PCR נעשה באמצעות פרימר המתאים לרצף הפרומוטור 35S ופרימר המתאים לגן GUS:zfnACSAP. הראקציה נעשתה על גבי דנ"א גנומי שהופק מהקווים 1, 2, 3, שעברו טרנספורמציה עם אגרובקטריום המכיל את הפלסמיד GUS:zfnACSAP pCGN. כביקורת (c), נלקח דנ"א שהופק מצמח הטרנסגני בפלסמיד המכיל גן לא רלוונטי.

שיבוט זוג ה-ZFN לפלסמידים בינאריים והחדרתם לצמחים טרנסגנים המכילים את רצף המטרה.

במקביל לשיבוט רצף המטרה לצמחי טבק, התקבלו מד"ר משה פלישמן פלסמידים שמכילים רצפים של אנדונוקלאזות מסוג ZFN, המתאימים לקישור לרצף המטרה שנמצא בגן ACC synthase, ואשר הוחדר לצמחי הטבק שתוארו לעיל. כל אחד מהמקטעים (Left-L, Right-R) אוהו בנפרד לרצף המקודד לאנדונוקלאז FokI באמצעות החדרתם לפלסמיד pSAT-NLS-FokI. רצפים אלו שובטו תחת בקרת הפרומוטור 35S. המקטעים רוצפו והוכחה שלמות הרצף, ונכונות מסגרת הקריאה. לבסוף כל אחד מהקסטות הנ"ל שובטו לפלסמידים בינאריים מסוג pRCS2, האחד (L) שמכיל גן עמידות להיגרומיצין, והשני (R) המכיל גן עמידות לקוטל העשבים בסטה. בצורה זו נוצרו: pRCS2-HygR- ZFN-L-ACSAP, pRCS2-BAR- ZFN-R-ACSAP

פלסמידים אלו רוצפו והוחדרו לחיידקי אגרו מסוג AGLO.

בחירת פעילות אנזימי ה-ZFN על רצף המטרה GUS:zfn-ACSAP

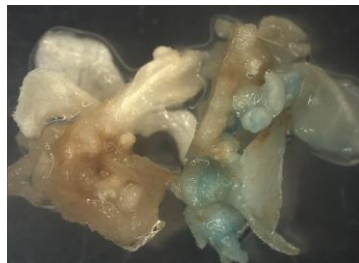
בכדי לבחון את יכולת ה-ZFN שנבנו לחתוך את רצף המטרה של ACC synthase, נקטנו במספר גישות:

1. **ביטוי חולף** - אינפקציה עם 2 אגרו שהכילו pRCS2-HygR- ZFN-L-ACSAP, pRCS2-BAR- ZFN-R- ACSAP, לדסקיות עלי טבק טרנסגנים המכילים מחדר GUS:zfnACSAP (קווים 1,2,3). צביעת GUS כשבוע לאחר הדבקה, הראתה פעילות GUS באחוז קטן של האקספלנטים.
2. **ביטוי קבוע** - בדומה לביטוי חולף, נעשתה קו-אינפקציה עם 2 אגרו שהכילו pRCS2-HygR- ZFN-L-ACSAP, pRCS2-BAR- ZFN-R-ACSAP, לדסקיות עלי טבק טרנסגנים המכילים מחדר GUS:zfnACSAP (קווים 1,2,3). הסלקציה לצמחים טרנסגניים נעשתה באמצעות שלוב 3 גורמי סלקציה: Kan, Hygro, BAR. בשלבים ראשונים של סלקציה, נבחנה פעילות האנזים GUS באקספלנטים בשלבים שונים של התמיינות (איור 9). ניתן לראות פעילות GUS בחלק מהאקספלנטים. סה"כ נעשו שלושה ניסויי טרנספורמציה שונים (טבלה 1). בכל ניסוי נבדקה פעילות של GUS חולפת (4-10 ימים), ובשלב יצירת קאלוסים לפני רגנרציה אמיתית (stable).

טבלה 1. סיכום צביעות GUS בניסויים השונים.

ניסוי 3 אקספלנטים 23DPI	ניסוי 3 טרנזיינט 10DPI	ניסוי 2 אקספלנטים 30DPI	ניסוי 2 טרנזיינט 10DPI	ניסוי 1 אקספלנטים 30DPI	ניסוי 1 טרנזיינט 10DPI	
-	-	-	-	-	+	Plant 1
++	++	+	+	++	++	Plant2
+	+	-	-	+	-	Plant 3

+ הפעלת GUS - אין הפעלת GUS



איור 9: צביעה היסטוכימית לפעילות האנזים GUS בשלבי רגנרציה ראשוניים של אקספלנטים מצמחי טבק. קו 2 (אקספלנט ימיני) הטרנסגני לגן המטרה (GUS:zfnACSAP) עבר קו-טרנספורמציה עם 2 אגרו שהכילו ZFN-L-Kan, ACSAP pRCS2-HygR- ACSAP, ZFN-R-ACSAP pRCS2-BAR- . הצמחונים גדלים על 3 מצעי סלקציה : Kan, Hygro, BAR. כביקורת (האקספלנט השמאלי) נלקח מצמח טרנסגני לגן המטרה (קו 2), שעבר טרנספורמציה בעזרת אגרובקטריום שהכיל גן לא רלוונטי.

התוצאות של הפעלת GUS (מוטגנזה) בשלושת הניסויים שהתבצעו (טבלה 1) מעידות על תיקון מסגרת הקריאה בצמחי המטרה הטרנסגנים ע"י נוקלאזות מסוג ZFN שהוכנו. נראה כי ל ZFN אלו יכולת הכרה וחיתוך של רצפים ספציפיים של ACS שמקורם בתפוח עץ.

על מנת להוכיח בצורה חד משמעית את התאמת ה ZFN לחיתוך רצף המטרה, הועמדו ניסויים אשר כללו בחינת צמחי טבק טרנסגניים שנוצרו ע"י הסלקציה המשולשת. המטרה להחזיר את פעילות האנזים GUS ולאיין את שינויים ברצף המטרה GUS:zfnACSAP. צוות החוקרים לא הצליח ליצור צמחים מוטמרים ולהוכיח את פעילות האנזים.

1. זיהוי גנים ממשפחת ממשפחת ה-ACO, ה-MADS וגנים נוספים הקשורים בהתרככות במספר זנים של

תפוחים בעלי הבדל בכושר האחסון.

ניתן לווסת את הבשלת פרי התפוח ובעיקר את ההתרככות שלו באמצעות פגיעה בגנים החולשים על שלושה תהליכים בהבשלה ובהתרככות: א. גורמי שעתוק האחראים על הבקרה של תהליך ההבשלה וביניהם נמצאים גנים ממשפחת ה-MADS; ב. גנים הקשורים לסינתזה (ACO ו-ACS), החישה ומרכיבי העברת האות של האתילן; ג. גנים הקשורים לסינתזה של מרכיבי דופן או לגנים המעורבים בבקרת ייצור רדיקלים חופשיים.

בשנתיים הראשונות שמנו דגש על הגנים הקשורים בסינתזה של האתילן בתפוח. גילינו כי במאגרי המידע המתארים את הגנים של הביוסינתזה קיים בלבול בשמות הגנים ולעיתים מייחסים שמות שונים לאתר ספציפי על פני ה-DNA וטרנסקריפט אחד מקודד על ידי מספר אתרים. המידע הזה סוכם בשתי טבלאות והוא יפורסם בהקדם במאמר ל-PBT (טבלה 2) (Mealiness in apple is associated with changes in specific ACC synthases genes).

במקביל עקבנו אחרי התבטאות גנים משתי המשפחות בשלושה זני תפוחים: 'ענה', 'גלקסי' ו'גולדן דלישס' אשר נבדלים זה מזה בכושר האחסון שלהם ובתהליכי ההתרככות; הזן 'ענה' בעל כושר השתמרות נחות באופן ברור יחסית לשני הזנים האחרים. בקרב הגנים של ACO רק הגן ACO4 היה דומה ב'גלקסי' וב'גולדן דלישס' ושונה מזה אשר 'בענה', אך ביטוי היה נמוך במהלך כל תהליך ההתפתחות של התפוח ואין אנו סבורים שתרומתו מכרעת לתהליך ההתרככות המואץ ב'ענה'. לעומת זאת, מצאנו שהביטוי של גנים מסוימים ממשפחת ה-ACS דומה בשני זני התפוחים בעלי כושר אחסון; 'גלקסי' ו'גולדן דלישס', ושונה מאוד מפרופיל הביטוי בזן 'ענה' בעל כושר האחסון הנמוך. הגן ACS3A מתבטא באופן שונה ב'ענה' בהשוואה לשני הזנים האחרים, ורמתו עולה בשלב שלפני הגדילה המסיבית. בספרות הועלתה ההצעה שגן זה אחראי על המעבר ממערכת 1 (מערכת אוטו-אינהיביטורית) למערכת 2 (מערכת אוטו-סטימולטורית) בייצור האתילן. לכן, ההנחה שלנו היא ש'ענה' כבר נמצא בשלב של הבשלה מתקדמת בשלב הקטיף בעוד שבזנים האחרים תהליך ההבשלה מעוכב. סביר להניח שפגיעה מדויקת בגן הזה תאט את תהליך ההבשלה בזן זה.

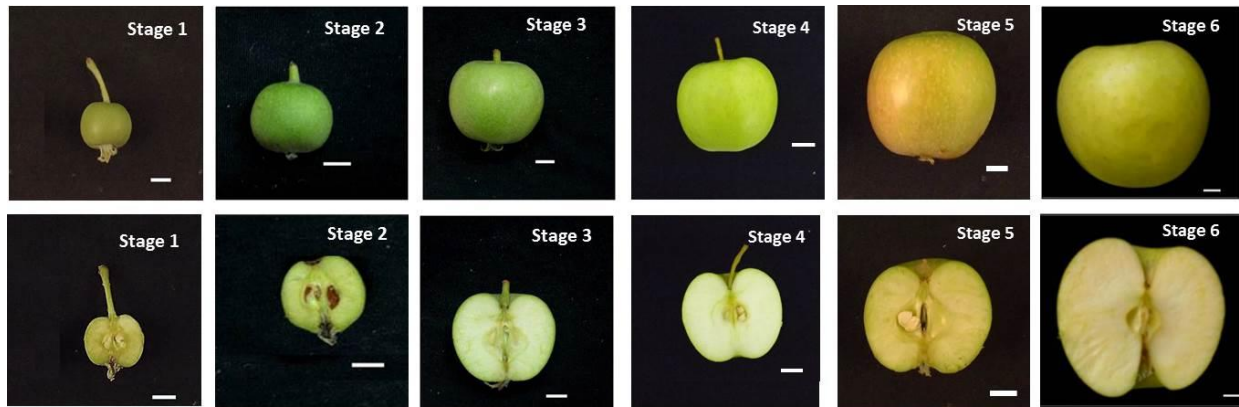
טבלה 2 מסכמת את השמות השונים שניתנו לגנים של ACS ואת המיקום שלהם על הכרומוזומים. נראה שקיימים 11 גנים המקודדים ל-ACS המתבטאים בפרי (באמצעות בדיקה של Q RT PCR). כוד נלמד מהטבלה שטרנסקריפט מסוג אחד יכול להיות מקודד ממספר מקומות על פני הגנום. לממצא זה יכולה להיות חשיבות רבה בבואנו לבצע מוטגנזה מכוונת מטרה בגן כמו ACS1.

טבלה 2: סיכום של כל הגנים המופיעים במאגרי המידע השונים המקודדים לאנזים ACS. כחול מציין גנים שנמצאו מבוטאים בפרי באמצעות Q RT PCR.

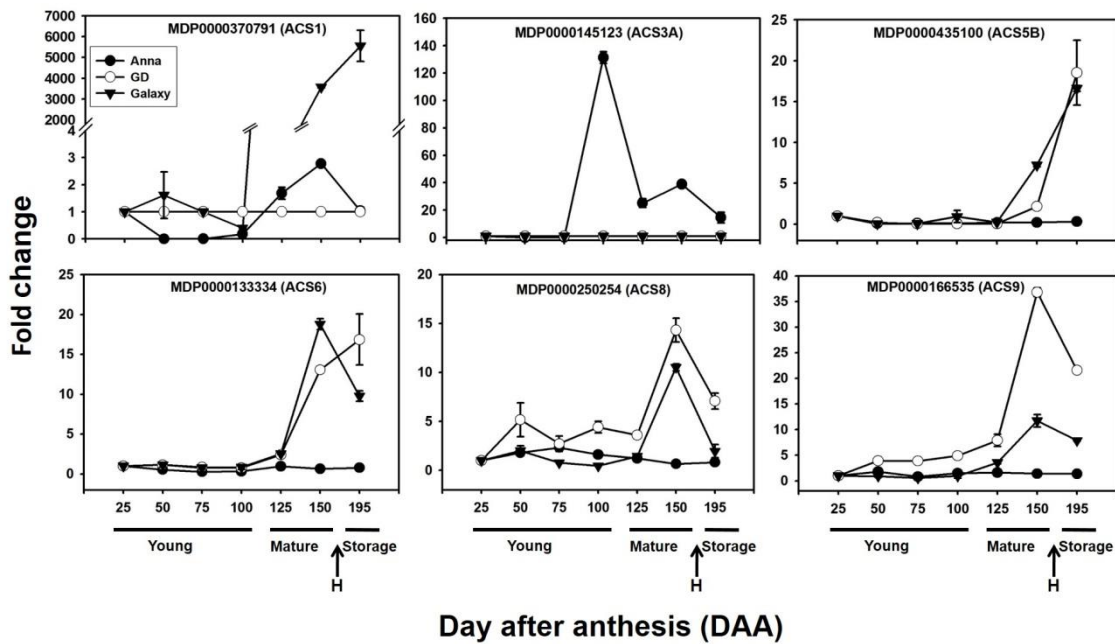
S.N.	APPLE PREDICTED PROTEIN	GENE	ACS Type	ACCESSION IN NCBI	IDENTITY TO GENE (%)	LOCATION	PEPTIDE LENGTH
1.	MDP0000370791	ACS1	Type-II	-	-	Unanchored:685537..687385	473
				DQ137849.1	99	Unanchored:685537..687385	473
				U89156 (GD)	99	Unanchored:685083..687484	473
				L31347.1 (GD)	99	Unanchored:685083..687484	473
				AJ011518.1 (GD)	99	Unanchored:685646..687281	403
				AF312737.1 (GS)	99	-	460
				AB010102.1 (GD)	99	-	473
2.	MDP0000145123	ACS3A	Type-III	-	-	chr13:32030632..32032337	446
				JF833308.1	99	chr13:32030632..32032337	446
				JF833309.1	99	chr13:32030632..32032337	446
				AB243060 (GD)	99	chr13:32030560..32032337	446
				U73816.1 (MI)	99	chr13:32030560..32032522	446
				AY821542.1 (GS)	99	-	408
3.	MDP0000406217	ACS3B	Type-III	-	-	chr2:5756294..5757868	393
				AB243061 (GD)	99	-	445
4.	MDP0000874578	ACS3C	Type-III	-	-	chr2:5735557..5737215	447
				AB243062 (GD)	97	chr2:5735454..5737200	446
5.	MDP0000262827	ACS4	Type-I	-	-	chr1:9880090..9882296	495
6.	MDP0000923426	ACS5A	Type-III	-	-	chr2:33731213..33733562	487
				AB034992	99	chr2:33730797..33733642	487
	MDP0000435100	ACS5B	Type-III	-	-	chr7:14188083..14190401	491
				AB034993	99	chr7:14188043..14190716	487
8.	MDP0000133334	ACS6	Type-I	-	-	chr1:24222638..24225153	559
9.	MDP0000508068	ACS7	Type-I	-	-	chr1:24297643..24300839	345
10.	MDP0000250254	ACS8	Type-I	-	-	chr6:10620365..10622922	500
11.	MDP0000166535	ACS9	Type-I	-	-	chr3:17711719..17716945	662
12.	MDP0000413933	ACS10	Type-II	-	-	chr9:9966399..9982296	663
13.	MDP0000203740	ACS11	Type-II	-	-	chr15:1162273..1163729	289
14.	MDP0000454938	ACS11	Type-II	-	-	chr15:1187928..1190212	429
15.	MDP0000535274	ACS12B	Type-I	-	-	chr14:349172..351626	312
16.	MDP0000321088	ACS12	Type-II	-	-	chr2:19705227..19707071	462
17.	MDP0000123248	ACS13	Type-III	-	-	chr7:14200818..14204430	503
18.	MDP0000232577	ACS14	Type-II	-	-	chr15:1160786..1165188	567
19.	MDP0000408853	ACS15	Type-I	-	-	chr1:24323482..24328019	292
20.	MDP0000308887	ACS16	Type-II	-	-	chr15:1183194..1185615	460
21.	MDP0000265383	ACS17	Type-I	-	-	chr1:22664736..22665994	108

נאספו דוגמאות תפוח משלבים שונים של התפתחות הפרי עבור שלושה זנים שונים: ענה, גלקסי וגולדן דלישס. שלבי ההתפתחות מתוארים באיור 10 (שישה שלבים שהמרחק ביניהם הוא כ- 25 יום). בנוסף, נלקחו דוגמאות לאחר אחסון של חודש ימים בקור כדי להעריך. הזן 'ענה' הוא המוקדם ביותר ואחריו באים 'גולדן דלישס' ו'גלקסי'. מצאנו שרמת האתילן ב'ענה' בקטיפ המסחרי (שלב 6) היא הגבוהה ובגלקסי היא נמוכה מבין כל הזנים האחרים. לאחר אחסון של חודש רמת המיץ ב'ענה' הייתה נמוכה בהשוואה לזנים האחרים. ממצאים אלה מאששים מסקנות קודמות שכושר האחסון של ענה לקוי.

איור 10: תיאור התפוחים שנלקחו לאנליזה עבור גולדן דלישס. תפוחים מהזנים האחרים נלקחו בדרגות דומות. מרחק בין דרגה אחת לשנייה הוא כ 25 ימים. נראה שדרגה 4 היא השלב לפני הגדילה המסיבית.



רמת הביטוי של הגנים המקודדים ל ACS שהוזכרו בטבלה 1 נקבעה באמצעות טכנולוגיית פלואידג'ים (Fluidigm). כאן נמצא שרק 6 גנים התבטאו ועליהם בוצעה האנליזה המתוארת באיור 11. התוצאות מלמדות שהביטוי של הגנים בשני התפוחים בעלי כושר אחסון גלקסי וגולדן דלישס דומה ושונה מאוד מפרופיל הביטוי ב'ענה'. הגנים המקודדים ל ACS5B, ACS6, ACS8, ACS9 נמצאו עולים בקטיף לרמה גבוהה והגנים ACS8 ו- ACS9 יורדים לאחר אחסון בעוד שהאחרים נשארים גבוהים גם באחסון. בנגוד לגנים הללו אופן הביטוי של הגן ACS3A שונה בענה בהשוואה לשני הזנים האחרים. רמת הביטוי של הגן עולה בשלב 4 הוא השלב שלפני הגדילה המסיבית. בספרות הועלתה ההצעה שגן זה אחראי על המעבר ממערכת 1 (מערכת אוטואינהיבטורית) למערכת 2 (מערכת אוטוסטימולטורית) בייצור האתילן. לכן ההנחה שלנו היא שענה כבר נמצא בשלב של הבשלה מתקדמת בשלב הקטיף בעוד שבזנים האחרים תהליך ההבשלה מעוכב. רמת הביטוי של הגן המקודד ל- ACS1 גבוהה מאוד בגלקסי עם הקטיף וכמעט ולא מתבטאת ב GD. לעומת זאת הביטוי ב'ענה' גם הוא עולה לקראת הקטיף, אך הרמה בהחלט מאוד נמוכה. תוצאות אלו לא יכולות להסביר את ההבדל בין הזנים הן בקצב ההבשלה המהיר ב'ענה' והן את תוצאות רמת האתילן הגבוהות בזן זה.

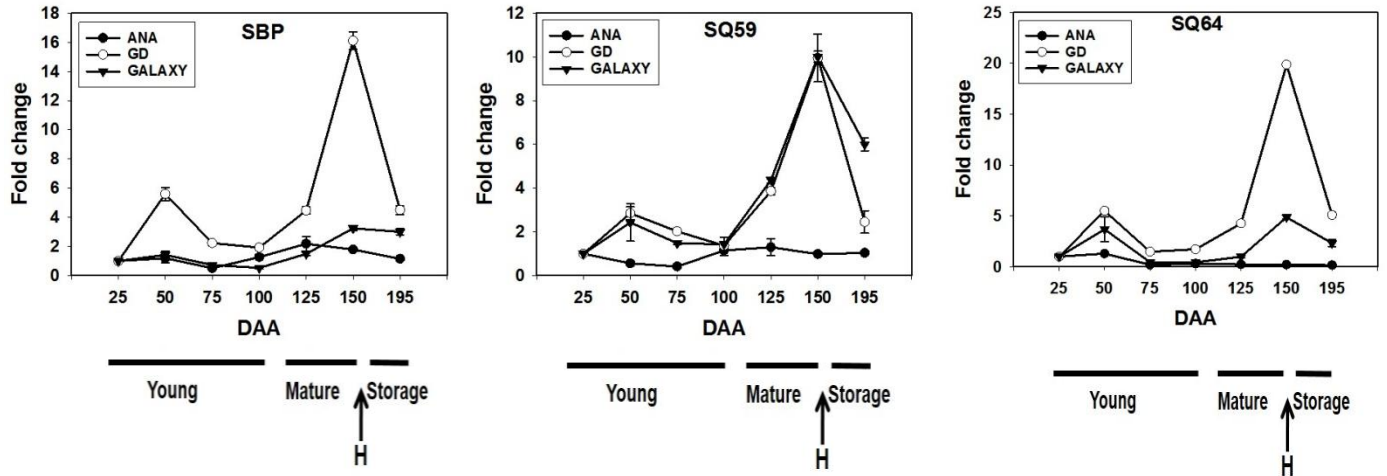


איור 11: רמת הביטוי של הגנים המקודדים ל ACS. במהלך התפתחות הפרי ואחסונו. רמת הביטוי נקבעה בשיטת ה $\Delta\Delta\text{Act}$ לאחר אנליזה באמצעות Fluidigm. נקודת הייחוס הייתה שלב 1.

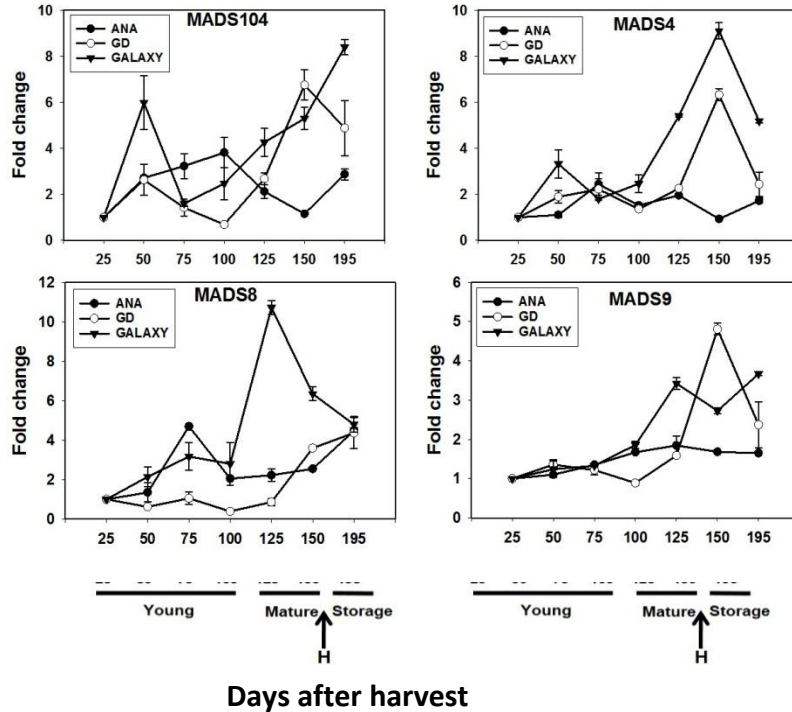
בספרות מדגישים במידה רבה הן את התרומה של ACS-3A ושל ACS1 לקצב ההתרככות ונמצאו קורלציות בין SNP לבין קצב התרככות או כושר השתמרות. לעומת זאת בעבודה שלנו אנו רואים ACS 3A תורם לפנוטיפ של התרככות מהירה בתפוח. כדאי לציין ששני אתרים על פני הגנום תורמים ליצירת הטרנסקריפט של גן זה.

במקביל לגנים הקשורים לביוסינתיזה בחנו גנים ממשפחת ה MADS. ידוע מתוך העבודה עם עגבנייה ועם בננה שהשתקה של גנים ממשפחת ה MADS גורמת להאטה בקצב ההבשלה ולמעשה כל העגבניות הקיימות היום במסחר נושאות גן קטוע של אחד מה (RIN)MADS שלא מאפשר את פעילותו כגורם שעתוק המגביר את ייצור האתילן. בעבודתנו בחנו נציגים משתי תת משפחות (איור 12). האחת ממשפחת ה SQUAMOSA (איור 12A) והשנייה ממשפחת ה SEPALLATA (איור 12B). נראה בבירור שעבור 'ענה' כל הגנים ממשפחת ה SQU שנובדקו לא משתנים במהלך ההבשלה בעוד שעבור שני הזנים האחרים הגנים הללו עלו קודם להופעת הפיק הקלימקטרי. תמונה דומה התקבלה גם עבור שלושה גנים ממשפחת ה SEP. הגן MADS 8 שונה בביטויו והוא עולה בשלב מאוד מוקדם של התפתחות הפרי 'בענה'. בשלב זה עדיין לא ברור אם יש לכך משמעות כלשהיא ויש צורך לבדוק גנים נוספים ממשפחת ה-MADS כדי להצביע על גן מרכזי החולש על ייצור האתילן כפי שנמצא בעגבנייה ובבננה.

A



B



איור 12: רמת הביטוי של נציגים משתי תת משפחות משפחת ה *SQUAMOSA* (איור A1) והשנייה ממשפחת ה *SEPALLATA* (איור B1). רמת הביטוי נקבעה בשיטת ה $\Delta\Delta\text{ct}$ לאחר אנליזה באמצעות Fluidigm.

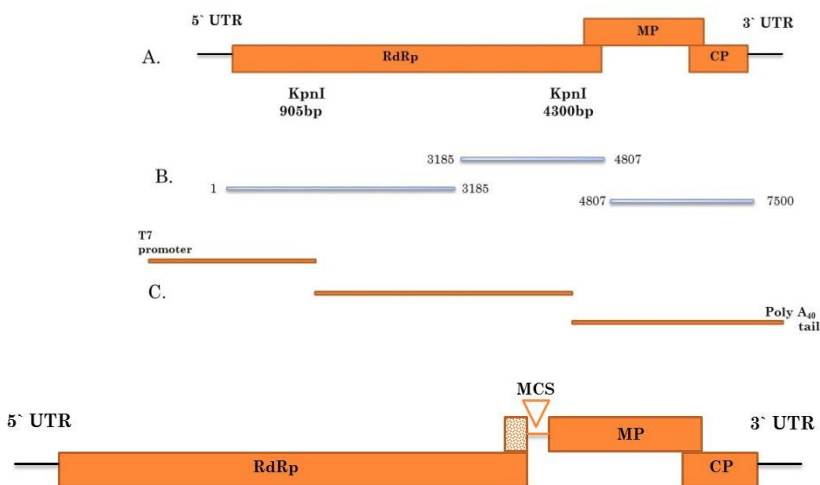
למרבית הפתעתנו ביטוי של הגן המקודד לפוליגלקטורנו, אנזים מפתח בפירוק הפקטין הנמצא בלמלת הביניים בין שני תאים סמוכים, ואשר הועלתה האפשרות שיש לו תפקיד מרכזי בהתרככות הפרי, לא השתנה במהלך התפתחות הפרי.

כמובן שכיוון זה לחיפוש גנים קנדידטים למניפולציה כדי להאריך את חיי המדף של הפרי לא מוצה עדיין וקיימים גנים נוספים שעשויים למלא תפקיד זה.

לסיכום נראה שכיום יש בידניו קנדידט אחד להשתקה והוא ה ACS-A3. השתקה של גן זה בתפוחים עשויה להאריך את משך שהותו של הפרי על העץ ועל ידי כך לצמצם את מספר הקטיפים ולהביא לחסכון בידיים עובדות מחד גיסא, ומאידך גיסא, למנוע נשירה הקיימת בהיקף גדול בזן זה.

2. בנית קלון ויראלי לצורך ביטוי חולף של ZFN בתפוח

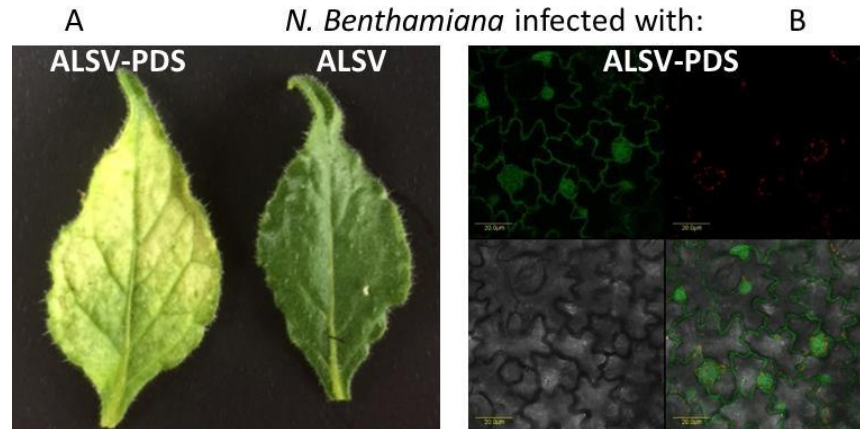
הווירוס (*Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) השייך לסוג *Trichovirus* במשפחת *Betaflexiviridae* נבחר כווירוס המתאים ביותר לביטוי ZFN בתפוח. נעשתה אנליזה של ריצוף מעצי תפוח שונים ונמצאה שונות גנטית בין התבדידים השונים. לאחר מכן בהתאם לרצפים הקיימים ב-GeneBank נבנה הקלון שלם עפ"י המהלכים המתוארים באיור 13. נבנה קלון שלם תחת הפרומוטר החיידקי של T7 RNA polymerase. נערכו מספר רב של ניסויי הדבקה עם טרנסקריפט שסונטז *in vitro*. לא הצלחנו לקבל ההדבקה על צמח בוחן טבק בנטמיאנה, נראה שהקלון שיצרנו הוא לא אינפקטיבי. ראוי לציין שבעבודה זו הצלחנו לרצף מספר תבדידים שונים של הווירוס ACLSV בארץ. היות שהקלון היה תקין על פי הרצף יתכן שהבעיה הייתה בייעילות יצירת תעתיקים עם Cap-, או שיצרנו תבדיד כימרי שמכיל רצפים של מספר תבדידים שמנע את האינפקטיביות. בכדי לקדם את היכולות של שימוש בקלון ויראלי הוחלט לבחור את הווירוס (*Apple latent spherical virus* (ALSV) אשר נבנה ואופיין בהצלחה מרובה ע"י קבוצה יפנית בגידולים שונים כולל תפוח (Yamagishi et al., 2011). לצורך כך נסע עמית ליפן והביא את הקלונים האינפקטיביים.



איור 13. מבנה הגנום של הווירוס (A), שלושת הקלונים ששובטו (אפור) (B), אסטרטגיית השיבוט לבנית הקלון האינפקטיבי (C)

הצלחנו לבחון בהצלחה את המערכת של ALSV החדרנו לגנום הווירוס את הגן GFP לביטוי יתר וחלק מהגן PDS להשתקה והראנו שהמערכת פעילה (איור 14).

איור 14. ביטוי הגן GFP והשתקת הגן PDS בצמחי מודל טבק. A. עלים מודבקים בוורוסים ALSV-PDS ו-ALSV שבועיים לאחר הדבקה. B. ביטוי של GFP בצמחים מודבקים ב-ALSV-GFP הסתכלות במיקרוסקופ קונפוקאלי.

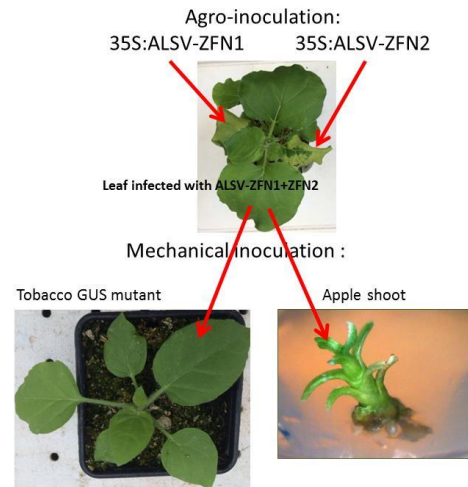


הדבקה של עצי תפוח עם הווירוס ALSV.

המטרה הייתה להדביק צמחונים של תפוח עם הווירוס הרקומביננטי ALSV-ZFN בכדי להשתיק את הגן ACS בצמחוני תפוח (איור 15).

איור 15. סכמה המתארת את הפעלת הגנים ZFN במערכת של ALSV.

בשלב ראשון בחנו את היכולת של הקלון ALSV-GFP להדביק צמחים קטנים וצמחונים סטריליים. ביצענו ניסויים רבים להדביק שתילים צעירים של תפוח. השתמשנו בשיטות שונות כמו: א. הדבקה מכנית עם RNA של הווירוס שהופק מצמחי מלפפון וטבק בנטמיאנה גנועים. ב. ירי של ה-RNA מעורב עם חלקיקי טונגסטן על עלי תפוח. ג. ירי בנוכחות חלקיקי טונגסטן של הקלון 35S-pALSV- cDNA.



GFP על עלי תפוח צעירים ו-7. הדבקה מכנית של הקלון. הצמחים שהודבקו נבחנו לביטוי GFP ומולקולרית באמצעות RT-PCR לנוכחות הווירוס. ראוי לציין שהווירוס אינו גורם לתסמיני מחלה בצמחים. בכל הניסויים שביצענו לא הצלחנו לקבל הדבקה של הווירוס גם לאחר כחודש וחצי ממועד ההדבקה. אנו מניחים שהסיבה נובעת מזן התפוח שיתכן שהוא בעיתי או עמיד להדבקה.

דיון וסקופ:

מטרות המחקר הייתה לבנות תשתית מדעית לעריכה גנטית בתפוח באמצעות הנדסת ZFN, ולבחון את היכולת של מערכת זו לפגוע באופן מכוון בגנים המעורבים בהתרככות הפרי. התחום של עריכה גנטית מכוונת (Genome-Editing) בגידולי עצים הוא חדש למדע ודורש משאבים וזמן להגיע להישגים. בשל המורכבות של המחקר שותפו במחקר ארבע קבוצות מחקר כאשר לכל קבוצה מומחיות בתחומה (ראה איור של מבנה קבוצות המחקר). הכוונה הייתה לפתח דרכים משולבות ליצירת מוטציות מכוונות בתפוח בדרך שאינה משאירה אלמנטים טרנסגניים בצמח. קבוצת המחקר הראשית של דר' פליישמן הצליחה להראות ייתכנות של יצירת שינויים מכוונת בתפוח במערכת מודל בתרבות ובצמחונים המבטאת את הגן המדווח GUS ותוצאות המחקר פורסמו (Peer et al., 2014). על בסיס הידע שנצבר במערכת היתכנות הונדס ZFN חדש במטרה לפגוע בגן ASC1 המעורב בהתרככות הפרי. ה-ZFN המהונדס נבחן ב-transient במערכת מודל להשריית מוטציות בטבק טרנסגני המכיל את אתר המטרה של ASC1. גם מערכת ייתכנות זו פעלה עפ"י המתוכנן בשלב ראשון ב-transient, אלא שהמעקב אחר הפעילות האנומיתית של ZFN-Asc1 בטרנספורמציה קבועה לא צלח ולכן לא הצלחנו להראות יצירת מוטציות במערכת המודל של טבק.

במחקר הנוכחי התבצע מחקר השוואתי של ביטוי גנים המעורבים בהתרככות הפרי בשלושה זני תפוח, כאשר הזן 'ענה' משמש מדד לפרי בו התרככות היא מהירה. במחקר הראנו שהגן ACS3A תורם לפנוטיפ של התרככות מהירה בתפוח. ובנוסף הראנו שעבור 'ענה' כל הגנים ממשפחת ה-SQUAMOSA שנבדקו לא משתנים במהלך ההבשלה בעוד שעבור שני הזנים האחרים הגנים הללו עלו קודם להופעת הפיק הקלימקטרי. תמונה דומה התקבלה גם עבור שלושה גנים ממשפחת SEPALLATA. הגן MADS8 שונה בביטוי והוא עולה בשלב מאוד מוקדם של התפתחות הפרי ב'ענה'. בשלב זה עדיין לא ברור אם יש לכך משמעות כלשהיא ויש צורך לבדוק גנים נוספים ממשפחת ה-MADS כדי להצביע על גן מרכזי החולש על ייצור האתילן כפי שנמצא בעגבנייה ובבננה.

בתחום של בנית וקטור ויראלי לביטוי ZFN מהונדס, הצלחנו לבנות לראשונה קלון שלם של גזע ישראלי של הווירוס ACLSV, אלא שקלון זה לא היה אינפקטיבי. להערכתנו הקלון הכיל רצפים של גזעים שונים של אותו וירוס שאפינו בארץ ולכן יתכן שזו הסיבה שהקלון לא היה אינפקטיבי. כמו כן, הצלחנו להעמיד את המערכת של הווירוס ALSV שהובא מיפן ולבנות וקטור ALSV-GFP. הווירוס הרקומביננטי שבנינו אכן הדביק וביטא GFP בצמחי מודל עשבוניים אבל לא הדביק צמחונים של תפוח בחדרי גידול מבוקרים ובתרבות. אנו מניחים שהבעיה מקורה בזן התפוח שמראה עמידות מסוימת להדבקה.

חשוב לציין שכבר בשנה השנייה למחקר הבנו, שהטכנולוגיה של הנדסת ZFN היא מאד לא יעילה בהשוואה לטכנולוגיות חדשות שפותחו ו-TALEN ו-CRISPR/Cas9. לאור זאת החלה פעילות להעמדת מערכת של CRISPR/Cas9 בתפוח, כאשר המחקר הנוכחי מהווה תשתית מחקרית טכנולוגית מצוינת להמשך המחקר של עריכה גנטית בעצים בשילוב הטכנולוגיה של CRISPR/Cas9.

- Gaj, T., Gersbach, C.A., and Barbas, C.F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 31, 397–405.
- Kon, T., and Yoshikawa, N. (2014). Induction and maintenance of DNA methylation in plant promoter sequences by apple latent spherical virus-induced transcriptional gene silencing. *Virology* 5, 595.
- Liu, D., Hu, R., Palla, K.J., Tuskan, G.A., and Yang, X. (2016). Advances and perspectives on the use of CRISPR/Cas9 systems in plant genomics research. *Curr. Opin. Plant Biol.* 30, 70–77.
- Peer, R., Rivlin, G., Golobovitch, S., Lapidot, M., Gal-On, A., Vainstein, A., Tzfira, T., and Flaishman, M.A. (2014). Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in perennial fruit trees. *Planta* 1–11.
- Yamagishi, N., Sasaki, S., Yamagata, K., Komori, S., Nagase, M., Wada, M., Yamamoto, T., and Yoshikawa, N. (2011). Promotion of flowering and reduction of a generation time in apple seedlings by ectopical expression of the *Arabidopsis thaliana* FT gene using the Apple latent spherical virus vector. *Plant Mol. Biol.* 75, 193–204.