

שם ההצעה: גישה מולקולרית חדשנית ליצירת נץ חלב אדום לא טרנסגני

A new molecular approach for generation of non-transgenic red *Ornithogalum dubium*

דיווח מחקר מסכם לתכנית המחקר - 20-10-0049-15

256-0996-17

שנות המחקר: שנה שלישית מתוך 3 שנים

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

חוקרים:

איריס ידידיה	מכון וולקני, תקן	irisy@volcani.agri.gov.il	פיסיולוגיה של נ"ח, טרנספורמציה, תרבות רקמה - תקן
צחי ארזי	מכון וולקני, תקן	tarazi@volcani.agri.gov.il	תכנון RNA מנחה ופוסטמיידים, אנאליזת מוטנטים - תקן
טל איזיקסון	מכון וולקני, תקן	tali@volcani.agri.gov.il	קרטואידים, מסלולי ביוסינתזה - תקן
אלכסנדר ליפסקי	מכון וולקני, גמלאות	lipsky@volcani.agri.gov.il	מערכת טרנספורמציה, תרבות רקמה - תקן
פיני שניר	שה"מ, תקן	psnir@shaham.moag.gov.il	ליווי

הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים הכתובים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים ואינם בגדר המלצות גידול לחקלאים.

איריס ידידיה

חתימת החוקר:

תקציר הדו"ח

הבעיה: יצוא נץ חלב (נ"ח) מישראל פודה 15-20 מיליון אירו בשנה, והגיע למיצוי הפוטנציאל הכלכלי שלו בישראל. פיתוח נ"ח אדום לשיווק בכריסטמס ובולנטין יוביל לפריצת דרך בשיווק.

צבע הפרח בנ"ח נגזר מפייגמנטים במסלול הקרטואידי, כאשר הפיכת ליקופן לנגזרות טבעתיות ע"י ליקופן ציקלאז מוביל לצבע הכתום. פגיעה בפעילות האנזים בעלי הכותרת, תאפשר הצטברות ליקופן בפרח.

מטרה: עריכה גנטית באמצעות CRISPR-Cas9 ליצירת נ"ח אדום, לא טרנסגני.

שיטות: CRISPR-Cas9 נבחר כטכנולוגיה מועדפת לנטרול הגן הכרומופולסטי לליקופן β -ציקלאז המתבטא בעלי הכותרת, בנ"ח. במהלך תקופת המחקר תוכננו ונבחנו ארבעה קונסטרקטים שונים (אחד ביקורת) המכילים RNA מנחה להשתקת הגן. החדרת הפלסמידים בוצעה בתרחיף שהכיל אשכולות (מקבצים) של תאי נ"ח קומפיטנטים, ע"י ירי באקדח גנים. ריבוי ורגנרציה של צמחונים בוצעו בתרבות.

תוצאות: התקבלו צמחים טרנסגניים המבטאים Cas9, אך לא התקבלו צמחים ערוכים גנטית כנראה בגלל חוסר ביטוי של פולימראז III באמצעות פרומוטר האורז. רוצפו מרבית מרכיבי הפרומוטר הנחוץ מנ"ח, אך ייתכן כי יש צורך ברצוף מקטע ארוך יותר לקבלת ביטוי.

המלצות למחקר עתידי: הגברת יעילות קריספר ע"י שימוש בפרומוטר מנ"ח, ביטוי מספר sgRNA בו זמנית, להגברת הסיכוי לקבלת מוטציה בגן המטרה. ביצוע השתקה מקבילה להוכחת היתכנות באמצעות RNAi.

רקע: טכנולוגיית עריכת גנים מהווה פריצת דרך בטיפול צמחים לתועלת האדם. בעבודה זו, הטכנולוגיה מיושמת בצמח הנוי נץ חלב (נ"ח) כתום, במטרה לפתח נ"ח לא טרנסגני, בעל פרחים אדומים. עריכת הגן ליקופן ציקלאז וניטרולו בעלי הכותרת עשויה להוביל להשגת הפנוטיפ האדום. ליקופן ציקלאז הוא הגן האחראי

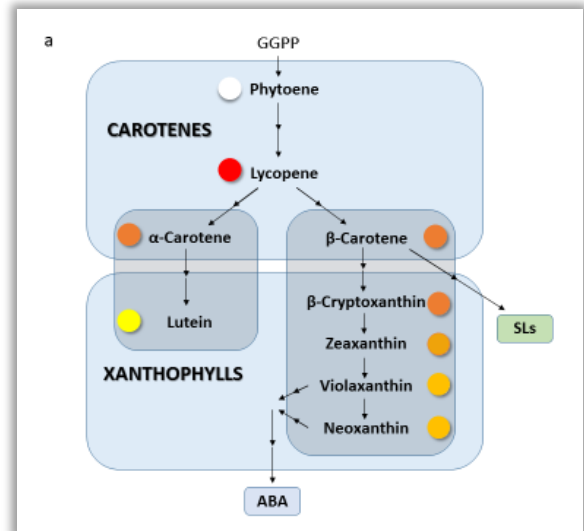
לעיבוד הפיגמנט האדום - ליקופן לנגזרותיו הטבעיות (α -ו- β) ובכך לקבלת הפנוטיפ הכתום האופייני לעלי הכותרת של נץ חלב.

הסוג נץ חלב (*Ornithogalum*) נמנה בעבר על משפחת היקינתוניים (Hyacinthaceae) ושויך לאחרונה למשפחת האספרגיים (Asparagaceae). הסוג כולל עשבוניים, חד-פסיגיים, בעלי בצל, שושנת עלים ועמודי פריחה זקופים הנושאים עד עשרות פרחים (Littlejohn, 2006). נ"ח כתום (*O. dubium*) מגיע לפדיון של 15-20 מיליון אירו בשנה ועל פי נתוני השנים האחרונות מיצה את פוטנציאל ההתרחבות שלו. נץ חלב אדום כמוצר חדש ובלעדי, עשוי להוות נישא ייחודית בפדיון גבוה ולהגביר את יתרונו של מגדלי ישראל ביחס למתחרים.

צבעי הכותרת בנ"ח כתום נקבעים ע"י פיגמנטים ממשפחת הקרוטנואידים (Griesbach et al., 1993). מולקולות השרשרת האיזופרנואידיות כוללות 40 פחמנים וחיוניות לצמח בתהליך הפוטוסינטזה, וכצבענים המקנים לפירות ופרחים רבים גוונים של צהוב, כתום ואדום. הקרוטנואידים משמשים גם כחומרי מוצא להורמונים הצמחיים חומצה אבסיסית (ABA) וסטריגולקטונים (Cazzonelli & Pogson, 2010). המורפולוגיה של נ"ח דוביום כוללת תפוחית סוככית מרובת פרחים בצבעי כתום עד צהוב עם אזור כהה במרכז הפרח ועלים קצרים וירוקים. צמחים חד פסיגיים אחרים המתבססים על מסלול זה ליצירת צבעי פרחים הנם למשל איריס (*Iris*) (Meckenstock, 2005), נרקיס (Li et al., 2015) וחבצלת (Yamagishi et al., 2010). מסלול היצירה של קרוטנואידים שמור מאוד בין צמחים שונים, והגנים האורתולוגיים מראים רמת דמיון גבוהה (Ahrazem et al., 2010). פיגמנטים אלה נמצאים גם ברקמות וגטיביות בד"כ בכלורופלסטים, שם נוכחותם מוסייית ע"י כלורופיל. ברקמות רפרודוקטיביות (פרחים ופירות), הקרוטנואידים אגורים בד"כ בכרומופלסטים שם הם נוצרים ומצטברים בכמות גבוהה תוך זמן קצר. שינויים ברמת ביטוי גנים במסלול הבייסינטזה של קרוטנואידים קובעים במידה רבה את התפתחות הצבע ברקמות. העלייה בייצור ובהצטברות של קרוטנואידים מסוימים, מלווה לרוב בפירוק כלורופיל. צבע אדום בעגבנייה מלווה בעליה דרמטית בביטוי הגנים Phytoene synthase ו-Phytoene desaturase יחד עם ירידה בביטוי Lycopene cyclase מסוג ϵ -ו- β לרמה אפסית בשלבי ההבשלה המתקדמים (איור 1). השינויים בביטוי גנים במסלול, אחראים לעליה של פי 10-15 בכלל קרוטנואידים ועד פי 500 בריכוז הליקופן בפרי במהלך ההבשלה, המקנה לפרי את צבעו האדום. מוטציות המשנות את ביטוי הגנים לליקופן ציקלאזות משנות גם את הצטברות הליקופן בפרי וגם את צבעו (Ronen et al., 2000). השתקת הגן Lycopene β -cyclase באשכולית אדומה ובאבטיח אפשרה צבירת ליקופן (Alquezar et al., 2013). כך גם בעלי כותרת של ציפורני חתול ואיריס (Meckenstock, 2005). בזעפרן אופיינו שני גנים לליקופן בטא-ציקלאז, אשר אחד מהם התבטא ספציפית בכרומופלסטים ופרופיל הביטוי שלו השפיע על צבירת צבע אדום בצלקת (Ahrazem et al., 2010).

הנחת העבודה הייתה כי נטרול ליקופן ציקלאז הכרומופלסטי בעלי הכותרת בנ"ח כתום תוביל לשינוי צבע בדומה לעלי הכותרת של העגבנייה המוטנטית Beta, שם התקבלה צבירת ליקופן למרות נוכחות הגן הכלורופלסטי בעלי הכותרת (Ronen et al., 1999). טרנסקריפטום נ"ח דוביום חשף שני קונטיגים comp146645 ו-comp139964 המקודדים לחלבונים בעלי הומולוגיה גבוהה - 77% ו-88% לליקופן ציקלאז כרומופלסטי CstLycB2a וכלורופלסטי CstLcyB1 מזעפרן, בהתאמה. רצפים אלה שמשו כבסיס

לתכנון הקונסטרוקטים ששמשו בהמשך העבודה לירי על תאי נ"ח לצורך עריכת הגן באמצעות CRISPR/cas9. CRISPR/cas9 הינה מערכת לטיווח גנים המאפשרת חיתוך של דנ"א גנומי ביעילות גבוהה, על ידי רנ"א מונחה, קצר ולא מקודד, באורך של 20 נוקליאוטידים (sgRNA), על ידי האנזים CAS9 (Jiang et al., 2013). תיקון השבר הדו-גדילי כתוצאה מהחיתוך, יוביל לקבלת מוטציות, הצפויות במידה ויתקבלו בגן המקודד לחלבון לשבש את מסגרת קריאת החלבון ואת ביטוי הגן. המערכת הודגמה במספר צמחים (Belhaj et al., 2013), ומאפשרת שינוי גנטי נטול השלכות אקולוגיות או אתיות (Pennisi, 2013). טכנולוגיה זו שימשה כאן



איור 1. מסלול הבינסינתזה של קרוטנואידים שנמצאו בזנים השונים של נ"ח עפ"י צבעם.

במטרה לנטרל את הגן לליקופן ציקלאז. רצף הרנ"א המטווח (sgRNA) הינו באורך 20 בסיסים ותוכן לנטרול הגן הכרומופלסטי בעלי הכותרת של נ"ח כתום. קבלת מוטציות ע"י מערכת ה CRISPR/Cas9 מחייבת ביטוי שני רכיבים: חלבון Cas9 הדורש פרומוטר סטנדרטי קונסטיטוטיבי לשעתוק ע"י RNA פולימראז II; ורכיב gRNA הדורש שעתוק ע"י פרומוטר ל RNA פולימראז III. sgRNA תוכן עפ"י הריצוף הגנומי של הגן β cyclase Lycopene הכרומופלסטי בנ"ח, כך שיחתוך בתחילת הגן, באתר רסטרקציה, לשם איתור המוטציה ע"י פרוטוקול Restriction fragment length polymorphism (RFLP), כך שלאחר איבוד אתר רסטרקציה יתקבל דגם חיתוך שונה. בנוסף תוכן החיתוך לנקודת הצומת בין אקסון ואינטרון כך שמוטציה בנקודה זו תוביל לחוסר הכרה וכשל בחיתוך האינטרון, הצפוי להוביל לחלבון שאינו פעיל.

לחלבון Cas9 יש טיפוסים ממקורות שונים. במחקר זה ניסו בתחילה פלסמיד OsU6 המכיל את הגן pcoCas המכיל אינטרון (לספציפיות בהתמרות באמצעות אגרובקטריום). שעתוק חלבון זה נמצא תחת בקרה של פרומוטר 35S אשר עבד בעבר בנ"ח. יעילות ההתמרה נבדקה ע"י צביעת GUS (תחת אותו פרומוטר) ונמצאה יעילה ע"י הצגת נקודות כחולות (Lipsky et al., 2014). הפרומוטר שנבחר לשעתוק ה gRNA הינו מאורז (חד פסיגי) ועבד באורגניזמים שונים. הפלסמיד מקנה עמידות לקנמיצין (Kan). בבדיקת רגישות ל Kan למטרת סלקציה, נראה כי נ"ח אכן רגיש ל Kan אך לאורך זמן נצפה גידול גם בתרביות הביקורת השלילית. לפיכך העלינו את ריכוז ה Kan.

חיפוש אחר המוטציה הרצויה בצמחונים מותמרים עם פלסמיד OsU6 לא נתן תוצאה חיובית. יתכן שהפרומוטר לא מתאים לביטוי בנ"ח או שיש בעיה בזיהוי והסרת האינטרון מתוך ה Cas9. בהתאם לכך תוכננו 2 פלסמידים נוספים. הוחלט לדוג את הפרומוטר ל U6 בנ"ח כתום בעזרת פרוטוקול RAGE. רוצף מקטע בעל כ 600bp המכיל את האלמנטים השמורים המתאימים לפולימראז III. מקטע זה הוכנס כפרומוטר ל sgRNA בפלסמיד hCas, המכיל Cas9 ללא אינטרון. גם פלסמיד זה מקנה עמידות ל Kan.

הפלסמיד הנוסף RZ עוקף את הצורך בפרומוטר מיוחד לפולימראז III ע"י ריבוזיים (RNA בעל פעילות אנזימתית) החותך את עצמו. פלסמיד זה מקנה עמידות להיגרומיצין. לעומת הסלקציה בעזרת Kan, בה יש

"פליטים" ונמשכת זמן רב, הסלקציה בעזרת היגרומיצין B חזקה ביותר. בהתמרה עם פלסמיד RZ התקבלו קאלוסים בעלי מורפולוגיה תקינה לעומת תאי wt בביקורת השלילית, אך גדילתם נעצרה. לאחר מספר חודשים בהם לא נראתה "התעוררות" בצמיחה, הוסרה האנטיביוטיקה בהנחה שהסלקציה כבר נעשתה. גם פלסמידים אלו לא גרמו למוטציות לאחר יישום פרוטוקול RFLP. יתכן ונ"ח רגיש להיגרומיצין ויש צורך בכיול ריכוזי עבודה נמוכים או מציאת גורם סלקציה אחר. בבדיקה של ביטוי רכיבי המערכת השונים בעזרת פרוטוקול cRT-PCR הראתה כי sgRNA's אינם מתבטאים כראוי לאחר שימוש בשלושת הפלסמידים, או שביטויים מתחת לסף הדטקציה ולכן גם הסבירות הנמוכה למציאת המוטציה.

לעומת זאת, בדיקת ביטוי רכיבי Cas9 השונים, במותמרי hCas הציגה **צמחים המבטאים Cas9**, אך הביטוי חלש ומותמרי OsU6 הציגו ביטוי חלקי בלבד. ברמת ה-DNA כל הצמחים המותמרים הציגו נוכחות Cas9 בגנום. מאחר ש Cas9 עלול להיות רעיל יתכן שיש עיכוב מצד הצמח, כפי שנצפה באצות. שימוש ב-RZ לא הציג ביטוי, יתכן שכתוצאה מעיכוב חזק של היגרומיצין, אך השתקה ע"י הצמח גם מהווה אפשרות סבירה. בנוסף לעבודה הגנטית, בוצע אפיון פרופיל קרטנואידים בעלי כותרת של נ"ח בעלי גוונים שונים (לבן, צהוב כתום), כדי לייצר את הפרופיל בסיס אליו ניתן יהיה להתייחס במידה ונצליח לקבל את השינוי הגנטי המתוכנן בעתיד (Lytochenko et al., 2009).

צמחי נוי הם מוצר צריכה ובהתאם לכך יש ביקוש גובר לזנים חדשים. שיטות השיווק ודרישות האיכות נקבעות במידה רבה ע"י שווקי היעד ומצויות בעליה מתמדת. יצירת זנים חדשים ע"י שיטות של השבחה קלאסית או מוטגנזה דורשת משאבים רבים ונמשכת זמן רב. השינויים המתקבלים אקראיים והמגוון הגנטי מוגבל ואינו עומד בדרישות השוק. המחקר הנוכחי נועד להרחבת מגוון הזנים בגישות חדשות בגיאופיט הנוי נ"ח כתום, ולהטמעת עריכה גנטית בטכנולוגיית CRISPR/Cas9 בנ"ח כמודל לגיאופיטים חד-פסיגיים נוספים.

מטרות המחקר: פיתוח נ"ח בעל פרחים אדומים, ע"י נטרול הגן המקודד לליקופן בטא ציקלאז כרומופלסטי בנ"ח כתום בעזרת עריכת גנום.

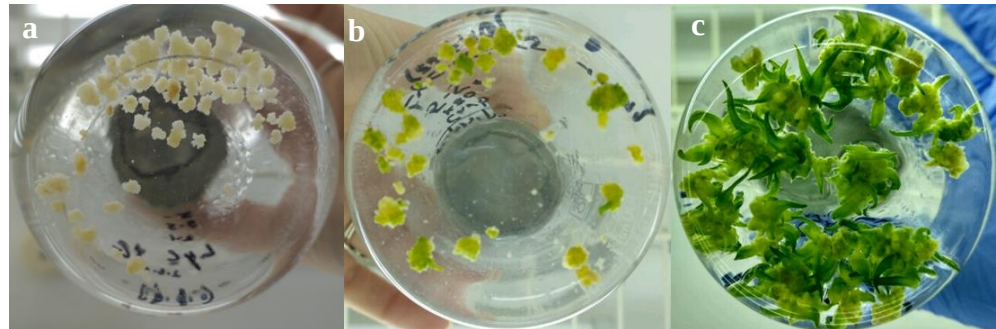
מטרות משנה: 1. החדרת קונסטרוקטים בינאריים המקודדים ל- Cas9 ול- sgRNA ספציפי לגן comp146645 לנ"ח; 2. זיהוי צמחים המכילים מוטציה מנטרלת בגן comp146645 ; 3. הכלאה עצמית של צמחים אלו וסריקה לצמחים שאיבדו את הטרנסגן והינם הומוזיגוטים למוטציה ב- גן comp146645 וצפויים להיות אדומים; 4. פענוח וכימות מסלול הביוסינתזה של הקרטנואידים בנ"ח לטובת עבודה זו ולצורך פיתוחים עתידיים בנ"ח בהתאם לדרישות השוק.

עיקרי הניסויים, תוצאות המחקר ודיון:

במהלך המחקר נעשה שימוש בשלושה קונסטרוקטים אשר תוכננו במסגרת מחקר זה (וקונסטרוקט ביקורת) אשר שמשו להפצצת תרביות צברי תאים של נ"ח דוביום (*O. dubium*) תאים קומפטנטים משני קוים (95/49/60 וקו מסחרי 5) של נ"ח דוביום הוכנו כבסיס לירי (איור 2). התאים גודלו במצע נזלי M-206 Sodium metasilicate nonahydrate (122 mg/L) סיליקאט (Lipsky et al., 2014) מועשר בסודיום להורדת היפר-הידרציה ולמטרת חיזוק הצמח בהתמודדות עם מצבי סטרס והאנטיביוטיקה קרבניצילין (mg/L)

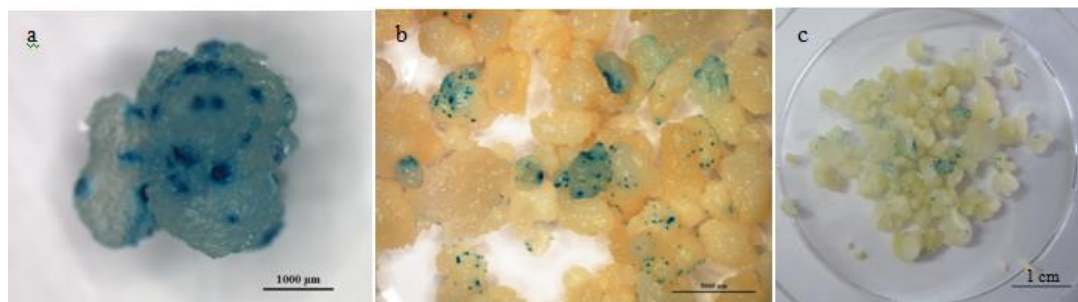
500) למניעת זיהומים בתרביות. הפרוטוקול המשופר לגידול ורגנרציה של נ"ח כתום פותח במסגרת מחקר זה והוכח כיעיל במיוחד במניעת היפר-הידרציה של הקאלוסים. עוד נראה כי הוספה של Carb (600 mg/L) אינה מפריעה לתרביות נ"ח (המידע אינו מוצג). הוספת האנטיביוטיקה הפחיתה את הזיהום האנדוגני במידה ניכרת.

טרנספורמציה: תאים קומפיטנטים בעלי כושר רגנרציה הינם שלב חיוני קודם להפצצת חלקיקים. קאלוסים שמשו להכנת תרחיף תאים (בחושך) לקבלת דה-דיפרנציאציה (איור 2a). יכולת רגנרציה נבחנה ע"י העברת חלק מתרחיף התאים לגידול באור. גושי התאים הוכיחו יכולת רגנרציה טובה (איור 2b,c).



איור 2. התפתחות נץ חלב מתרבית אמבריונית לאחר הפצצת עם הפלסמיד pRCS:Ubi:Cas9-OsU6:sgRNA - קו 5. תרחיף תאים וצברים של גושי תאים (a), גושי תאים בשלב האמבריונאלי (b), צמחונים לאחר רגנרציה (c).

יעילות ההתמרה ע"י הפצצת החלקיקים בוצעה ע"י פלסמיד המכיל גן מדווח- β -glucuronidase, בנוסף לפלסמיד המכיל את crRNA-Lyc, בתהליך ההפצצה. תאים אשר עברו טרנספורמציה מוצגים ע"י צביעת GUS בתור נקודות כחולות (איור 3a-c). התוצאות מראות כי שיטת הירי עובדת ומובילה לביטוי הפלסמיד בתאי נץ החלב. האנזים Cas9 המבוקר על ידי אותו פרומוטר CaMV 35S הופץ במקביל וניתן להסיק כי יעילות ההתמרה הייתה דומה.



איור 3. צביעת GUS לאחר הפצצת חלקיקים. תרביות נץ חלב קו 5 הופצצו בפלסמיד המכיל את crRNA לגן לליקופן β ציקלאז ובפלסמיד נוסף המכיל את הגן β -glucuronidase המקנה את הגן המדווח לצמח ומאפשר צביעת GUS המתבטאת בנקודות כחולות. a,b, צולמו בבינוקולאר. c צילום של כל הצלחת שעברה הפצצה.

הנדסת קונסטרקט בינארי לעריכת הגן לליקופן β ציקלאז (comp146645) מנ"ח באמצעות טכנולוגיית CRISPR/Cas9: רצף ה-mRNA המושלם של הגן comp146645 נתקבל מה-RNAseq. על בסיס רצף זה תוכנן crRNA ספציפי ל-comp146645 שינחה לחיתוך בתחילת הגן ובכך יאפשר את נטרולו המוחלט. crRNA מועדף הוא כזה, שחיתוך בעזרתו משבש אתר רסטריקציה קיים ומאפשר זיהוי נוכחות מוטציה בתוצר PCR ע"י איבוד אתר רסטריקציה (Belhaj et al., 2013). תכנון crRNA ו-blast כנגד טרנסקריפטום נ"ח לבדיקת

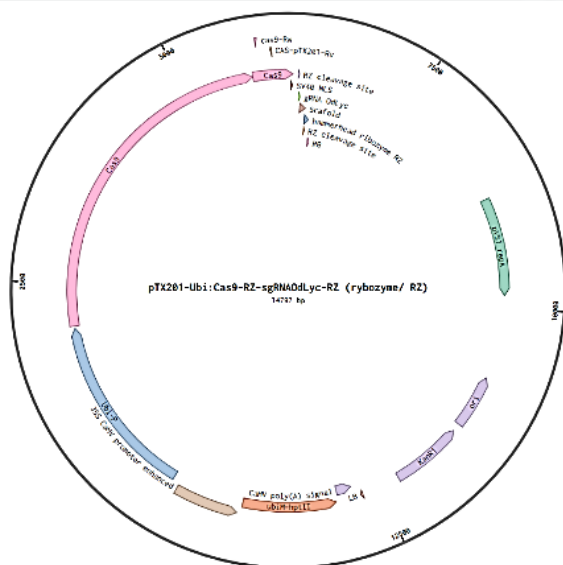
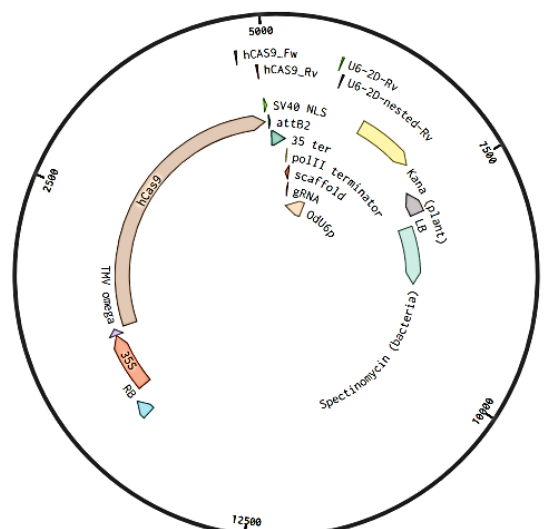
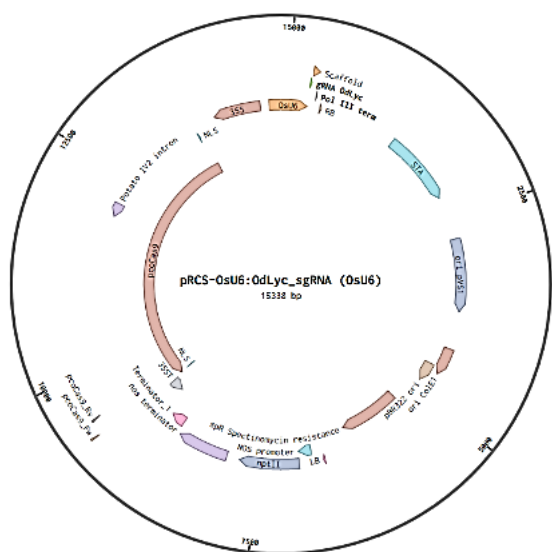
ספציפיות, התבצע באתר (<http://cas9.cbi.pku.edu.cn/contact.jsp>). הבדיקות לנוכחות מוטציות בגן, נעשו על תרביות נ"ח לאחר הפצצה בפלסמיד 1 המבטא את ה-sgRNA תחת פרומוטר OsU6 מאורז שעבד באורז ובסורגום

(Jiang et al., 2013). למרות שהצמחים עברו התמרה, לא הצלחנו לאתר בתאים הסומטים מוטציה בגן המטרה. העדר מוטציה יכול להיות תוצאה של מספר גורמים: יתכן כי ביטוי CAS9 היה חלש; האינטרון ברצף CAS9 לא נחתך החוצה בזמן הבשלת mRNA; ייתכן שהפרומוטר לפולימראז 3 מאורז OsU6 המבטא את ה-sgRNA אינו מתאים לביטוי בנץ חלב. האינטרון נועד להקנות ספציפיות בביטוי בטרנספורמציות שנעשות באמצעות אגרובקטריום. בהתאם לתוצאות הנ"ל הוחלט לתכנן פלסמידים נוספים ולבטא CAS9 ללא אינטרון לאור השימוש בהפצצת חלקיקים. כמו כן, בוצע פרוטוקול RAGE לריצוף פרומוטר מלא של U6 מנץ חלב. תוכננו 2 פלסמידים נוספים ובוצע ירי מחודש של שלושת הפלסמידים על תרביות תאים חדשות. פלסמיד נוסף (Pell) ללא sgRNA ספציפי Lyc שימש כביקורת שלילית לבחינת ספציפיות פעילות ה-Cas9 ע"י פלסמיד זהה ל-OsU6 אך בעל sgRNA שונה.

פלסמיד 1. יצירת פלסמיד pRCS-OsU6:OdLyc_sgRNA (OsU6)
לאחר בחירת רצף crRNA המתאים הוגבר sgRNA בעזרת PCR על הפלסמיד pRCS-35S:Cas9-AtU6-sgRNA ושובט לוקטור הבינארי **pRCS:35S:Cas9-OsU6:sgRNAOdLyc**, המבטא Cas9 תחת בקרת הפרומוטר הקונסטיטוטיבי של ubiquitin מתירס ואת ה-sgRNA תחת הפרומוטר של U6 מאורז. פרומוטר זה משועתק על ידי pol III ומאפשר לשעתק sgRNA ללא טרמינטור ארוך, הכרחי לקישור על ידי Cas9. לטובת הוכחת התכנות, הקונסטרוקט מכיל גם גן סלקציה המקנה עמידות לאנטיביוטיקה קנמיצין.

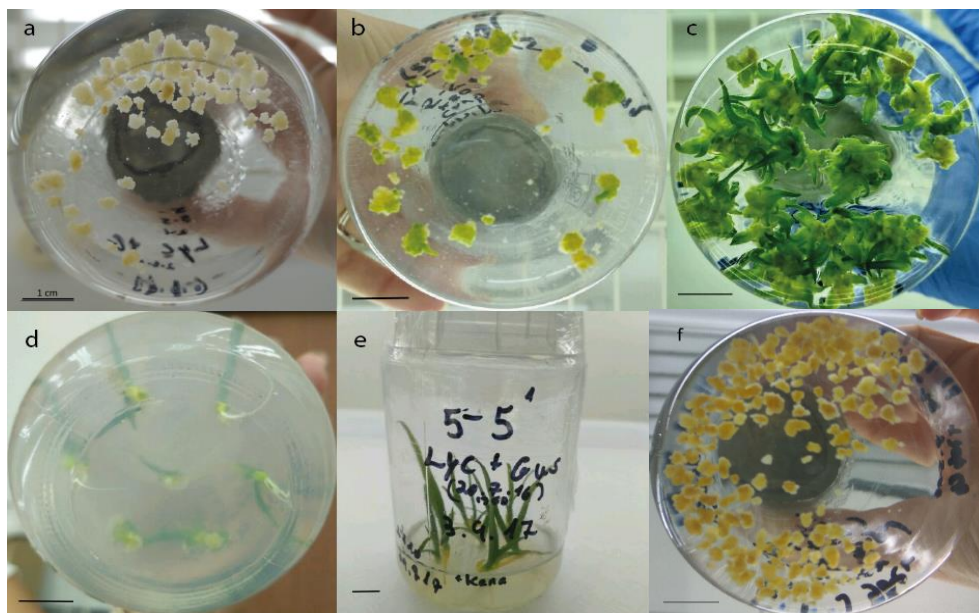
פלסמיד 2. יצירת פלסמיד pK7WGF2:35S-TMV-hCas9-Odu6p_gRNA_OdLyc
בנייה על שלד פלסמיד hCAS בקיצור pTX201-RZ: נבנה על שלד פלסמיד שהוזמן מ addgene והכיל Cas9 ללא אינטרון ופרומוטר OdU6p משוער מנץ חלב. הפלסמיד מקנה עמידות לקאנמיצין בצמחים ועמידות לספקטומיצין בחיידקים.

פלסמיד 3. יצירת pTX201-Ubi:Cas9-RZ-sgRNAOdLyc-RZ
בנייה על שלד פלסמיד שהוזמן מ addgene ומכיל ריבוזימים (Ribozyme) המתבטא יחד עם Cas9 תחת פרומוטר יוביקוטיין (Ubi-p) המציג רמת ביטוי גבוהה יותר מ-35S. מאחר וריבוזימים חותך את עצמו אין צורך בביטוי sgRNA תחת פרומוטר לפולימראז III. פלסמיד זה מקנה עמידות להיגרומיצין B בצמחים ועמידות לקאנמיצין בחיידקים.



איור 4. מפות הפלסמידים שיוצרו לעריכת הגן ליקופן ב ציקלאז בן חלב כתום : פלסמיד 1. pRCS-OsU6: OdLyc_sgRNA. מתבסס על פלסמיד pRCS: 35S: Cas9-AfU6: sgRNA ממעבדתו של ד"ר צחי ארזי. מכיל Cas9 תחת פרומוטור 35S סטנדרטי הכולל אינטרון potato IV2 intron, single guide RNA (sgRNA) תחת פרומוטור U6 מאורז, ומקנה עמידות ל Kan בצמחים ולספקטומיצין בחיידקים; **פלסמיד 2.** pK7WGF2: 35S-TMV-hCas9-Odu6p_gRNA_OdLyc. פלסמיד addgene. מכיל Cas9 תחת פרומוטור 35S סטנדרטי, single guide RNA (sgRNA) תחת פרומוטור משוער ל U6 מני"ח, מקנה עמידות ל Kan בצמחים ולספקטומיצין בחיידקים; **פלסמיד 3.** pTX201-Ubi: Cas9-RZ- sgRNAOdLyc-RZ. מתבסס על השלד (backbone) של פלסמיד pTX201 שהוזמן מ addgene. רייבוזיים (Ribozyme) (בעל יכולת חיתוך עצמית) המכיל Cas9 ו single guide RNA (sgRNA) תחת פרומוטור של ק-Ubi שמתבטא ביעילות גבוהה יותר מ S35 סטנדרטי ומקנה עמידות ל Hygro בצמחים ול Kan בחיידקים.

טרנספורמציה ורגנרציה: תרחיף תאים אמבריוגני של הקווים נ"ח 60 ו-5 הוכן לניסוי. הקונסטרקטים הבאים pK7WGF2:35S-TMV-hCas9-Odu6p_gRNA_OdLyc ; pRCS:Ubi:Cas9-OsU6:sgRNA-Lyc ו- pTX201-Ubi:Cas9-RZ-sgRNAOdLyc-RZ וביקורת פלסמיד ללא sgRNA ספציפי, הוחדרו לתאים בעזרת אקדח גנים ע"ג חלקיקי זהב, פרוטוקול שהוכיח את יעילותו בנ"ח בעבודות קודמות (Lipsky et al., 2014). פרוטוקול הרגנרציה אפשר קבלת צמחונים מותמרים המבטאים עמידות לאנטיביוטיקה (איור 5) וחלקם אושרו כמבטאים Cas9. למרות שנסרקו עשרות צמחים מותמרים שבטאו חלק ממרכיבי המערכת, לא הצלחנו להראות את המוטציה בגן לליקופן ציקלאז. יש לציין כי העובדה שלא מצאנו את המוטציה שנגרמה ע"י מערכת Cas9 אינה שוללת את האפשרות שהמוטציה קיימת והתדירות בה התרחשה נמוכה מסף הדטקציה שלנו.



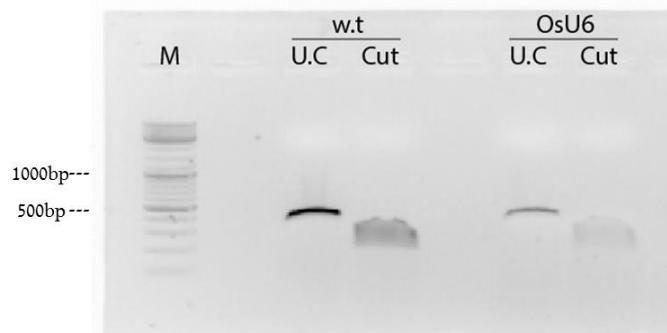
איור 5. התפתחות נ"ח חלב (ני"ח) מותרית אמבריוגנית לאחר הפצצה עם הפלסמיד pRCS-OsU6: OdLyc_sgRNA על קו 5. תרחיף תאים וצברים של גושי תאים (a), תרחיף תאים בשלב האמבריוגנזה (b) תרחיף צמחונים לאחר רגנרציה (c), צמחונים מושרשים במצע מוצק ממבט תחתון (d) ומבט צד (e) וביקורת שלילית (f). סקלת גודל- 1 ס"מ.

איתור מוטציה מנטרלת בגן לליקופן ציקלאז: סריקה לנוכחות המוטציה התבצעה ע"י PCR וחיתוך התוצר באנזים רסטריקציה Hin1I. תוצרים שנחתכים במלואם מעידים על רצף לא מוטנטי (איור 6). לעומתם תוצרים הנחתכים בחלקם (חצי מהתוצר) או לא נחתכים כלל, מעידים על מוטציה באלל יחיד או בשני האללים של הגן, בהתאמה. תוצרים אלו נשלחו לריצוף. התוצאות בעזרת חיתוך התוצר והגברת הבנד שלא נחתך לא נתנו תוצאה חד משמעית, כך גם ריצוף עמוק לתוצר המוגבר שלא נחתך (בוצע כדי להבין האם המוטציה קיימת אך

בתדירות נמוכה מאוד). במרבית המקרים הבנדים נחתכו במלואם (איור 6), לא התקבל תוצר לא חתוך שעבר הגברה. ה-DNA שהופק לא הכיל המוטציה רצויה בגן לליקופן ציקלאז. ניתן לשער כי אחד הרכיבים בקונסטרוקט לא התבטא כמו שצריך או שהביטוי היה כל כך חלש שנותר מתחת לסף דטקציה. לפיכך הוחלט לנסות פלסמידים נוספים (איור 4) עם רכיבים שונים של CRISPR/Cas9 ובמקביל להמשיך לבדוק את ביטוי הרכיבים הקיימים.

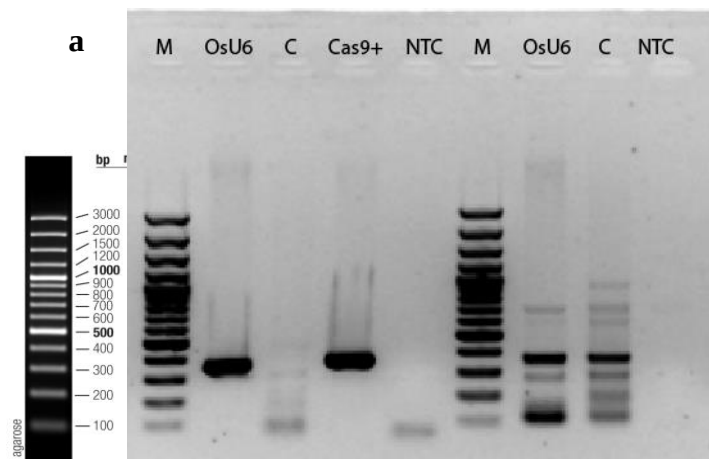
אנליזת RFLP למציאת מוטציה מנטרלת בגן לליקופן β ציקלאז

איור 6. הפרדה על גבי ג'ל של תוצרי אנליזת RFLP של קאלוסים OsU6 מול זן הבר-wt כביקורת לחיתוך מלא, המתמיינים תחת סלקציה כ-3 חודשים ע"י חיתוך גנומי, הגברת PCR ושוב חיתוך. נעשה חיתוך גנומי בעזרת אנזים רסטריקציה *Hin1II*, הגברת PCR בעזרת פריימרים של *Lyc* (*Lyc393-F*, *Lyc325-R*), חיתוך נוסף לתוצרי ה-PCR והרצה על גבי ג'ל אגרוז 1.5%. M-סמן גודל Ladder 2 log Cut; -U.C. עבר חיתוך; -U.C. ביקורת ללא אנזים רסטריקציה.

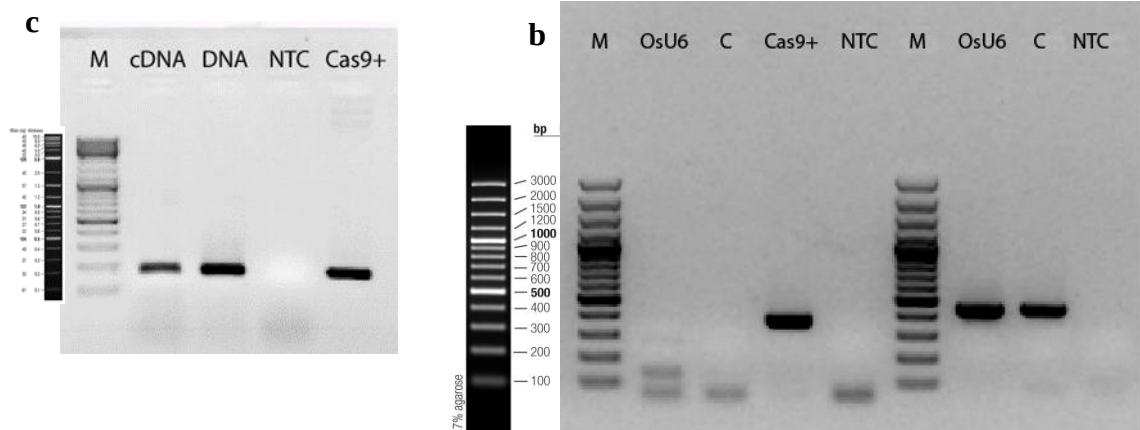


אנליזת PCR לבדיקת נוכחות cas9 ו-Lyc ברמת ה-DNA לצמחוני נץ חלב OsU6 לאחר רגנרציה

איור 7. אנליזת PCR לבדיקת ביטוי הגן cas9 ברמת ה-DNA (a) ו-cDNA (b). גיל אגרוז 1.5%; 135 V; 20 דק'. 100 bp Ladder. באריות 1-4, PCR בעזרת פריימרים של CAS9 (*Cas9_Rv*, *Cas9_Fw*), באריות 5-7, PCR בעזרת פריימרים לגן בקורת (ליקופן ציקלאז *Lyc449-F*, *Lyc449-R*) (לדנא *Lyc645-FP*, *Lyc645-RP*). ביטוי Cas9 ברמת cDNA (c).



אנליזת PCR לבדיקת נוכחות cas9 ו-Lyc ברמת ה-cDNA בצמחוני נץ חלב OsU6 לאחר רגנרציה



כיון שלא נמצאו מוטציות בשלב הביטוי החולף או בצמחונים המותמרים הוחלט לבדוק את ביטוי Cas9.

איור 8: הפרדה על גבי ג'ל של תוצרי PCR לבדיקת ביטוי Cas9 ושחבור תקין בצמחוני OsU6. נעשתה הגברת PCR בעזרת פריימרים להגברת Cas9 סביב האינטרון (pcoCas9_Rv, pcoCas9_Fw) בבאריות 2-6, ולקראת סוף הגן (pcoCas_intron_Fw, pcoCas_intron_Rv) בבאריות 8-11 והרצה על גבי ג'ל אגרוז 1.5%. משמאל לימין: 1. M - סמן גודל Ladder 100 bp; 2. cDNA מצמחוני OsU6; 3. cDNA מצמחוני Pell; 4. cDNA מצמחוני ביקורת חיובית Cas9+; 5. DNA; 6. NTC - ביקורת ללא תבנית; 7. M - סמן גודל Ladder 100 bp; 8. cDNA מצמחוני OsU6; 9. cDNA מצמחוני Pell; 10. cDNA מצמחוני ביקורת חיובית Cas9+; 11. NTC - ביקורת ללא תבנית; 12. M - סמן גודל Ladder 100 bp.



העובדה ש gRNA לא התבטא אינה מעידה על ביטוי הגן Cas9 שהיה תחת פרומוטור אחר (35S) שיעילותו בהתמרת נ"ח כבר הוכחה. התרבויות נבדקו לנוכחות הגן ברמת ה DNA ורק לאחר מכן ברמת ה RNA. נמצא כי התרבויות בתרחיף התאים מותמרות ומכילות את הגן ל Cas9, אך אינן מבטאות את הגן בשלב זה או במידה מועטה (מתחת לסף הדיטקציה). בדיקת הצמחונים לעומת זאת הראתה בבירור כי כל הצמחונים הנבדקים אכן מותמרים ומכילים את הגן ל Cas9 (איור 7b), ונמצא ביטוי של הגן Cas9 בצמחי OsU6 גם ברמת ה RNA (איור 7c).

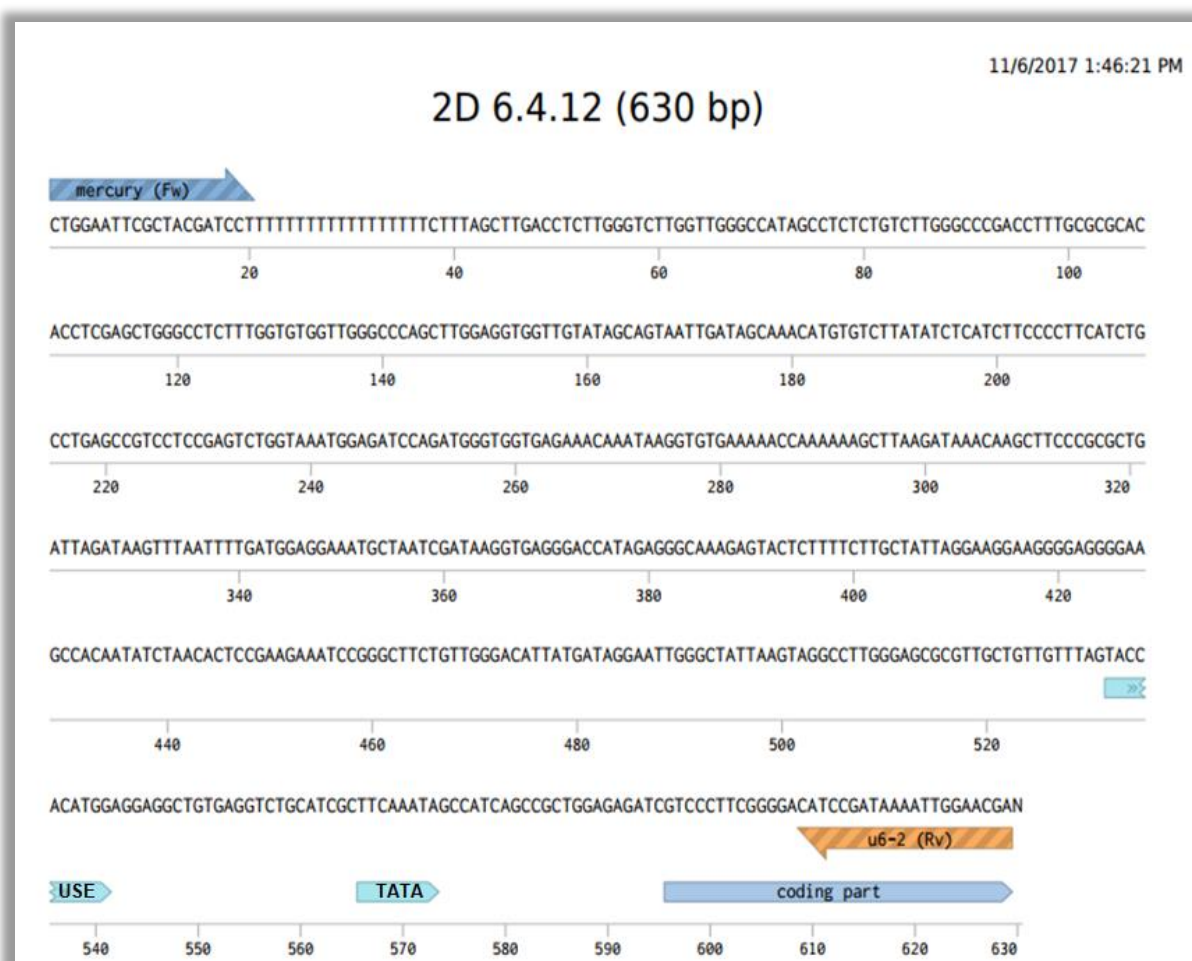
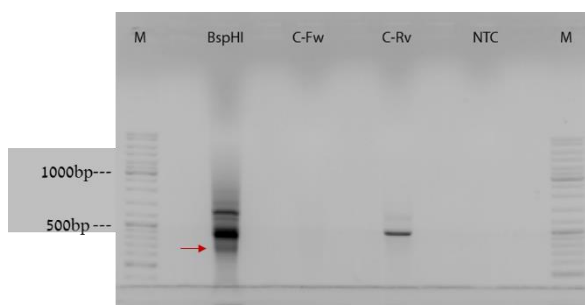
הוחלט לבדוק האם ביטוי Cas9 תקין והאינטרון מוסר בשלב עריכת ה mRNA. לשם כך נבדק גודל תוצר הגברת PCR של cDNA סביב האינטרון (איור 8). בבדיקת תקינות הביטוי ועריכת ה mRNA התגלה כי אמנם ישנו ביטוי עפ"י הגברת סוף הגן אך סביב האינטרון לא נעשתה הגברה של ה cDNA בצמחי נ"ח מותמרים. בבדיקה נוספת של צמחי OsU6 (תוצאות לא מוצגות) בהגברת מקטעים סביב האינטרון, מתוך האינטרון, מקטע הכולל צד אחד של האינטרון ובסוף הגן נמצא כי אין ביטוי כלל. מכאן נסיק כי ישנה בעיה בביטוי הגן, כנראה בשלב עריכת ה mRNA, יתכן ובזיהוי האינטרון ומוסרת חתיכה גדולה יותר.

פרוטוקול RAGE- Rapid amplification of genomic ends למציאת הפרומוטור U6 בנץ חלב כתום

מאחר ולא הצלחנו לאתר מוטציות בגן המטרה עם פלסמיד OsU6, המכיל פרומוטור מאורז, הוחלט לנסות למצוא את הפרומוטור מנ"ח. מאחר והגנום של נ"ח אינו ידוע, פריימרים לפרוטוקול RAGE תוכננו על בסיס האזורים השמורים ביותר של הגן U6 בחיטה, אורז וארבידופסיס. תוכננו שני פריימרים, "יחודיים: U6 ו- U6-2 שהוא פנימי (Nested) לפסילת תוצאות חיוביות כוזבות (false positive) ובשילוב עם פריימר אוניברסלי והפנימי שלו אשר הגבירו מספר מקטעים (איור 9). הבנד המסומן בחץ אדום נשלח לריצוף ונבדק להיתכנותו כפרומוטור ל U6 לפי אלמנטי פרומוטור שמורים. בהשוואה לרצף הקונצנזוס של (upstream sequence) USE (element) לפולימראז III (5'-TCCCACATCG-3') המתואר במאמר (Marshall, 1992), נמצאו אלמנטי פרומוטור שמורים - TATA box ו- USE המתאימים במרחקים (19)-(TATA BOX)-(23-25bp)-USE- Y.U6 coding region (23bp)-(3 helical turns) מתחילת הגן U6 בריצוף בנד 2D שהוגבר מתוצרי חיתוך גנומי מנ"ח בעזרת האנזים BspHI. (איור 10) ה USE בנ"ח בעל שתי אי-התאמות (mismatch) מרצף הקונצנזוס המסומנים בצהוב: TACCACATGG—24—TTCAAATA—22(ends with c)-coding region

לעומת ה TATA BOX אשר יחסית פחות שמור מרצף הקונצנזוס (Marshallsay, 1992) וגם שונה ב 2 bp בלבד.

איור 9: הפרדה על גבי גיל של תוצרי Nested-PCR למציאת הפרומוטור לגן U6 בנץ חלב כתום. נעשתה הגברת PCR בעזרת פריימרים nested לגן U6 (mercury, U6-2-Rv) לתוצרי PCR RAGE (כמפורט בסעיף 5.8) שנחתכו בעזרת אנזים BspHI והרצה על גבי גיל אגרוז 0.8%. משמאל לימין: 1. M- סמן גודל Ladder 2 log ; 2. Nested PCR ; 3. ביקורת Nested PCR ללא פריימר Rv ; 4. ביקורת Nested PCR ללא פריימר Fw ; 5. NTC- ביקורת ללא תבנית ; 6. M- סמן גודל Ladder 2 log . הבנד המסומן בחץ אדום בגודל ~650 bp נחתך מהגיל, עבר שיבוט ונשלח לריצוף.

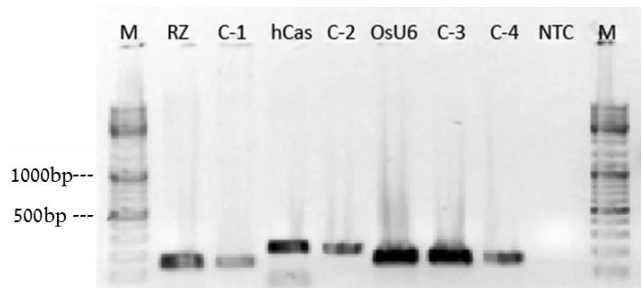


איור 10: רצף 2D המשוער כפרומוטור לגן U6. מסומנים הפריימרים בהם השתמשנו לריצוף. בנוסף מסומנים אלמנטי הפרומוטור השמורים- TATA box ו- USE והחלק המקודד של הגן. מוצג בעזרת תוכנת Benchling (<https://benchling.com>).

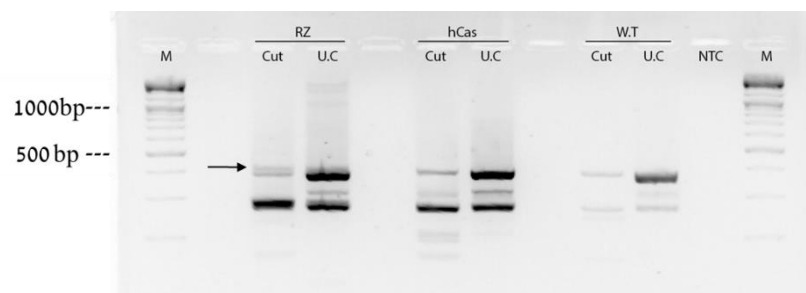
אנליזת RFLP למציאת מוטציה מנטרלת בגן לליקופן β ציקלאז וביטוי רכיבי Cas9 עם הפלסמידים hCas ו RZ (פלסמידים 2 ו- 3 בהאמה).

בדומה לתהליך המתואר קודם, נעשו הפצצות חלקיקים עם הפלסמידים החדשים, hCas ו RZ. לאחר וידוא הטרגסגניות לגן ל Cas9, נראה כי ההמרה הייתה יעילה מאחר וכל הדגימות מכילות את הגן Cas9 (איור 11), התבצע חיפוש המוטציות בקאלוסים בשלב הביטוי החולף, יומיים לאחר ההפצצה. בוצע חיתוך גנומי, הגברת PCR ושוב חיתוך והתקבלו בנדים אשר לא נחתכו, אך בנד דומה התקבל גם בביקורת זן הבר wt שאמור היה להיחתך במלואו (איור 12). בנוסף התקבל בנד אחד חריג שלא תואם את שאר הבנדים, לכן שלחנו אותו לריצוף אך לא נמצא מתאים לגן לליקופן בטא ציקלאז. נראה כי בשלב מסוים בהעשרה (אחרי הגברה שניה) מתקבלים בנדים שהם בגדר ארטיפקט. מאחר ובדיקה זו נעשתה בשלב מוקדם, עדיין ייתכן כי המוטציות יתגלו בשלב מאוחר יותר, ולכן הוחלט לבדוק את ביטוי ה Cas9 לאחר הפצצה בפלסמידים החדשים. לאחר 3 חודשי סלקציה נבדקה נוכחות Cas9 ב DNA גנומי לפני המשך עבודה (איור 13). בדיקת הנוכחות אשר נעשתה כשלב מקדים לבדיקת הביטוי, הראתה כי לאחר 3 חודשים לא נעשתה סלקציה מספקת, מאחר וניתן לראות כי תאי ה hCas שנבדקו אינם מכיל את הטרגסגן. יתכן ונזרק החוצה או שהסלקציה עדיין לא יעילה מספיק. לכן נעשתה הפצצת חלקיקים נוספת ונערכה בדיקה לביטוי חולף, יומיים לאחר ההתמרה. בבדיקה זו התגלה כי ישנו ביטוי אך הינו חלש ביותר (איור 14). במקרה של ה RZ, הרייבוזיים צריך להיחתך ל Cas9 ול gRNA. לכן נבדק הביטוי ובנוסף גם החיתוך. התוצאות היו אמורות להדגים האם נחתך או לא, אך נראה כי אין ביטוי כלל או שהוא חלש ומתחת לסף הדטקציה (לא מוצג).

איור 11: הפרדה על גבי גיל של תוצרי PCR לבדיקת נוכחות הגן Cas9 יומיים לאחר ההתמרה. נעשתה הגברת PCR בעזרת פריימרים של Cas9 בהתאמה לפלסמידים משמאל לימין (Cas9-Rv, Cas9-Fw, pTX201-Rv; hCas-Fw, hCas9-Rv; pcoCas9-Rv, pcoCas9-Fw) והרצה על גבי גיל אגרוז 1.5% לתאים שנקצרו יומיים לאחר ההתמרה. C- לכל אחד מהדגימות נעשתה ביקורת חיובית לפי הפלסמיד שלו והפריימרים בהתאמה. C1-3 הינם ביקורות פלסמידים בהתאמה הנמצאות מימין לכל דוגמא. C4 הינה ביקורת חיובית ל OsU6 של תאים מותמרים המכילים Cas9. משמאל לימין: 1. M- סמן גודל 2 log Ladder; 2. DNA מקאלוס RZ; 3. C-1 ביקורת פלסמיד חיובית; 4. DNA מקאלוס hCas; 5. C-2 ביקורת פלסמיד חיובית; 6. DNA מקאלוס OsU6; 7. C-3 ביקורת פלסמיד חיובית; 8. C-8 Cas9; 9. NTC- ביקורת חיובית; 10. M- סמן גודל 2 log Ladder.

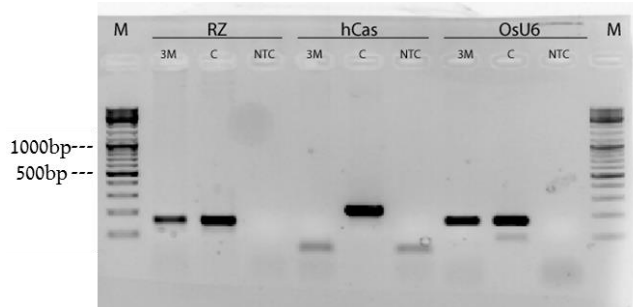


איור 12: הפרדה על גבי גיל של תוצרי אנליזת RFLP של קאלוסים hCas, RZ יומיים לאחר ההתמרה. לבדיקת ביטוי חולף מול זן הבר wt כביקורת לחיתוך מלא, ע"י חיתוך גנומי, הגברת PCR, חיתוך נוסף והגברת PCR. חיתוך בעזרת PCR אנזים רסטריקציה Hin1II, הגברות PCR בעזרת פריימרים של Lyc (Lyc393-F, Lyc393-R), והרצה על גבי גיל אגרוז 1.5%. M- סמן גודל 2 log Ladder; Cut- עבר חיתוך; U.C- ביקורת ללא אנזים רסטריקציה. נמצא בנד השונה בגודלו ואינו מתאים לתבנית ה wt (מסומן בחץ), נשלח לריצוף כחשוד למוטציה חוספה, אך לא התקבל רצף.

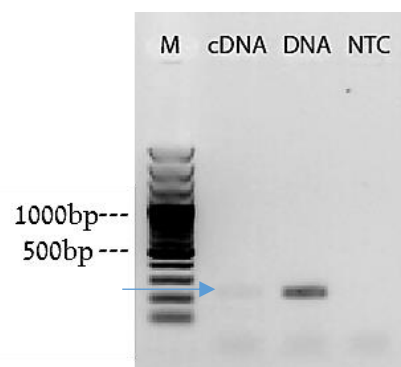


ירי הפלסמידים הנוספים הצביע שוב על יעילות מערכת הטרגספורמציה בנ"ח כתום ועל היכולת לקבל רגנרציה יעילה של צמחונים בתרבות. כל הצמחונים ביטאו Cas9 ברמת ה- DNA וחלקם אף הציגו ביטוי ברמת ה- cDNA אם כי הביטוי היה חלש מאוד.

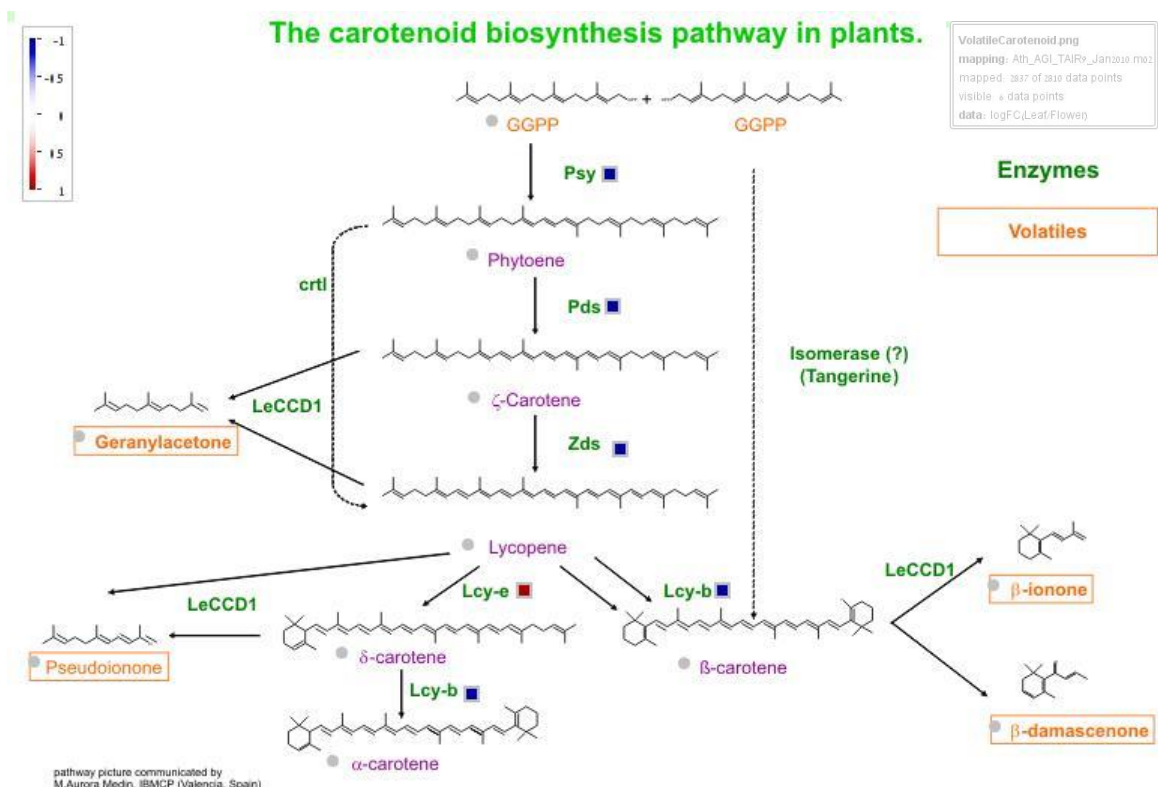
איור 13: הפרדה על גבי גיל של תוצרי PCR לבדיקת נוכחות הגן Cas9 3 חודשים לאחר ההתמרה. נעשתה הגברת PCR בעזרת פריימרים ל Cas9 בהתאמה לפלסמידים משמאל לימין (Cas9-Rv, Cas9-pTX201-Rv. hCas-Fw, hCas9-Rv. pcoCas9_Fw, pcoCas9_Fw) לתאים שעברו הפצצה והחלו בסלקציה 3 חודשים קודם לכן- 3M; C-לכל אחד מהדגימות נעשתה ביקורת חיובית לפי הפלסמיד שלו והפריימרים בהתאמה; -NTC; ביקורת ללא תבנית; -M- סמן גודל Ladder 2 log. הרצה על גבי גיל אגרוז 1.5%.



איור 14: הפרדה על גבי גיל של תוצרי PCR לבדיקת נוכחות וביטוי חולף של הגן Cas9 בקאלוסים hCas יומיים לאחר ההפצצה. נעשתה הגברת PCR בעזרת פריימרים של Cas9 (hCas_Rv, hCas_Fw) והרצה על גבי גיל אגרוז 1.5%. משמאל לימין: 1. -M- סמן גודל Ladder 100 bp; 2. cDNA מצמחוני; 3. hCas DNA מצמחוני; 4. -NTC- ביקורת ללא תבנית. בדיקת הביטוי החולף מראה כי הקאלוסים מכילים את הגן, והגן אכן מתבטא, אך הביטוי חלש מאוד (חץ כחול).



הרכב ומסלול קרטנואידים בצמחי נץ חלב:

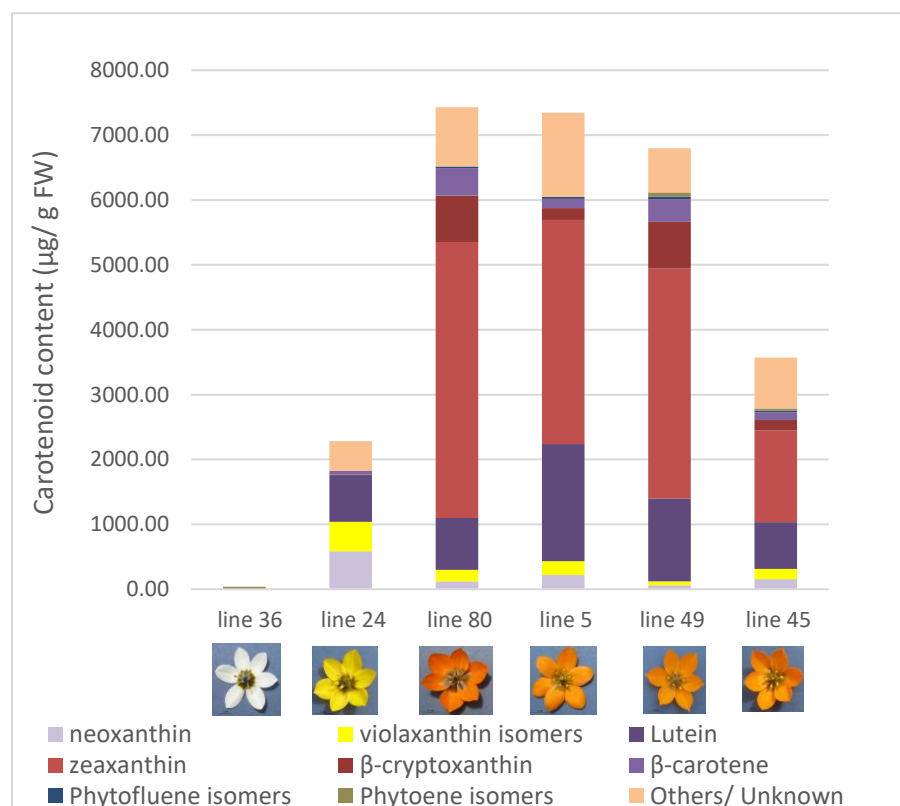


איור 15: מסלול סינתזת הקרטנואידים בצמחים וביטויים בנץ חלב כתום בפרחים לעומת עלים. בכחול הביטוי גבוה יותר בפרחים לעומת אדום, שם הביטוי גבוה יותר בעלים. התוצאות על סמך אסמבלי דה נובו על בסיס ריצוף עמוק של טרנסקריפטום נ"ח כתום, מעלים ופרחים בנפרד (סעיף 5.1.5). הניתוח לפי ההומולוגיה ל TAIR database ותוכנת MapMan (Usadel, 2009).

בחינה השוואתית בעלים ובפרחים של ביטוי הגנים השונים במסלול הקרטנואידים (השמור בצמחים) מגלה כי ליקופן β ציקלאז מתבטא יותר בפרחים לעומת ליקופן אפסילון ציקלאז (lycopene ϵ -cyclase) המתבטא יותר בעלים. התמקדות פרטנית במסלול העל (super pathway) של ביוסינתזת הקרטנואידים בנ"ח כתום מראה העדפה ברורה לביטוי ליקופן β ציקלאז בפרחים לעומת ליקופן ϵ ציקלאז המתבטא יותר בעלים (איור 15).

אנליזה של צבעי הפרחים הראתה כי בקווים הכתומים (5, 49, 80, 45) הקרטנואיד העיקרי הוא זאקסנטיין (שידוע כמעניק גוון כתום) שמהווה כ 40% - 57% מכלל הקרטנואידים. אחריו לוטאין (ידוע כצבען צהוב) שמהווה כ 11%-25% מכלל הקרטנואידים. בארבעת הקווים בעלי הפרחים הכתומים יש קרטנואידים נוספים הידועים כפיגמנטים כתומים (β -קרופן ו β -קריפטוקסנטיין). הקווים 49, 80 ו-5 הם בעלי ריכוז קרטנואידים כמעט כפול מזה שבעלי הכותרת של קו 45. בקו בעל עלי הכותרת הצהובים (קו 24), הקרטנואידים העיקריים הם לוטאין, ויולקסנטיין ונאוקסנטיין, וחסרים כמעט לגמרי הקרטנואידים ה'כתומים' זאקסנטיין, β -קרופן ו β -קריפטוקסנטיין. ייתכן שהפנוטיפ מעיד על כך שבקו הזה המסלול לא 'נתקע' בזאקסנטיין אלא ממשיך לתוצרים הסופיים של המסלול. בקו בעל הפרחים הלבנים נראה שאין כמעט קרטנואידים. ייתכן שהנוכחות המעטה של נאוקסנטיין, ויולקסנטיין, לוטאין ו β -קרופן נובעת מחלקים ירוקים של הרקמה. קרטנואידים אלו אופייניים לרקמות ירוקות. הנוכחות של פיטואן (כ 75% מכלל הקרטנואידים) עשויה להצביע על כך שסינתזת הקרטנואידים נעצרת ממש בתחילת מסלול הביוסינתזה, אם כי לא מדובר בכמויות חריגות (כמויות דומות של פיטואן מופיעות גם בקווים הכתומים 45 ו 49) (איור 16).

איור 16. הרכב הקרטנואידים בעלי הכותרת של 6 קווי נץ חלב. המיצוי נלקח משלושה צמחים מכל קו והכיל 5 פרחים לכל חזרה.



סיכום:

אפיון הרכב הקרטנואידים בזנים של פרחי נ"ח בעלי צבע עלי כותרת שונה חשף כי בקווים 49 ו 80 כמות תוצרי מסלול ה-β קרוטן הם הגבוהים ביותר. ליקופן β ציקלאז נחוץ ליצירה של כל התוצרים הללו (בטא קרוטן, בטא קריפטוקסנתין, זאקסנתין) ולכן ביטול הפעילות שלו בקווים המועשרים באופן טבעי ב-β קרוטן, צפוי לגרום לצבירת ליקופן גבוהה יותר. לכן נבחר קו 49 המכיל פי 2.6 יותר תוצרי מסלול β קרוטן. תכנון ה sgRNA של מערכת CRISPR/Cas9 לצורך עריכה גנומית בנ"ח כתום התבצע על בסיס רצף comp146645 שהתקבל מתוצאות הטרנסקריפטום, תוכן sgRNA ספציפי לליקופן β ציקלאז הכרומופלסטי המיועד להנחות לחיתוך הגן ובכך לאפשר את ניטרולו המוחלט. לאחר הריצוף הגנומי לגן ויישור (alignment) שנעשה בינו לבין רצף comp146645, התברר שהגן מכיל אינטרון לפי חוסר ההתאמה באמצע הגן. הוכח כי הסבירות לנוקאאוט גבוהה פי 10 כאשר החיתוך מוכוון לגבול אקסון-אינטרון מאחר והשינוי מפריע לתהליך החיתוך (ספלייסנג) (Doench, 2014). לכן, sgRNA תוכנן כך שיחתוך בנקודה על האקסון בצמוד לתחילת האינטרון שהיא גם אתר רסטריקציה. כך, במידה ויש אירועי מוטציה, יש סיכוי גדול לכשל בזיהוי האינטרון מצד הצמח, לכן לא יוסר ויתקבל חלבון לא פעיל. במקרה שלנו, החיתוך באזור האינטרון לא צלח ויתכן כי שיחבור לא תקין הוא שמנע ביטוי Cas9 תקין בצמחים המבטאים את פלסמיד OsU6. תכנון טרנספורמציה וביטוי שני פלסמידים נוספים אפשר ביטוי חלש ברמת ה-cDNA של Cas9 והראה כי חלק ממרכיבי המערכת מתבטאים בצורה תקינה בצמחים המבטאים hCas. ייתכן גם שחלק ממרכיבי המערכת עשויים להיות רעילים בצמחים מסוימים, למשל באצות נמצא שחלבון ה-Cas9 יכול להיות פיטוטוקסי, הסתבר שלאצות יש יכולת להוציא החוצה ולערבב (scramble) את DNA האקסוגני לפני האינטגרציה לגנום (Jiang, 2017). לא ניתן לשלול מצב דומה במערכת שלנו. למרות הביטוי המוצלח יחסית של Cas9, בחינת הביטוי של gRNA (נבדק במספר שיטות), לא צלחה ולא הראנו כי הוא מתבטא. ייתכן כי חוסר הביטוי נגזר בעיקר מרמת ביטוי נמוכה, הנובעת משימוש בפרומוטר שאינו מתאים לפולימראז III. לשם כך הפרומוטר מנ"ח בודד ורוצף ונמצא כי הוא מכיל את האלמנטים הצפויים ע"ס פרומוטרים דומים. הכללתו של הפרומוטר הרלוונטי מנ"ח בפלסמיד hCas לא הובילה לעלייה בביטוי gRNA וייתכן שיש להאריך אותו כדי לבטא מרכיבים נוספים (enhancers) בצורה שתייעל את פעילותו. Enhancers הינם אלמנטים בציס, המבקרים גיוס של פקטורי שעתוק (TF) לפרומוטורים של גנים. יש קושי בזיהוי מלא של כל רכיבי הפרומוטורים בשל מיקומם הבלתי צפוי של המשפרים ביחס לגן.

במהלך המחקר הושגה התקדמות גדולה בהבנת המרכיבים והתהליכים הנדרשים לצורך עריכה גנומית בנ"ח, אם כי לא הצלחנו להגיע לתוצאה הסופית, קבלת צמחי נ"ח ערוכים גנטית בעלי צבע אדום. תהליך העריכה הגנומית מורכב ממה שצפינו ונתקלנו בקשיים שאת חלקם איננו מבינים.

המלצות להמשך תהליך העריכה הגנומית בנ"ח לצורך עבודות עתידיות:

1. מומלץ לעבור לגורם סלקציה חזק ומהיר (למשל האנטיביוטיקה היגרומיצין) לשיפור תהליך הסלקציה.
2. מומלץ להגדיל את המקטע המזוהה כפרומוטר לפולימראז III מנ"ח כדי לכלול אלמנטים המצויים במעלה הזרם וייתכן כי יש להם תפקיד בהגברת הביטוי. ניתן להמשיך את פרטוקול RAGE להגדלת המקטע המרוצף ל-1500 2000 בסיסים. רב הסיכויים שמקטע בגודל כזה יכיל את כל האלמנטים upstream הדרושים לתחילת השעתוק.

3. מומלץ לתכנן gRNA's נוספים המכוונים לאתר הפעיל של האנזים להגברת היעילות ולבטא אותם ביחד באמצעות פלסמיד המבטא אותם במקביל.
4. בצמחים מותמרי hCas, המבטאים Cas9, ניתן לבצע הוספה של gRNA's ע"י וקטורים ויראליים המבוססים על Tobacco rattle virus (TRV), וירוסים בעלי טווח רחב שנמצאו כיעילים בצמחים רבים. וקטורים המבוססים על וקטורים ויראליים נמצאו ככלי יעיל להכנסת מערכת CRISPR/Cas9 ובעזרתם נוכל להוסיף את האלמנט החסר במערכת (ali, 2015). ע"י ביטוי gRNA-dependent RNA polymerase TRV RNA-הויראלי, ניתן לבטא את ה gRNA's תחת פרומוטור ויראלי ללא צורך בהכרת הצמח בפרומוטור מיוחד, ליצירת מוטציות בצמחים המבטאים את חלבון Cas9.

רשימת ספרות מצוטטת:

- Ahrazem O, Rubio-Moraga A, Castillo Lo'Pez R, Gomez-Gomez L, 2010. The expression of a chromoplast-specific lycopene beta cyclase gene is involved in the high production of saffron's apocarotenoid precursors. *J Exp. Bot.* **61**, 105-19.
- Ali, Z., Abul-faraj, A., Li, L., Ghosh, N., Piatek, M., Mahjoub, A., Aouida, M., Piatek, A., Baltes, J. N., Voytas, F. D., Dinesh-Kumar, S. & Mahfouz, M. M, 2015. Efficient Virus-Mediated Genome Editing in Plants Using the CRISPR/Cas9 System. *Moleculr Plant* **8**, 1288–1291.
- Alquezar B, Rodrigo MJ, Lado J, Zacarías L, 2013. A comparative physiological and transcriptional study of carotenoid biosynthesis in white and red grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.). *Tree Genetics & Genomes* **9**, 1257-69.
- Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Nekrasov V, 2013. Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods* **9**.
- Cazzonelli CI, Pogson BJ, 2010. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* **15**, 266-74.
- Griesbach RJ, Meyer F, Koopowitz H, 1993. Creation of New Flower Colors in *Ornithogalum* Via Interspecific Hybridization. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **118**, 409-14.
- Doench, J. G., Hartenian, E., Graham, D. B., Tothova, Z., Hegde, M., Smith, I., Scullender, M., Ebert, B. L., Xavier, R. J. & Root, D. E. (2014). Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nature Biotechnology* **32**, 1262–1267.
- Jiang WZ, Zhou HB, Bi HH, Fromm M, Yang B, Weeks DP, 2013. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Research* **41**.
- Li X, Lu M, Tang DQ, Shi YM, 2015. Composition of Carotenoids and Flavonoids in *Narcissus* Cultivars and their Relationship with Flower Color. *Plos One* **10**.
- Lipsky A, Cohen A, Ion A, Yedidia I, 2014. Genetic transformation of *Ornithogalum* via particle bombardment and generation of *Pectobacterium carotovorum*-resistant plants. *Plant Science* **228**, 150-8.
- Littlejohn GM, 2006. Star of Bethlehem *Ornithogalum*. In: Anderson NO, ed. *Flower Breeding and Genetics*. Amsterdam: Springer, Netherlands, 739-52.
- Lytovchenko A, Beleggia R, Schauer N, et al., 2009. Application of GC-MS for the detection of lipophilic compounds in diverse plant tissues. *Plant Methods* **5**.

- Marshall, C., Connelly, S. & Filipowicz, W, 1992. Characterization of the U3 and U6 snRNA genes from wheat: U3 snRNA genes in monocot plants are transcribed by RNA polymerase III. *Plant Molecular Biology* **19**, 973–983.
- Meckenstock DH, 2005. *Breeding Red Irises the carotenoides*. USA: InstantPublishers. Pennisi E, 2013. The CRISPR Craze. *Science* **341**, 833-6.
- Ronen G, Carmel-Goren L, Zamir D, Hirschberg J, 2000. An alternative pathway to beta-carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 11102-7.
- Ronen G, Cohen M, Zamir D, Hirschberg J, 1999. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. *The Plant Journal* **17**, 341-51.
- Yamagishi M, Kishimoto S, Nakayama M, 2010. Carotenoid composition and changes in expression of carotenoid biosynthetic genes in tepals of Asiatic hybrid lily. *Plant Breeding* **129**, 100-7.