

יצירת קנבינואידים חדשים באמצעות התמרה גנטית, ומערכות תרביות רקמה

256103017

קוד מימון 20-01-0121

דו"ח סופי

חוקרים ושותפים למחקר

דר' משה ראובני - ריכוז הפרויקט, פיתוח פרוטוקולים vhmoshe@agri.gov.il

דר' אסף אהרוני - בחינת הרכב קנבינואידים ובניית קונטסרקטים להתמרה בקנאביס asaph.aharoni@weizmann.ac.il

דר' ארי שפר – בחינת הרכב קנבינואידים ובניית קונטסרקטים להתמרה בקנאביס vcaris@volcani.agri.gov.il

דר' משה פליישמן – התמרה גנטית בקנאביס. דוא"ל vhmoshea@agri.gov.il

יערית קוטשר – תרביות רקמה yaaritezer@gmail.com

תקציר:

הצגת הבעיה

ישנם בספרות בעת האחרונה מספר מאמרים המתארים יצירה של תרביות מעלי קנאביס המייצרות כמויות זניחות של קנבנואידים. הרציונל של גידול בתרבית היא יצירת מערכת עוקפת לגידול בחממה או בשדה ועקב כך להגדיל את בטיחות הגידול ושליטה בחמר הצמחי. כמויות הסם המופקות מתרבית נמוכות מאוד ביחס לתפרחות. הסיבות לכך יכולות להיות מגוונות למשל חוסר בתנאי אגירה נכונים, חוסר בקצבי גידול או בכמויות אנזימי ייצור. אנו מציעים לנסות לשלוט בתהליכים תאים כאלה ואחרים במסגרת של תרביות רקמה, הן על ידי מניפולציות של מקור החומר הצמחי והן על ידי טרנספורמציה של תרביות רקמה בגנים של המסלול הביוסינטטי של קנבנואידים.

שיטות העבודה

גידלנו צמחי קנאביס בכלים סטריליים לאחר פרוטוקול חיטוי לקחנו חלקי צמח לפיתוח תרבית קאלוס. לא הצלחנו בהתמרה של חומר רגנרטיבי, בחנו את רמות קנבנואידים כפונקציה של טרנספורמציה של תרבית המפ.

תוצאות עיקריות לתקופת הדו"ח

1. פיתוח פרוטוקול לניקוי זרעים.
2. פיתוח תרבית קאלוס של המפ, (*Cannabis sativa*) במעבדת ראובני וטרנספורמציה *in planta* לקנאביס רפואי במעבדת פליישמן. לא פותחה תרבית של טריכומות.
3. בוצעה אנליזה של הרכב הקנבנואידים בצמחי מריחואנה.
4. טרנספורמציה של תרבית המפ בקונסטרקס 11X וקבלת קאלוסים ורודים/סגולים.

5. טרנספורמציה של תרבית המפ בקונסטרוקסטים המבטאים גנים שבודדו מצמחי מריחואנה והדגמה לייצור קנבנואידים בתרבית.

6. הדגמה ראשונה של ייצור THC וקנבנואידים נוספים בקאולוס טרנסגני של המפ.

מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות

אין עדיין מסקנות ליישום.

מעריכים מומלצים לבדיקת הדוח
אין

הצהרת החוקר הראשי הממצאים בדו " ח זה הינם תוצאות ניסויים . ניסויים מהווים המלצות להקלאים : לא



חתימת החוקר

I. מבוא

הסוג קנאביס (*Cannabis L.*, משפחת הקנביים) הוא צמח חד-שנתי, דיפלואידי ($2n=20$) המייצר אלקלואידים עם השפעה מרגיעה ואפקטים רפואיים. ההתייחסות ההיסטורית הראשונה מלפני כ-5000 שנה מאזור אסיה המרכזית השתמשו בו בין השאר למטרות רפואיות וכסם משכר. קיימים כמה זנים של הצמח הנבדלים זה מזה בהשפעתם הפסיכואקטיבית. הקנאביס שימש בתרבויות קדומות לטיפול בבעיות רפואיות רבות, ועד שהוצא מחוץ לחוק בשנות ה-30 של המאה הקודמת שימש כמרכיב מרכזי בתרופות רבות. מתחילת המאה ה-21 אנו עדים לעלייה, הן בכמות השימושים השונים והן במספר הצורכים קנאביס כתרופה, המוכר כיום בתור "קנאביס רפואי". הקנאביס הרפואי נצרך בבליעה, עישון, הסנפה או אידוי והוא משמש לטיפול בספקטרום רחב של תסמינים. בתאי גוף האדם מצויים קולטנים שמגיבים לחומרים הפעילים בצמח, האנדוקנבנואידים. במחצית השנייה של המאה הקודמת בודדו שני החומרים הפסיכואקטיביים הפעילים העיקריים בקנאביס, טטרהידרוקנבנול (בקיזור THC) וקנבידיאול (בקיזור CBD), על ידי פרופ' רפאל משולם מהמחלקה לכימיה באוניברסיטה העברית. מאוחר יותר זוהו בקנאביס מטבוליטים משניים נוספים ממשפחות כימיות עיקריות של טרפנואידים, פלבנואידים וקנבינואידים. יותר מ-92 קנאבינואידים שונים מתפקדים כמטבוליטים משניים. חומרים אלו נוצרים בעיקר בעלים ובתפוחת הנקבית העשירים בשערות ומכילות בלוטות שרף.

קנאביס רפואי

מכוון שקנאביס מוכר ברפואה העממית אלפי שנה כתרופה למגוון תסמינים. בגלל אי חוקיות השימוש בצמח אין מחקרים רבים מהזמן האחרון. מה שברור כיום זה ששימוש תרופתי בצמח השלם עם הרכב מגוון של קנבינואידים, מראה השפעה חיובית על מגוון מחלות (Gallily et al., 2015). מחקרים אלו הראו שלתפרחות קנאביס המעושרות בקנבינואידים משניים השפעה חיובית על מגוון מחלות כמו אפילפסיה, שיכוך כאבים וחרדות, דיכוי הקאות והגברת תאבון, תכונה שימושית לחולים לאחר חשיפה לכימותרפיה ועוד. כמו כן, מחקרים רבים הראו כי לחומר הפסיכואקטיבי THC השפעות חיוביות על כאב כרוני (Walter et al., 2015), איידס (Harris et al., 2014), סרטן (Abrams et al., 2015) וטרשת נפוצה (Notcutt, 2015). למרות האפקט של THC למגוון רחב של קנאבינואידים משניים כגון cannabidiol (CBD) השפעות מקלות על מגוון תסמינים ללא האפקט הפסיכואקטיבי של THC. ל- CBD יכולת להקטין רגשות כגון חרדה והתנהגויות אובססיות, התקפי אפילפסיה בילדים (Porter and Jacobson 2013) ושיפור תהליך האיחוי של שברים בעצמות. ההשפעה של CBD לבדו הייתה נמוכה בהרבה ממיצוי של צמחי קנאביס המעושרים יחסית ב- CBD (Gallily et al., 2015). כעת בוחנים את השפעותיהם של קנאבינואידים אחרים בחיות מודל ובבני אדם. (Romano et al., 2013; Navarrete et al., 2012). נראה כי לקנבינואידים אפקט רפואי נרחב. מחקרים נוספים המלווים בידיע הודות ההיסטוריה הרפואית של החולים שמתבצעים כעת ובעתיד יאפשרו להעשיר את טבלת היכולות הרפואיות של קנאביס.

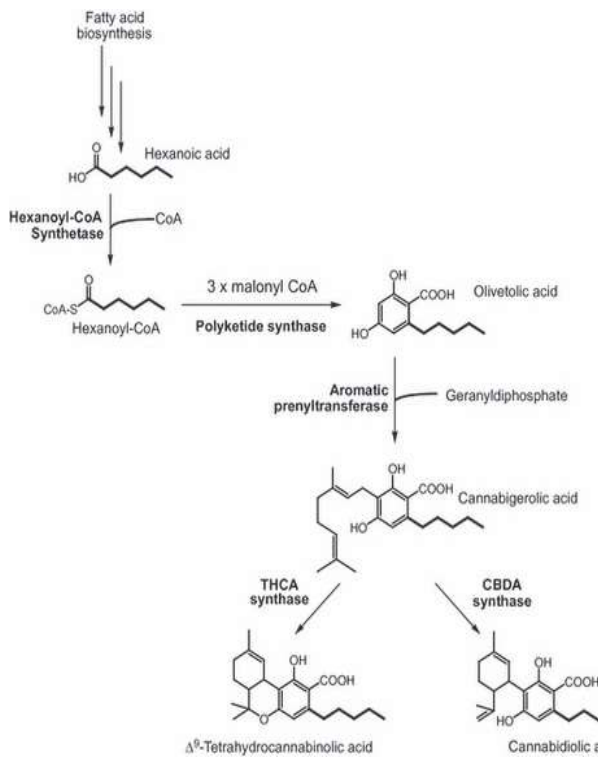
יצירת תרביות ורגנרציה של קנאביס

ישנם מעט מאוד מאמרים על יצירה של תרביות בעיקר נוזליות של קנאביס והפקה של קנבינואידים מהתרבית. Veliky and Genest (1972) היו הראשונים שדווחו על יצירת קנבינואידים בתרבית של קנאביס סאטיבה והראו שתאים בתרבית נוזלית מייצרים פי 10 פחות מאשר עלי הצמח והתפרחת. Harstel et al (1983) הראו יצירה של CBD ו- CBE בתרבית של קנאביס סאטיבה. תרביות אלו ייצרו קנבינואידים נוספים לאחר הוספת אוליוויטול למצע התרבית (Harstel et al 1983). תרביות נוזליות של קנאביס גודלו בתערובות של 2,4,D וקניטין. בשנת 2009 פרסמו Flores-Sanchez et al. שקאלוס של קנאביס לא מייצר קנאבינואידים בתגובה לאליסטרורים אביוטים אבל בנוסף הם דיווחו שרמת ביטוי הגן THCA סינטאז

הייתה מאוד נמוכה. נראה לפיכך העלאת רמת ביטוי גנים

במסלול הביוסינאזה של קנאבינואידים יש פוטנציאל להגביר את ייצורם בתרבית ללא צורך בגידול צמחים שלמים.

עד שנת 2007 לא היו דיווחים שפרסמו שיטות מוצלחות מאוד עבור רגנרציה של קנאביס סאטיבה, הסוג העיקרי של קנאביס רפואי למרות שניסיונות דווחו כבר בשנות השמונים של המאה הקודמת (Fisse et al., 1981;1985). בראשית שנות ה-2000 החלו לצאת דווחים על רגנרציה מחלקי צמח שונים וזנים שונים של הסוג קנאביס (Ranalli and Mandolino,



תמונה 1. מסלול הביוסינאזה של קנאבינואידים

1999; Mandolino and Ranalli, 1999a; Wielgus *et al.*, 2008; Slusarkiewicz-Jarzina *et al.*, 2005 ;Wielgus *et al.*, 2008; Lata *et al.*, 2010). בכל הדיווחים הללו השתמשו החוקרים ביחסים שונים של אוקסין לרוב IAA או NAA וציטוקינין לרוב BA להשרות רגנרציה. התקדמות רצינית באחוזי ויעילות הרגנרציה הושגה כאשר התחילו משתמשים ב-TDZ (Lata, Chandra & Khan 2009). למרות כל זאת הדיווחים עדיין בלתי הדירים וספורדיים.

ביוכימיה של יצירת קנאבנואידים וגנים פוטנציאלים להתמרה:

קנבנואידים (פוליטידים שעברו פרנלציה) מסונטזים מחומצות שומן ואיזופרנואידים. האנזים CsAAE1 מפעיל את חומצת השומן הקסנואט (hexanoate) דרך שלב בייניים ליצירה של אציל-CoA, הקסנואט-CoA (Stout, 2012). בשלב הבא האנזים אוליבטול סינטאז (olivetol synthase, OLS) גורם ליצירה של (OA) חומצה אוליבטית (Taura *et al.*, 2009; Raharjo *et al.*, 2004; Marks *et al.*, 2009), שלב זה דורש את נוכחות פוליטיד ציקלאז (olivetolic acid cyclase; OAC). לאחר מכן החומצה האוליבטית עוברת גרנלציה ליצירת (GBGA) חומצה קנאביגורולית (Fellermeier and Zenk, 1998). בשלב האחרון האנזימים (THCAS) טטרה-הידרו-קנאבינוליק אציד סינטאז וקנאבידיאוליקאציד סינטאז (CBDAS) הופכים את GBGA לקנאבנואידים THCA, CBDA (Sirikantaramas *et al.*, 2004; Taura *et al.*, 2007). מחקרים אחרים הראו כי CBGA הוא גם חומר המוצא ליצירת קנאבינואידים אחרים כמו CBC ו-CBD (Aizpurua-Olaizoa *et al.*, 2016). **כל הגנים המקודדים לאנזימים שהוזכרו בקטע לעיל ישובטו לווקטורים אשר יבטאו אותם בעודף למשל 35S לביטוי בתאים בתרבית או עם פרומוטור ספציפי לטריכומות גרנולואידיות.**

II. מטרות המחקר

1. פיתוח תרבית רקמה של קנאביס רפואי לייצור תרופות.
2. פיתוח מערכת רגנרציה/טרנספורמציה להתמרה גנטית של קנאביס.

פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר:

מטרת המחקר היא:

יצירה של צמחי אם סטריליים כמקור לניסיונות בתרבית רקמה. זרעים של קנאביס יעברו חיטוי ויונבטו על מצע סטרילי. צמחים סטריליים יגדלו ויועברו בכלים סגורים בחדר גידול מאובטח וסטרילי.

תוצאות

הזרעים שבהם השתמשנו היו זרעי המפ אשר בוררו ממזון לציפורים שנמכר בחנויות. זרעים אלו היו מאולחים מאוד וחיטוי רגיל של אתנול או אקונומיקה לא הצליחו לנקותם. לפיכך הגענו לאחר הרבה ניסיונות לפרוטוקול אשר כלל

טבילת הזרעים בחומצה גופריתנית מרוכזת, השרייה במים ללילה שלם לאחר החומצה, קילוף הזרעים וחיטוי באתנול ואקונומיקה לאחר מכן. תהליך זה הקטין את כמות הזרעים המזוהמים מקרוב ל100% ל20%.

מטרת המחקר:

פיתוח פרוטוקול ליצירת תרביות רקמה מתאי קנאביס רפואי בכלל וטריכומות בפרט. בדיקה של יחסי, כמויות וסוגי הורמונים צמחיים. בדיקה של מקור פחמן ומקור חנקן. בדיקה של סוג האגר ובסיס המצע. יבדקו גם חלקי הצמח השונים עלים, פרחים, גבעולים, שורשים ויבודדו טריכומות מעלי התפרחת במטרה לפתח תרבית טריכומות. פיתוח פרוטוקול ליצירת תרביות רקמה מתאי קנאביס רפואי בכלל וטריכומות בפרט. בדיקה של יחסי, כמויות וסוגי הורמונים צמחיים. בדיקה של מקור פחמן ומקור חנקן. בדיקה של סוג האגר ובסיס המצע. יבדקו גם חלקי הצמח השונים עלים, פרחים, גבעולים, שורשים ויבודדו טריכומות מעלי התפרחת במטרה לפתח תרבית טריכומות.

1. שימוש בצבען בטאנין כסמן לטרנספורמציה של צמחים.

בטאנינים הם צבענים ביולוגיים ונגזרות של החומצה האמינית טירוזין בצבעים של סגול-אדום וצהוב, ומקורם בסלק אדום. צבענים אלו גם נקראים בטאציאנינים. לאחרונה נמצא במעבדת אהרוני השלב הראשון במסלול היצירה של בטאנינים. כתוצאה ממחקר במנגנון הביוסנטזה של בטאנינים נבנה במעבדת אהרוני פלסמיד X11 המכיל שלושה גנים הכרחיים במסלול הביוסנטזה של בטאנין. הכנסה של קונסטרוקט זה למספר צמחים כגון טבק, חציל, עגבניה, תפוח אדמה הראתה צבע סגול לאחר כמה ימים מזמן ההדבקה. היתרון של פלסמיד סמן זה הוא שאינו זקוק להפעלה של מסלול ביוסנטטי אחר כגון גן בקרה של אנטוציאנינים וכל מה שנחוץ הוא נוכחות של טירוזין כחומר מוצא (Polturak et al 2016).



תמונה 2 : קאלוסים של קנאביס סאטיבה שעברו טרנספורמציה עם הפלסמיד X11 מבטאים צבען (בטאנין).

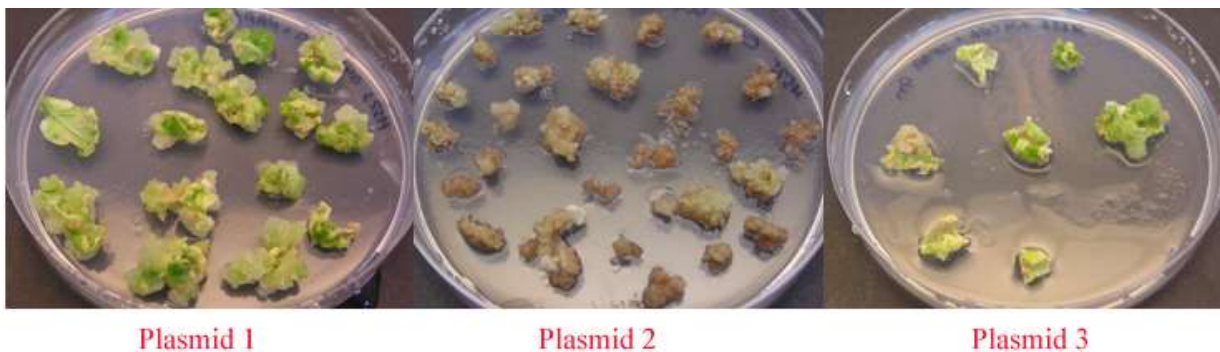
חתיכות עלים של הפמ שגדל בתנאים סטריליים הושמו על מצע המכיל ציטוקינין ואוקסין למשך 24 שעות, לאחר תקופת ההדגרה הזו עורבבו חתיכות העלים עם חיידק אגרובקטריום המכיל את הפלסמיד 11X המכיל שלושה גנים לביטוי הצבען בטאנין. לאחר הדגרה של יומיים בחושך הושמו חתיכות העלים באור על מצע המכיל אנטיביוטיקה לחיסול החיידקים וסלקציה של רקמה צמחית טרנסגנית. הדבקה נעשתה מס פעמים גם בשיטת ההצפה וגם בטבילה לא נצפו הבדלים בצלחות. לאחר כמה שבועות הופיעו קאלוסים המכילים צבען המעיד על היותם טרנסגניים (תמונה 2). המצעים שנבדקו לבחינת ייצור קאלוסים מצוינים בטבלה 1.

הרכב מצע	קאלוס	רגרציה
NAA0.4mg/ml, TDZ0.4mg/ml	+	--
TDZ0.2mg/ml, NAA0.2mg/ml	++	--
TDZ0.5mg/ml NAA0.2mg/ml	+	--
TDZ0.6mg/ml NAA0.2mg/ml	+	--

טבלה 1: הרכבי מצעים שייצרו קאלוסים מעלים ופסיגים של קנאביס סאטיבה (המפ).

בהמשך נעשו ניסויי רגנרציה על פסיגים. נראה די בברור שהעלים הגיבו טוב יותר. על הפסיגים התפתחו מעט קאלוסים שנראים לא חיוניים ("עננים לבנים").

טרנספורמציה של עלים ליצירת קאלוסים המכילים גנים של יצירת קנאבנואידיים



תמונה 3 : קאלוסים של קנאביס סטיבה (המפ) שעברו טרנספורמציה עם הפלסמידים המבטאים גנים ביוסינטטים של ייצור קנאבנואידיים. הרקמה מונחת על מצע לריבוי קאלוס בנוכחות אנטיביוטיקה לסלקציה של רקמה טרנסגנית.

עשרים עד עשרים וחמש חתיכות עלים של הפמ שגדל בתנאים סטריליים הושמו על מצע המכיל ציטוקינין ואוקסין למשך 24 שעות, לאחר תקופת ההדגרה הזו עורבבו חתיכות העלים עם חיידק אגרובקטריום המכיל את הפלסמידים (Shahar-1; Shahar-2; Shahar-3) המכילים גנים לביוסנטזה של קנבנואידיים שקיבלנו מארי שפר. מצורפת טבלת הגנים בפלסמידים

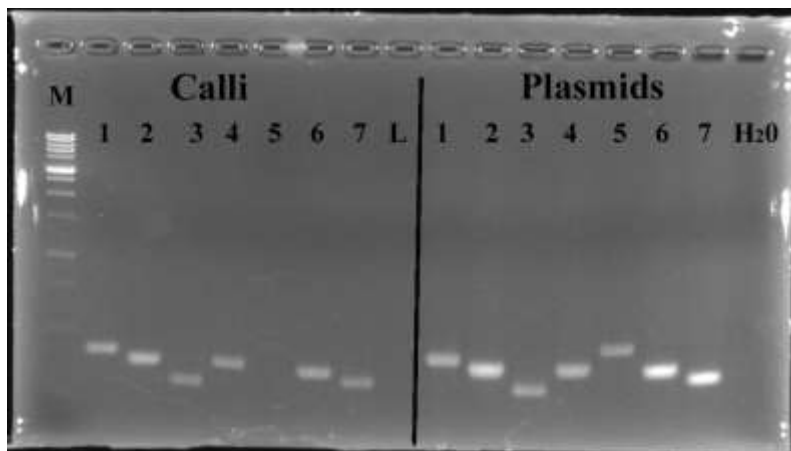
(טבלה 2). לאחר חודש/חודשיים במידה והיה גידול חזק של קאלוס הועברו הקאלוסים למצע חדש ברוחים גדולים יותר של 5-10 לצלחת.

הנוכחות של גנים אלו נבדקה בקאלוסים שגדלו על מצא המכיל אנטיביוטיקה (קנאמיצין).

Shahar-1	; Shahar-2	; Shahar-3
1. Acyl activating enzyme 2. Tetraketide synthase 3. Olivetolic acid cyclase	1.Acyl activating enzyme 2. Tetraketide synthase 3. Olivetolic acid cyclase 4. Aromatic prenyl transferase	1.Acyl activating enzyme 2. Tetraketide synthase 3. Olivetolic acid cyclase 4. Aromatic prenyl transferase 5. THCAS

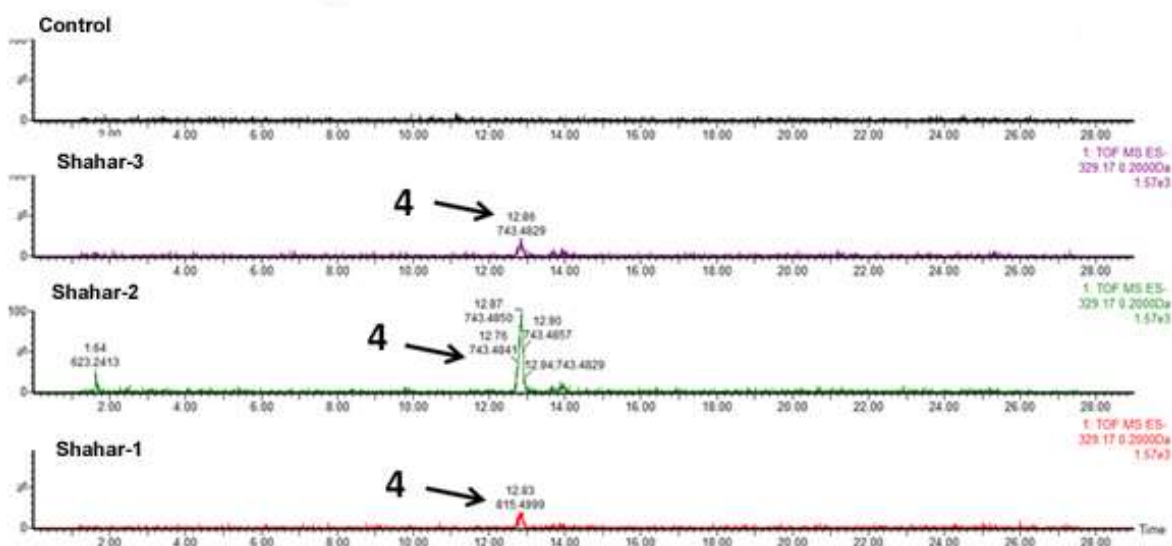
טבלה 2: הרכבי מערך הגנים בפלסמידים שהשתמשו לטרנספורמציה של קאלוסים מעלים ופסיגים של קאנביס סאטיבה (המפ).

כל פלסמיד מכיל קומבינציית גנים שונה. לאחר הדגרה של יומיים בחושך הושמו חתיכות העלים באור על מצע המכיל אנטיביוטיקה לחיסול החיידקים וסלקציה של רקמה צמחית טרנסגנית. לאחר כמה שבועות הופיעו קאלוסים הגדלים על אנטיביוטיקה (קאנמיצין) החשודים כטרנסגנים (תמונה 3). אנו ממשיכים לגדל קאלוסים אלו על מנת לקבוע האם הם מיצרים קנבנואידים וכמקור למניפולציות עתידיות. דוגמא לתוצאות מדוגמאות שנשלחו לבדיקה בתמונה 5.



תמונה 4. PCR של DNA מקאלוסים החשודים כטרנסגנים וגדלים על מצע המכיל קנאמיצין. בארות 1-3 - פלסמיד Shahar-1, 1-Acyl activating enzyme; 2-Tetraketide synthase; 3-Olivetolic acid cyclase. בארות 4, 5-6 Shahar-2, בארות 5, 7 - Shahar-3; בארות 4+6 - Aromatic prenyl transferase; בארות 5+7 - THCAS. Calli - DNA מקאלוסים, Plasmids - DNA מפלסמידים ששימשו לטרנספורמציה, L - DNA מביקורת ללא טרנספורמציה, H₂O בקורת ללא DNA.

נשלחו לאנליזה של קנבנואידים 100 מיליגרם חומר חי שזה בערך 2-5 קאלוסים שונים שעברו טרנספורמציה בהתאם לקצב הגדילה שלהם. כל הקאלוסים נבדקו במעבדה של אסף אהרוני לנוכחות קנבנואידים. נמצאו קנבנואידים בדוגמאות של קאלוסים של המפ שעברו טרנספורמציה עם פלסמידים המכילים גנים במסלול הביוסנטזה של THC. כל צירופי הגנים הניבו אותם קנבנואידים. איור 5 מדגים הרצה לבדיקת נוכות של $\Delta 9$ -THCVA (איור 5).



תמונה 5. דוגמא להרצה ב-HPLC+MTOF למיצוי מתרבית רקמה של המפ שעבר טרנספורמציה. דוגמא Shahar-1, עם האנזימים Acyl activating enzyme :Tetraketide synthase :Olivetolic acid cyclase. דוגמא Shahar-2, - Aromatic prenyl transferase. דוגמא Shahar-3: THCAS –. ביקורת ללא טרנספורמציה. מיצוי כרומוטוגרמיה על מחליף יונים אנליזה שלפיק מספר 4 m/z 329.17 Da מזהה נוכחות של $\Delta 9$ -THCVA.

דיון

הצעת המחקר הזו התבססה על הרעיון להגביר את מגוון הקנבנואידים למחקר ושימוש רפואי על ידי ביוסנטזה שלהם בתרבית תאי קנאביס תחת תנאים מבוקרים. מניפולציה של התנאים כולל טרנסגנוזה שלהם עם גנים

מהמסלול הביוסנטטי יאפשר שליטה בהרכב הכימי. ישנם מעט מאמרים על ניסיונות לייצר קנבנואידים התרבית. עיקר הספרות הוא על גידול, הרכב כימי ונסיונות לקבל מערכת רגנרציה בצמחי קנאביס.

לאחר שייצבו צמחים סטריליים בקופסאות התחלנו בניסיונות ייצור קאלוסים מצמחי המפ אשר לא מיצרים קנבנואידים. הצלחנו לייצר תנאי הדבקה לתאי קאלוס בתרבית ולהתמירם בגנים במסלול המטבולי של קנבנואידים. . שלחנו דוגמאות קאלוסים (תרבית רקמה) למעבדתו של אסף אהרוני לאנליזה ונמצא שהתמרה עם הפלסמידים הללו הביאה לייצור הקנבנואידים הבאים בתרבית, $\Delta 9$ -THCVA, CBCA, $\Delta 9$ -THCA, CBNA. חלק מהקנבנואידים הללו נחשבים בעלי פעילות רפואית כגון $\Delta 9$ -THCVA ובמערכת זו אנו מדגימים את האפשרות לייצור חומר זה ללא THC או CBD.

רגנרציה של צמחונים עוד לא הצלחנו לקבל בין השאר בגלל שלא לא היו לנו הרבה זרעים לבדוק את רקמת הפסיגים והיפוקוטייל. כמו כן יכול להיות שלא היה לנו את הזן המתאים כי הזנים מאוד לא ברורים. בנוסף זמן המחקר לא איפשר בדיקה ארוכת טווח של מצעים שונים. **לא הצלחנו לקבל תרבית מטריכומות . לא מצאנו דרך לנתקן מהעלה ולקבל טריכומות חיות.**

דו"ח מעבדת אסף אהרוני

Aharoni lab report-

Establishing the analytical procedure for analyzing cannabinoids in Cannabis extracts

Cannabinoid extracts from *Cannabis* leaves and flowers were analyzed by using a Waters ACQUITY UPLC system coupled to a SYNAPT G2 HDMS mass spectrometer (Waters Corp., MA, USA). The mass spectrometer was operated in full scan MS^E mode, allowing simultaneous analysis of exact mass and fragmentation information by parallel alternation of low- and high-energy collision spectral acquisition modes (Figure 1).

Cannabinoids were identified based on chromatographic separation, accurate mass measurements and MS/MS spectra. In this study, thirteen cannabinoids were identified in *Cannabis* leaves and flowers, including delta-9-tetrahydrocannabinol, cannabigerolic acid, cannabigerolic acid monomethylether, cannabigerol, cannabigerovarin, cannabitriol, cannabiripsol, cannabielsoin, cannabinolic acid, cannabidiol monomethylether, cannabivarin, cannabinol-C2 and cannabiorcol (Figure 2).

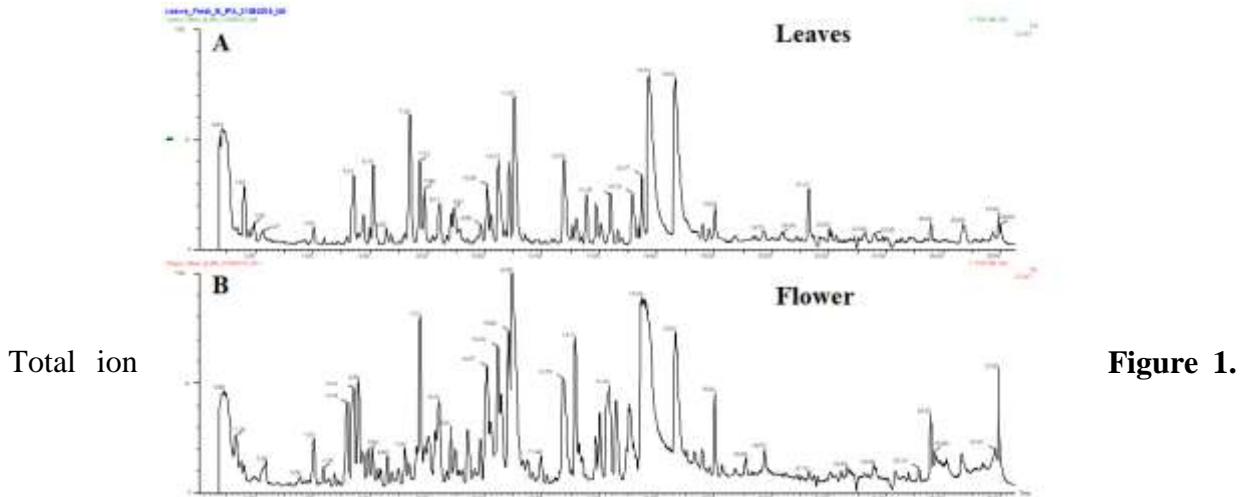


Figure 1.

chromatograms of Cannabis leaves and flower extracts obtained by LC-MS analysis. In addition, eight groups of cannabinoid isomers including 22 cannabinoid compounds were analyzed in *Cannabis* leaves and flowers but without distinction due to lack of the relative cannabinoid standards. These cannabinoid isomers were cannabigerovarinic acid, cannabichromanon, cannabichromevarinic acid and cannabidivarinic acid, cannabidiol and delta-9-tetrahydrocannabinol, cannabielsoic acid A and cannabielsoic acid B, cannabichromene, cannabicyclol and cannabicitran, cannabidivarin, delta-9-tetrahydrocannabivarin and cannabicyclovarin, cannabinol, cannabinodiol and cannabifuran, together with cannabichromenic acid, cannabidiolic acid, delta-9-tetrahydrocannabinolic acid A, delta-9-tetrahydrocannabinolic acid B and cannabicyclolic acid.

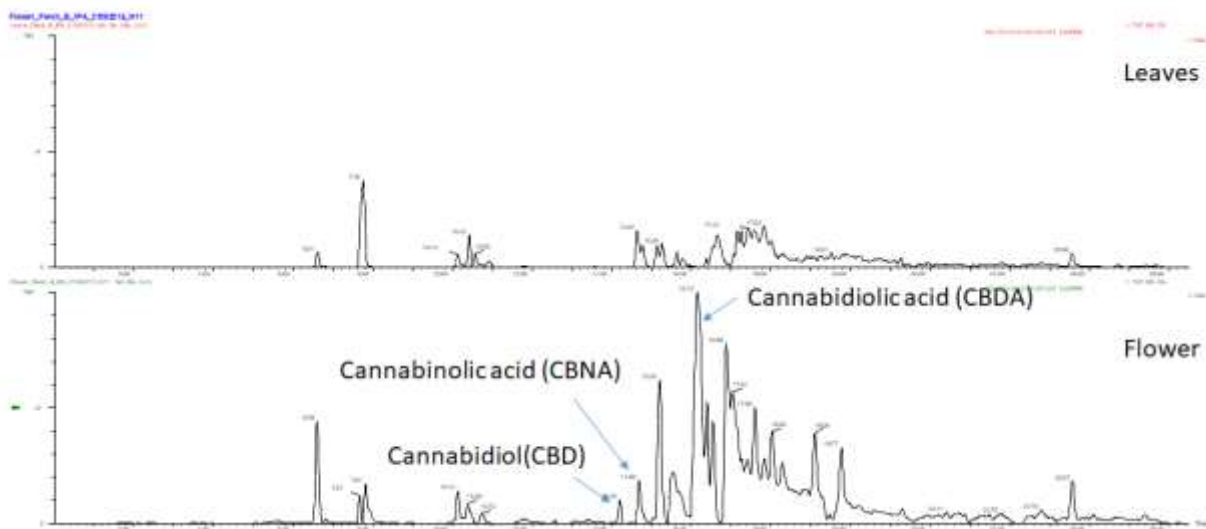


Figure 2. Selected ion chromatograms of Cannabis leaves and flower extracts obtained by LC-MS analysis. Cannabidiol (CBD), Cannabinolic acid (CBNA) and Cannabidioloic acid (CBDA) were found enriched in flower as compared to leaves extract. Altogether, our current method allows the detection and putative identification of 35 differentcannabinoids in cannabis leaves and flowers (Table 2).

Table 2: A total of 35 cannabinoids detected in our LC-MS analysis of leaves and flowers.

Number	Compound name	Formula	Mw	M+H	M-H
1	Cannabidiol (CBD)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314.2246	315.2324	313.2168
2	Delta-9-tetrahydrocannabinol (THC)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314.2246	315.2324	313.2168
3	Cannabigerolic acid monomethylether (CBGAM)	C ₂₃ H ₃₄ O ₄	374.2457	375.2535	373.2379
4	Cannabigerol (CBG)	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	316.2402	317.248	315.2324
5	Cannabigerovarin (CBGV)	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	288.2089	289.2167	287.2011
6	Cannabitrinol (CBT)	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	346.2144	347.2222	345.2066
7	Cannabiripsol (CBR)	C ₂₁ H ₃₂ O ₄	348.2301	349.2379	347.2223
8	Cannabielsoin (CBE)	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	330.2195	331.2273	329.2117
9	Cannabinolic acid (CBNA)	C ₂₂ H ₂₆ O ₄	354.1831	355.1909	353.1753
10	Cannabigerol monomethylether (CBGM)	C ₂₂ H ₃₄ O ₂	330.2559	331.2637	329.2481
11	Cannabidiol monomethylether (CBDM)	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	328.2402	329.248	327.2324
12	Cannabivarin (CBV)	C ₁₉ H ₂₂ O ₂	282.162	283.1698	281.1542
13	Cannabiorcol (CBN-C1)	C ₁₇ H ₁₈ O ₂	254.1307	255.1385	253.1229
14	Cannabigerovarinic acid (CBGVA)	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	332.1988	333.2066	331.191
15	Cannabichromanon (CBCN)	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	332.1988	333.2066	331.191
16	Cannabichromevarinic acid (CBCV)	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	330.1831	331.1909	329.1753
17	Cannabidivarinic acid (CBDVA)	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	330.1831	331.1909	329.1753
18	Cannabichromenic acid (CBCA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄	358.2144	359.2222	357.2066
19	Cannabidiolic acid (CBDA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄	358.2144	359.2222	357.2066
20	Delta-9-tetrahydrocannabinolic acid A (THCA-A)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄	358.2144	359.2222	357.2066
21	Delta-9-tetrahydrocannabinolic acid B (THCA-B)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄	358.2144	359.2222	357.2066
22	Cannabicyclolic acid (CBLA)	C ₂₂ H ₃₀ O ₄	358.2144	359.2222	357.2066
23	Cannabichromene (CBC)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314.2246	315.2324	313.2168
24	Cannabicyclol (CBL)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314.2246	315.2324	313.2168
25	Cannabicitran (CBT)	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314.2246	315.2324	313.2168
26	Cannabidivarin (CBDV)	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	286.1933	287.2011	285.1855
27	Delta-9-tetrahydrocannabivarin (THCV)	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	286.1933	287.2011	285.1855
28	Cannabicyclovarin (CBLV)	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	286.1933	287.2011	285.1855
29	Cannabidiorcol (CBD-C1)	C ₁₇ H ₂₂ O ₂	258.162	259.1698	257.1542
30	Delta-9-tetrahydrocannabiorcol (THC-C1)	C ₁₇ H ₂₂ O ₂	258.162	259.1698	257.1542
31	Cannabielsoic acid A (CBEA-A)	C ₂₂ H ₃₀ O ₅	374.2093	375.2171	373.2015
32	Cannabielsoic acid B (CBEA-B)	C ₂₂ H ₃₀ O ₅	374.2093	375.2171	373.2015
33	Cannabinol (CBN)	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	310.1933	311.2011	309.1855
34	Cannabinodiol (CBND)	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	310.1933	311.2011	309.1855
35	Cannabifuran (CBF)	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	310.1933	311.2011	309.1855

Analysis of volatile terpenoids in Cannabis

Volatile compounds were analyzed by using an Agilent 7090 gas chromatograph coupled to a Leco Pegasus 4D TOF detector (Waters Corp., MA, USA). For analysis two

chromatographic techniques were employed: (a) 1 dimension GC–MS and (b) more advanced 2 dimensional GC*GC-MS with dynamic head space sampling. Using these techniques hundreds of volatile compounds were detected.

דו"ח משה פליישמן.

***In planta* transformation of Hemp**

Summery

Alternate methods that avoid/minimize tissue culture would be beneficial for the development of new transgenic Cannabis cultivars. One of the two cotyledons of germinated Cannabis seedlings was excised. *Agrobacterium* strain EHA 105 harboring the binary vector pME504 that carries the genes for β -glucuronidase (GUS) and neomycin phosphotransferase (*npt* II), or the plasmid pX11 carrying the *npt*II and betalain genes were used for transformation. For *in planta* transformation, *Agrobacterium* strain EHA 105 harboring the two different binary plasmids were mixed with emulsifier paste to enhance attachment to the cut plant surface. The proof of transformability in the T0 generation was indicated by the GUS histochemical analysis of the seedlings, ten days after co-cultivation and was further confirmed by PCR analysis and typical betalains red leaves expression. Molecular characterization and GUS and betalains expression analysis were done using PCR.

Materials and methods

Plant material

Seeds - *Cannabis Sativa* L. seeds (hemp cultivar 108) were surface sterilized with 1.5% sodium hypo chloric acid followed by several washes with sterile water. Seeds were germinated on sterile, wet, filter paper disks until visible root emerging. Seedlings- seeds were germinated in solid media (soil, vermiculite, MS, etc.) until first two true leaves were observed.

Imaging for the detection of *in planta* plant development

Scanning Electron Microscopy.

Scanning Electron Microscopy was done with Hitachi TM-3030Plus microscope. Imaging was done under low vacuum conditions without any sample preparation.

Agrobacterium tumefaciens strain and plasmid- Super-virulent A. tumefaciens strain EHA105 harboring the vector pME 504 carrying the uidA-intron reporter gene and the *npt*II resistant genes or the vector pX11 carrying the *npt*II and betalain genes were used. Bacteria were spun down by centrifugation (8000 g for 10 min). Bacteria were re-suspended in transformation

buffer (1 MS, 5.86 g/l MES, 1% sucrose, pH 7.0) with 100 mg/l acetosyringone, to obtain a final OD₆₀₀ of 0.6, and incubated in an orbital shaker at 28°C and 250 rpm for 3h until plant infection. Plant material (seedling or seeds) were vacuum infiltration for 5 min in a vacuum desiccator. The infiltration followed with co-cultivation with the agrobacterium for 30 min in R.T, then transfer for further growth.

Pre-transformation tissue preparation

Prior to agrobacterium transformation, all tissues were mechanically treated; cotyledon and the meristem with its leaves were cut off from the seedlings, leaving the seedling with only one cotyledon.

Agro mediated transformation

Binary plasmids for various genetic modification purposes were introduced into *Agrobacterium tumefaciens*. Agrobacterium applied to the tissue in different ways; a. dipping, b.

microencapsulation, c. injecting d. dripping. In any case, agrobacterium enclosing the desired plasmid was grown in the presence of selective antibiotics which were later replaced with an activation medium. In case of dipping treated seedlings were co-cultivated with the bacteria for times rising from 2min to several hours.

GUS staining

Fresh plant material was transfer to histochemical reagent (1.1 mM X-Gluc in 100 mM potassium phosphate buffer pH 7.0: 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide and 0.1% Triton X-100) and incubated for one hour to overnight at 37°C. After staining the disks were transferred to 70% ethanol for 1h to overnight until bleached.

Betalains separation

For betalains observation, fresh tissue (0.5g) was grind in the presence of CTAB buffer (3% CTAB, 28% NaCl, 4% EDTA, 10% Tris HCl, 3% PVP and 25% water), mixed with chloroform and centrifuged.

Result

In planta Agrobacterium transformation.

Prior to agrobacterium transformation, all tissues were mechanically treated. One cotyledon and the meristem with its leaves were cut off from the seedlings, leaving the seedling with only one cotyledon (Fig. 1).

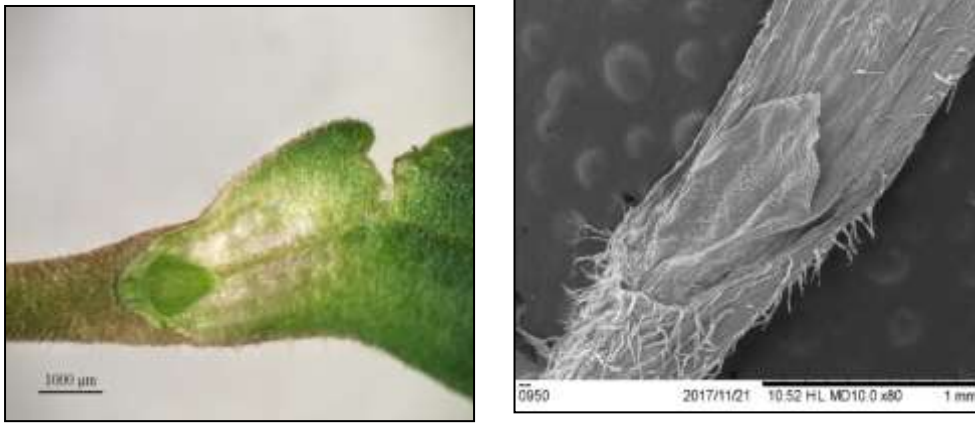


Fig 1: Cannabis seedlings: *in planta* transformation. a. Peeling and exposing tissue between the cotyledon and stem. b. Scanning electron micrograph of cut seedling.

In planta *Agrobacterium* application is complicated due to poor attachment of the bacteria to the wounding area. For *in planta* transformation, *Agrobacterium* strain EHA 105 harboring the different binary plasmids were mixed with emulsifier paste to enhance attachment to the cut plant surface. *Agrobacterium* was grown and activated as described in materials and methods. *Agrobacterium* strain EHA 105 harboring the binary vector pME504 that carries the genes for β -glucuronidase (GUS) and neomycin phosphotransferase (*npt II*), or the plasmid pX11 carrying the *nptII* and betalain genes were used for transformation. The proof of transformability in the T0 generation was indicated by the GUS histochemical analysis of the seedlings, ten days after co-cultivation and was further confirmed by PCR analysis and typical betalains red leaves expression. Molecular characterization and GUS and betalains expression analysis were done using PCR (Fig 2-3).

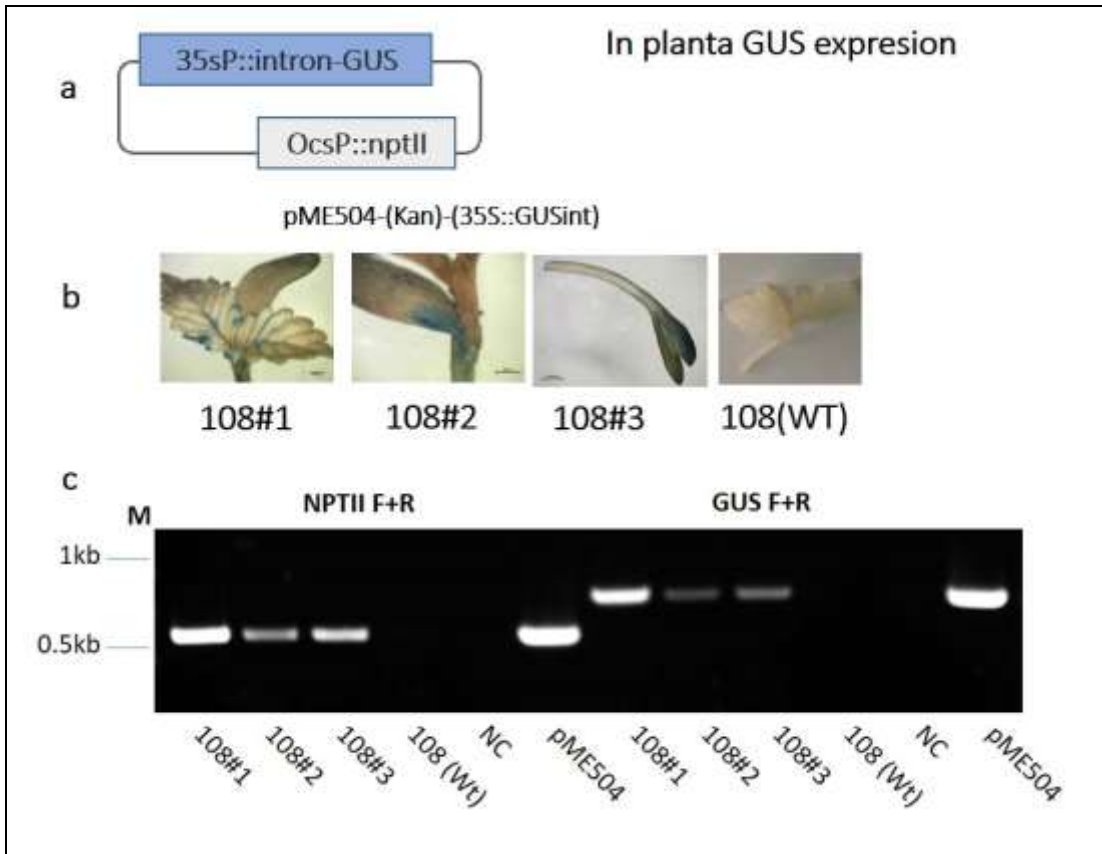


Fig. 2. In planta transformation using *Agrobacterium* strain EHA 105 harboring the binary vector pME504 that carries the genes for β -glucuronidase (GUS) and neomycin phosphotransferase (*npt II*). The proof of transformability in the T0 generation was indicated by the GUS histochemical staining analysis of the seedlings and molecular characterization and GUS and *nptII*, using PCR.

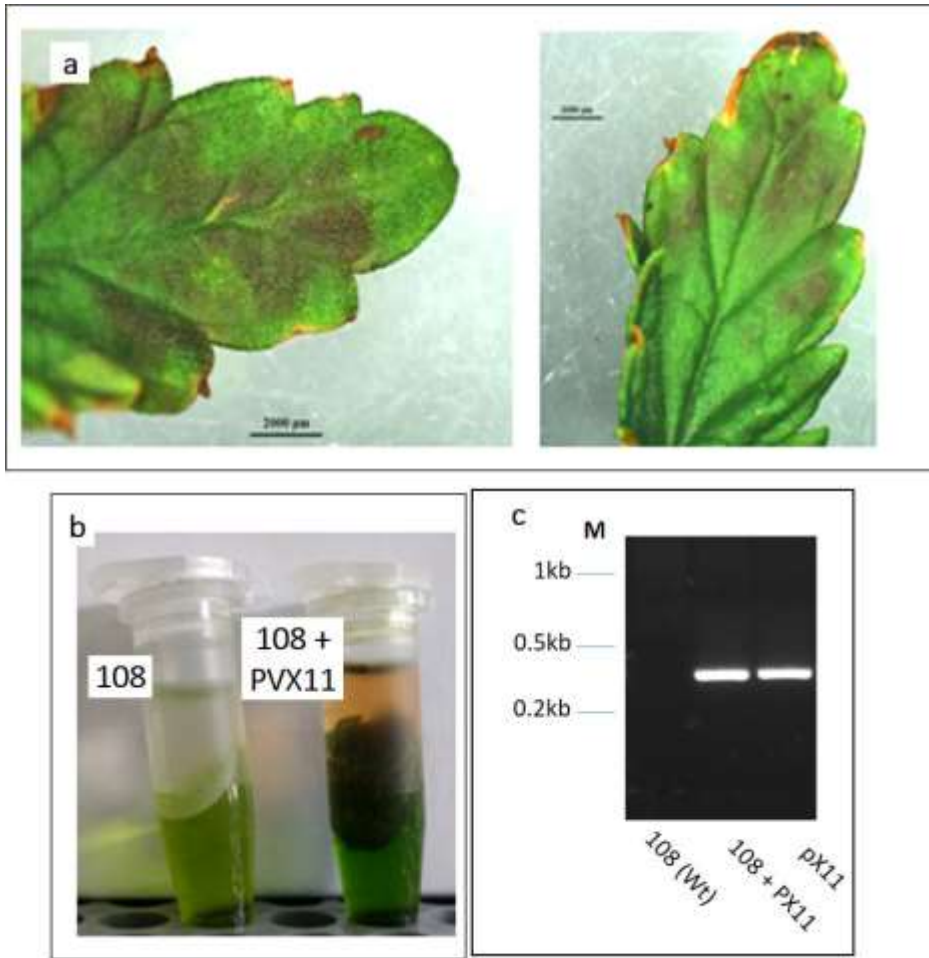


Fig. 3. *In planta* transformation using *Agrobacterium* strain EHA 105 harboring the binary vector pX11 that carries the genes for *nptII* and betalains. The proof of transformability in the T0 generation was indicated by betalains staining analysis of the seedlings and molecular characterization and GUS and *nptII*, using PCR.

סיכום

תוצאות עיקריות לשנת המחקר

1. פיתוח פרוטוקול לניקוי זרעים.
2. פיתוח תרבית קאלוס של המפ, (*Cannabis sativa*) במעבדת ראובני וטרנספורמציה *in planta* לקנאביס רפואי במעבדת פליישמן. לא פותחה תרבית של טריכומות.
3. בוצעה אנליזה של הרכב הקנבנואידים בצמחי מריחואנה.
4. טרנספורמציה של תרבית המפ בקונסטרקס 11X וקבלת קאלוסים ורודים/סגולים.
5. טרנספורמציה של תרבית המפ בקונסטרקסטים המבטאים גנים שבודדו מצמחי מריחואנה והדגמה לייצור קנבנואידים בתרבית.

6. הדגמה ראשונה של ייצור THCv וקנבנואידיים נוספים בקאלוס טרנסגני של המפ.

במחקר זה הראנו שניתן לקבל ייצור קנבנואידיים בתרבית רקמה (קאלוס) אם גורמים להעלאת הביטוי של הגנים המסנתזים קנבנואידיים. במעבדתי בוצעה העלאת ביטוי הגנים המטבוליים של ברקמת קאלוס של המפ על ידי טרנסגנזה, כלומר הכנסת הגנים הללו תחת פרומוטור ויראלי וסלקציה של הרקמה הטרנסגנית על אנטיביוטיקה. הראנו שהקנבנואידיים המסונטזים בעלה ובפרה זהים לאלו שמשונטזים בקאלוס טרנסגני ולכן קאלוס יכול לשמש מקור לייצור קנבנואידיים. לא הצלחנו לקבל במסגרת הזמן שהיה במחקר זה רגנרציה של צמחי קנאביס או קאלוס מטריכומות.

רשימת ספרות

- Fellermeier, M. and Zenk, M.H. (1998) Prenylation of olivetolate by a hemp transferase yields cannabigerolic acid, the precursor of tetrahydrocannabinol. *FEBS Lett.* 427, 283–285.
- Fisse J, Andres J (1985) Organogenesis and biosynthesis in an *in vitro* culture of *Cannabis sativa* L. *Boletín da Academia Galega de Ciencias*4:57-67.
- Fisse J, Braut F, Cosson L, Paris M (1981) Étude in vitro des capacités organogénétiques de tissus de *Cannabis sativa* L.; Effet de différentes substances de croissance. *Plantes Médicinales et Phytotherapi* 15:217-223.
- Flores-Sanchez IJ, Pec J, Fei JN, Choi YH, Dusek J, Verpoorte R (2009) Elicitation studies in cell suspension cultures of *Cannabis sativa* L. *J of Biotechnol* 143 (2):157-168.
- Gagne SJ, Stout JM, Liu E, Boubakir Z, Clark SM, Page JE. (2012) Identification of olivetolic acid cyclase from *Cannabis sativa* reveals a unique catalytic route to plant polyketides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Jul 31;109(31):12811-6.
- Giese MW, Lewis MA, Giese L, Smith KM. 2015. Development and Validation of a Reliable and Robust Method for the Analysis of Cannabinoids and Terpenes in Cannabis. *J AOAC Int.* 98(6):1503-22
- Hartsel SC, Loh WHT, Robertson LW (1983) Biotransformation of cannabidiol to Cannabielsoin by suspension cultures of *Cannabis sativa* and *Saccharum officinarum*. *Planta Medica* 48 (1):17-19.
- Huff M and Turgeon R (2006) Neoplastic Potential of Trichomes Isolated from TobaccoCrown Gall Teratomas. *Differentiation.* 19, Issue 1-3
- Lata H, Chandra S, Khan IA, ElSohly MA (2010) high frequency plant regeneration from leaf derived callus of high delta(9)-tetrahydrocannabinol yielding *Cannabis sativa* L. *Planta Medica* 76 (14):1629-1633.
- Lata,H., S Chandra, I Khan 2009 Thidiazuron-induced high-frequency direct shoot organogenesis of *Cannabis sativa* L. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* (2009) 45:12–19.
- Mandolino G, Bagatta M, Carboni A, Ranalli P, de Meijer EPM (2003) Qualitative and quantitative aspects of the inheritance of chemical phenotype in *Cannabis*. *J Ind Hemp* 8:51-72.
- Mandolino G, Ranalli P (1999b) Advances in biotechnological approaches for hemp breeding and industry. *Advances in hemp research.* Haworth, New York.
- Mandolino G, Ranalli P (eds) (1999a) Advances in biotechnological approaches for hemp breeding and industry. *Advances in hemp research.* Haworth, New York.
- Marks, M.D., Tian, L., Wenger, J.P., Omburo, S.N., Soto-Fuentes, W., He, J., Gang, D.R., Weiblen, G.D. and Dixon, R.A. (2009) Identification of candidate genes affecting Δ 9-tetrahydrocannabinol biosynthesis in *Cannabis sativa*. *J. Exp. Bot.* 60, 3715–3726.
- Peer, R., Rivlin, G., Golobovitch, S., Lapidot, M., Gal-On, A., Vainstein, A., Tzfira, T. and Flaishman, M. A. (2015). Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in perennial fruit trees. *Planta* 241: 941-951.
- Polturak G, Breitel D, Grossman N, Sarrion-Perdigones A, Weithorn E, Pliner M, Orzaez D, Granell A, Ilana Rogachev I and Asaph Aharoni A (2016) Elucidation of the first committed step in betalain

- biosynthesis enables the heterologous engineering of betalain pigments in plants. *New Phytologist*. 210; 269-283.
- Raharjo, T.J., Chang, W.T., Verberne, M.C., Peltenburg-Looman, A.M., Linthorst, H.J. and Verpoorte, R. (2004) Cloning and over-expression of a cDNA encoding a polyketide synthase from *Cannabis sativa*. *Plant Physiol. Biochem.* 42,291–297.
- Ranalli P, Mandolino G (1999) Advances in hemp research In: Ranalli P (ed) *Advances in biotechnological approaches for hemp breeding and industry*. Haworth Press, New York, pp 185-208.
- Sarrion-Perdigones A, Vazquez-Vilar M, Palaci J, Castelijn B, Forment J, Ziarsolo P, Blanca J, Granell A, Orzaez D. 2013. GoldenBraid 2.0: a comprehensive DNA assembly framework for plant synthetic biology. *Plant Physiology* 162: 1618–1631.
- Sirikantaramas, S., Morimoto, S., Shoyama, Y., Ishikawa, Y., Wada, Y., Shoyama, Y. and Taura, F. (2004) The gene controlling marijuana psychoactivity: molecular cloning and heterologous expression of Δ^1 -tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis sativa* L. *J. Biol. Chem.* 279, 39767–39774.
- Sirikantaramas, S., Taura, F., Tanaka, Y., Ishikawa, Y., Morimoto, S., and Shoyama, Y. (2005) Tetrahydrocannabinolic acid synthase, the enzyme controlling marijuana psychoactivity, is secreted into the storage cavity of the glandular trichomes. *Plant Cell Physiol.* 46, 1578–1582.
- Slusarkiewicz-Jarzina A, Ponitka A, Kaczmarek Z (2005) Influence of cultivar, explant source and plant growth regulator on callus induction and plant regeneration of *Cannabis sativa* L. *Acta Biol Cracov Ser Bot* 47 (2):145-151.
- Stout JM, Boubakir Z, Ambrose SJ, Purves RW, Page JE (2012) The hexanoyl-CoA precursor for cannabinoid biosynthesis is formed by an acyl-activating enzyme in *Cannabis sativa* trichomes. *Plant J.* 2012 Aug;71(3):353-65.
- Taura, F., Sirikantaramas, S., Shoyama, Y., Yoshikai, K., Shoyama, Y. and Morimoto, S. (2007) Cannabidiolic-acid synthase, the chemotype-determining enzyme in the fiber-type *Cannabis sativa*. *FEBS Lett.* 581, 2929–2934.
- Taura, F., Tanaka, S., Taguchi, C., Fukamizu, T., Tanaka, H., Shoyama, Y. and Morimoto, S. (2009) Characterization of olivetol synthase, a polyketide synthase putatively involved in cannabinoid biosynthetic pathway. *FEBS Lett.* 583, 2061–2066.
- van Bakel, H., Stout, J.M., Cote, A.G., Tallon, C.M., Sharpe, A.G., Hughes, T.R. and Page, J.E. (2011) The draft genome and transcriptome of *Cannabis sativa*. *Genome Biol.* 12, R102.
- Veliky IA, Genest K (1972) Growth and metabolites of *Cannabis sativa* cell suspension cultures. *Lloydia* 35 (4):450-456.
- Wielgus K, Luwanska A, Lassocinski W, Kaczmarek Z (2008) Estimation of *Cannabis sativa* L. Tissue Culture Conditions Essential for Callus Induction and Plant Regeneration. *J Nat Fib* 5 (3):199-207.
- Yancheva, S. D., Golubowicz, S., Yablowicz, Z., Perl, A. and Flaishman, M. A. (2005). Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and recovery of transgenic plants from fig (*Ficus carica* L.). *Plant Sci.* 168: 1433-1441.
- Yancheva, S. D., Shlizerman, L. A., Golubowicz, S., Yablowicz, Z., Perl, A., Hanania, U. and Flaishman, M. A. (2006). Green fluorescent protein as a tool for improving *Agrobacterium*-mediated transformation of ‘Spadona’ pear (*Pyrus communis* L.). *Plant Cell Rep.* 25: 183-189.