

איור 3: צמחוני טבק מהוודסים המכילים את הגן לצבען אינם זורים זה לזה



הערות:

מיקום השתלבות הדנ"א המוחדר בגנום הקולט שונה בין הצמחונים ולפיכך רמת ייצור הצבע שונה וגם מיקום ייצור הצבע שונה; חלק מהצמחונים ירוקים לגמרי ונמצא כי יש בהם השתקה של הגן הזר (השתקה הינה פעולה שהצמח עושה על מנת לבטל את פעילות הגן הזר המוחדר, ומהווה בעיה בהחדרת גנים).

אלה מאפשרים לברור את הצמחים שעברו אינטגרציה של המוחדר - הגן הזר (איור 2). מיקום השתלבות הדנ"א המוחדר בגנום הקולט אינו ניתן לחיזוי וכנראה אקראי (איור 3).

מיתוסים ופחדים: הגישה הביוטכנולוגית פותחת אמנם אפשרויות רבות לשיפורים גנטיים בגידולים חקלאיים, אך בעייתיות כמו דינות אירופה בשל דאגה ציבורית וחשש מפתיחת השוק למוצרים טרנסגניים (GMO - Genetically modified organisms): אלה עלולות לים להכיל 'שאריות' של תהליך ההנדסה הגנטית כמו גנים לסלק ציה (עמידות לאנטיביוטיקה או לקוטלי עשבים). מחקר בצמחים טרנסגניים שונים רווח בכל העולם, אך רק סויה, תירס וכותנה טרנסגניים משווקים בעולם לצרכי בני אדם.

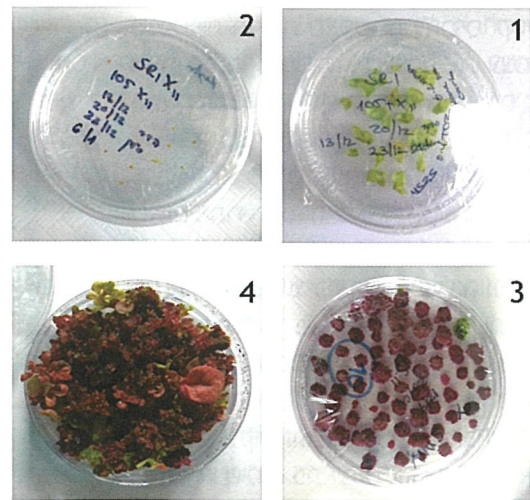


איור 1:

צמחי רוסקוס מוקרנים בעציצים בחממה, בעלי פנוטיפ עלותי השונה מזה של צמח הביקורת

הנדסה גנטית בצמחים

טרנספורמציה גנטית: בניגוד לטיפוח הקלאסי, המתבסס על השונות הגנטית הטבעית הקיימת בתוך אותו המין או מינים הני תנים להכלאה עמו, בהנדסה גנטית מוחדר דנ"א של מין אחר או מין רחוק לתאים צמחיים ומהם מיוצרים צמחים טרנסגניים המכילים את הגן הזר. הדנ"א הזר מוחדר לרוב באמצעות חיידקי קרקע המכונים אגרובקטריום ומכיל בין השאר גנים לסלקציה.



איור 2:

החדרת מערכת גנים לצבען של צבע בורדו לצמחי טבק

הערות:

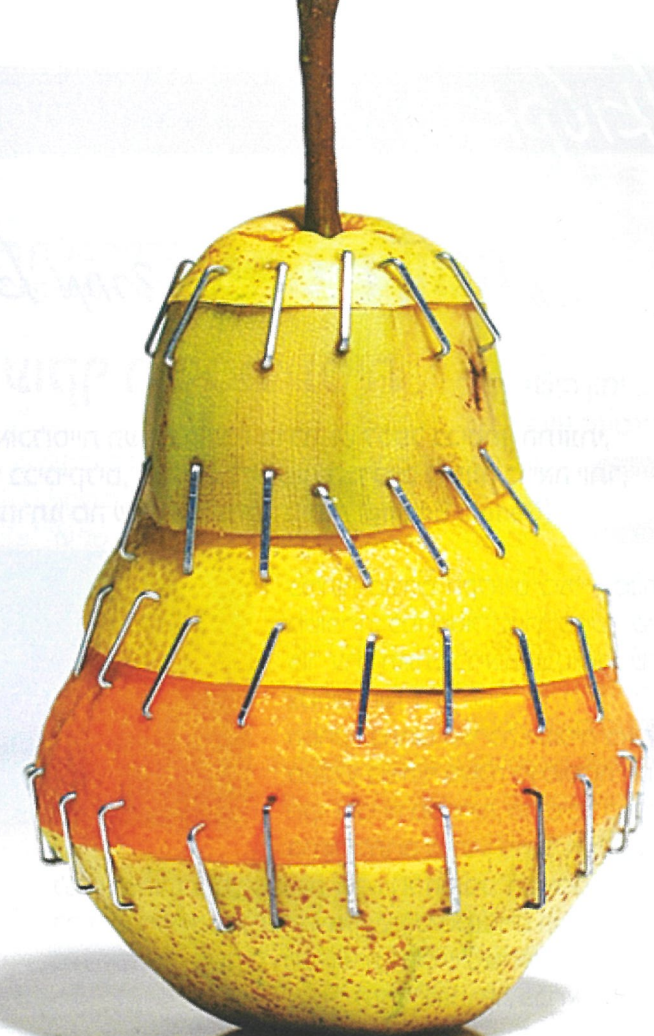
1. צמח טבק בעל גוון טבעי ירוק שעליו הצעירים משמשים לצורך הינדוס גנטי; 2. עלי טבק בתרבית רקמה לאחר הדבקה בחיידקים ובידוד אירוע טרנספורמציה לאחר סלקציה; 3. קבלת רקמה המאופיינת בחלוקות תאים רבות ללא התמיינות (קאן לוס) תחת תנאים הורמונליים מסוימים ואנטיביוטיקה; 4. שיוני הרכב ההורמונים במצע לקבלת תהליך רגרציה שבסופו יתקבלו צמחונים מהוודסים (כאלה ששרדו סלקציה אנטיביוטיקה).

מי מפחד מהנדסה גנומית בצמחי מאכל

אורית עמיר-שגב, יעריית קוטשר, ליאן מרצ'וק-אבנת, משה ראובני / מדעי הצמח, צמחי נוי וביוטכנולוגיה חקלאית, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני ניר הונשפרונג, קובי בן מאיר / מרכז מחקר גרעיני שורק, יבנה

השראת מוטציות: אחת הדרכים המשמעותיות לקבלת זנים חדשים בגידולים חקלאיים קיימים היא השראת מוטציות. שימוש מסיבי בשיטה זו נעשה בחברות מסחריות העוסקות בפיתוח מופעים חדשים לצמחי נוי ואף לפירות כגון הדורים. השימוש בהשראת מוטציות הוביל ברחבי העולם לשחרור של מעל 3,000 זנים מוטנטיים שמקורם מכ-179 מיני צמחים. מרבית המוטנטיים הקיימים במסחר הושגו באמצעות הקרנה בקרינת גמא.

לדוגמה, ניסוי שמתבצע במעבדתנו, הקרנה בקרינת גמא של מריסטמות מקנה שורש של רוסקוס (*Ruscus hypoglossum*), מטרתו פיתוח זנים בעלי מופעים ייחודיים כמו עלווה מוגזת או עלים בעלי צורות שונות מהמוכר; זנים שהיוו גידולי נישא, בנוסף לזן המסחרי המקובל ויתרמו להרחבת סל המוצרים של ענפי נוי קטופים. ההקרנות בוצעו בקרינת גמא במנות שונות של Gray (Gy) ממקור של ⁶⁰Co בכור האטומי בנחל שורק. הצמחים המוקרנים מתרבים, מועברים לגידול בעציץ בחממה לבחינת מוטנטיים צורניים ובהמשך לגידול בשדה, לבחינת יציבות המוטיפ (איור 1).



החמונה להמשה בלבד

מבוא

עתידי נידרש להגביר את ייצור המזון לאוכלוסיות העולם ההולכת וגדלה (FAO Stat) ועל כן חוקרים ומטפחי צמחים ממקדים כיום מאמצים לשיפור תכונות הקשורות ביציבות יבול, עמידות למחלות, סבילות או עמידות לעקות אביוטיות ולניצול יעיל של מים ודשן. שיפור איכות המזון וערכו התזונתי מהווה אף הוא חלק ממטרות הטיפוח בחקלאות.

טיפוח קלאסי

שימוש בסמונים מולקולריים: הטיפוח הקלאסי מתבסס על שימוש בשונות גנטית הקיימת בתוך מין מסוים. לדוגמה, בטיפוח לעמידות למחלה כלשהי נעשה שימוש בהכלאה של הורה עמיד למחלה עם הורה מצטיין ביבול. באמצעות שימוש בסמונים מולקולריים ניתן ללמוד על מיקום הגנים העיקריים האחראיים על קבלת העמידות. סמונים בגנום שיימצאו באזורים המשפיעים על העמידות יוכלו לשמש לביצוע סלקציה ולבחירת צאצאים שמכילים את תכונת העמידות מבלי להדביק באמת את הצמח במחלה, ולהמשיך בתוכנית ההכלאות רק עם הצאצאים הרלוונטיים.



סיכום ומסקנות

שיפור איכות והגדלת יכול בצמחי מזון הגיעו לשיא במאה האחרונה. כל שיפור נוסף, כגון עמידויות חדשות או הגדלת יכול נוספת, חייב לבוא מהחדרת גנים זרים או משינוי גנטי מכוון להקניית תכונה רצויה. הסרוב באירופה לנצל צמחים ששוננו בהנדסה גנומית ויביל בהכרח להפרדה בין אוכלוסיות הצורכות מזון יקר שלא עבר שינוי לבין אלו הצורכות מזון במחיר נמוך שעבר שינוי. מצב זה עלול להביא לתחרות על משאבים כגון מים, שטח ואנרגיה, שצמחים לא מהונדסים צורכים מהם יותר.

העמידים אם כן, טמון בצמחים ובבעלי חיים שעברו השבחה באמצעות עריכה גנטית, וזאת על מנת לספק בעתיד את צרכי המזון של כולם.

למנוגן העריכה. בשיטה זו מתקבלת הרבה פחות פעילות חי' תוך שאינה באתרי המטרה.



איור 5:

סכימה המתארת את מבנה הפלסמיד (הדנ"א המעגלי) המשמש להחדרת מערכת ביטוי צמחית עבור החלבון החותך, הרצף המנחה וכן גן לסלקציה.

שנת פרסום	מטרת העריכה (התכונה המבוקשת)	גן המטרה לעריכה	החיידק המעורב בטרנספורמציה	שיטת העריכה	גידול
2017	עמידות לכיב הדר	Lateral organ boundaries 1	אגרובקטריום	CRISPR/Cas9	תפוז <i>Osbeck citrus paradisi</i>
2016	עמידות לחירכון האש	DspE-interacting proteins of Malus	RNP	CRISPR/Cas9	תפוח <i>cv. Golden delicious</i>
2016	עמידות לקימחון	Mildew Locus 0	RNP	CRISPR/Cas9	עינב <i>cv. Chardonnay</i>
2018	עמידות לבוטריטיס	VvWRKY52	אגרובקטריום	CRISPR/Cas9	<i>cv. Thompson seedless</i>
2016	הפחתה של תכולת הליגנין בדופן התא	caffeic acid O-methyltransferase	אגרובקטריום	TALENs	קנה סוכר <i>cv. CP88-1762</i>

הטבלה

מציגה דוגמאות לעריכה גנומית במספר גידולים חקלאיים שבוצעו בשנים האחרונות

תודות

המחקר על שינוי רוסקוס באמצעות השראת מוטציות בהקרנה מוסמן על ידי המדען הראשי של משרד החקלאות.

ספרות

1. FAOSTAT - Food and Agricultural Organization of the United Nations. www.fao.org
2. Blancke S. et al. (2015): Fatal attraction: the intuitive appeal of GMO opposition. *Trends in Plant Science* 7: 414-418.
3. Metje-Sprink J. et al. (2019): DNA-free genome editing: Past, Present and future. *Frontiers in Plant Science* 14.
4. Nadakuduti S. et al. (2018): Genome editing for crop improvement – applications in clonally propagated polyploids with a focus on potato (*Solanum tuberosum* L.). *Frontiers in Plant Science* 9.

מסיבות 'פוליטיות' הוחלט לאחרונה באירופה שצמחים המיוצרים בעריכה גנטית (שאינה באמצעות השראת מוטציות כימיות או פיזיקליות) נחשבים כצמחי GMO, גם כאשר לא נעשה שימוש בדנ"א זר לצורך עריכה (כמו בשיטת ה-RNP למשל). אף על פי כן מספר מדינות בדרום אמריקה וכן יש ראל החלו לעדכן את הפרשנות החוקית לגבי עריכה גנטית ולבחון רגולציה עבור כל מקרה לגופו (3). עם זאת, בארה"ב ובסין הרשויות הרגולטוריות רואות צמחים שעברו עריכה גנומית כזהים לצמחים שעברו מוטציה. הטבלה שלהלן מציגה דוגמאות לעריכה גנומית שנעשתה במספר גידולים חקלאיים בשנים האחרונות (4).

רק במקרים ספורים, בהם מערכת הרגורציה בתרבית רק" מה ידועה ומבוססת, ניתן להגיע לצמחונים ערוכים גנטית, מה שמהווה צוואר בקבוק משמעותי בתהליך. כמו כן קיים אתגר בהחדרת מערכת העריכה לגרעין התא וכן בקבלת שליטה מלאה בסילוק מערכות העריכה ושאריותיהן.

מערכת TALENs: לפני כעשור התגלתה מערכת פשוטה יותר לעריכה גנטית שמקורה בחיידקים התוקפים צמחים כגון אורז ופלפל. מערכת זו מכונה TALENs ומורכבת מרצף יחידות המכונות 'Tal effectors', שכל אחת מזהה וקושרת בסיס אחד של דנ"א (ולא רצף של שלושה). אל יחידות אלו קשור חלבון חותך דנ"א (איור 4).

באופן דומה, בתחילת שנות האלפיים התגלה מנגנון התגובה החיסונית של חיידקים כנגד וירוסים. מנגנון זה כולל 'רצף מנחה' של כ-20 בסיסים המכונה crisperRNA (התואם רצפים של וירוסים) הנקשר לחלבון חותך דנ"א המכונה Cas9 ומוביל אותו לאתר חיתוך הדנ"א בווירוס ולהריסת הווירוס. מערכת ה-CRISPR/Cas9 הפכה פופולרית ביותר ואיפשרה פיתוחים רבים בתחומי מחקר שונים (איור 4).

טכנולוגיות חדשות

אחרי חיתוך הדנ"א של גן המטרה: לתא מערכות טבעיות שאחראיות לתיקון נזקי שבירת דנ"א. התיקון מתקיים באופנים שונים ומוביל לתוצאות שונות, כאשר בחלק מהמקרים מתקבל תיקון שיוביל לשינוי הרצף. לאחר הפעלת המערכת לעריכה גנומית נבדק רצף הדנ"א של התא או הצמח וניתן לבחור את אירועי העריכה הרצויים.

אחת השיטות הנפוצות כיום היא לייצר צמחים טרנסגניים המכילים את החלבון Cas9 ואת הרצף המנחה או מספר רצפים כא"ל (איור 5). אם וכאשר התאים בהם התקבלה העריכה הגנטית הרצויה יהפכו לרעים בדור הבא, יהיה ניתן להמשיך איתם. זרעים אלה של הצמח המהונדס יזרעו וניתן יהיה לבצע סלקציה לפרטים שמכילים את אירוע העריכה הרצוי, אך הם אינם מבטאים חלבונים זרים כלשהם כגון Cas9, לא את הרצף המנחה וגם לא את שאר הגנים של הסלקציה. בדרך זו ניתן בתוך מספר דורות לייצר צמח ערוך גנטית שאינו מכיל שאריות של מערכת זרות.

טכנולוגיות חדשות מאפשרות להכניס 'קסט' כזו של Cas9 ורצף מנחה. זו מסוגלת לשכפל את עצמה ולהכניס לדנ"א המארח ובכך להגדיל את שיעור הצאצאים הטרנסגניים (3).

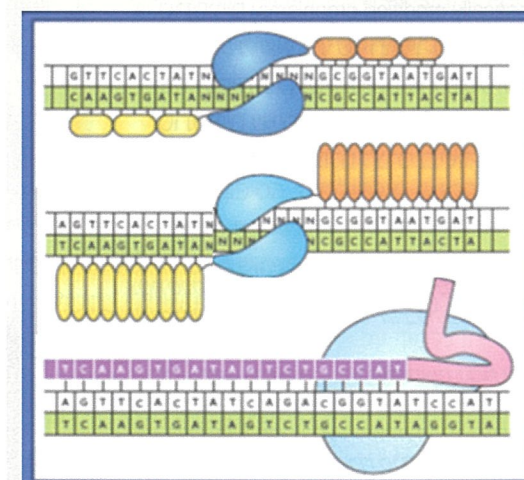
שיפור בעריכה הגנטית: בעיה מרכזית בשיטה זו היא שביצוע המערכת מבצעת הרבה יותר חיתוכי דנ"א באתרים שאינם אתרי המטרה. כלומר, המערכת לא ספציפית דיה ועל כן המחקר עובד על פיתוחים שישפרו את ספציפיות העריכה. היום ניתן לבצע עריכה גנטית (עריכה גנומית - Genom editing) בשיטות חדישות (RNP), בהן משתמשים בחלבון Cas9 וברצף מנחה המסונזמים במעבדה, מאפשרים להם להיקשר זה לזה ומובילים אותם לגרעין התא (תהליך שעשוי לכלול הפצה של חלקיקי זהב מצופים בתערובת של חלבון ו-RNA בתא ואקום, או שימוש בתאים ללא דופן תא). לאחר העריכה החל בון מתפרק כמו גם הרצף המנחה ובצמח המתפתח אין זכר

המתנגדים טוענים כי אין לדעת כיצד הצמח המהונדס 'יתנהג' בש"ט הפתוח כאשר כבר אינו תחת עינם הפקוחה של המדענים. אותו צמח עלול להעביר גנים שונים לצמחים בטבע וכך לא תהיה לנו שליטה על הצומח. בנוסף תיתכן הגברת השימוש בקוטלי עש"בים ובחומרי הדברה מכיוון שצמחים יעבירו ביניהם ללא שליטה גנים לעמידויות שונות. יש הסוברים כי קיים די מזון אך הוא אינו מחולק בעולם בצורה הוגנת. השמרנים מבין המתנגדים טוענים שיש מן הפסול בניסיון לשנות את המהלך הטבעי ואת פאר היצירה האלוהית (2).

על מנת לשבור את המיתוסים והפחד מצמחים מהונדסים גנטית יש להעמיק בקרב הציבור את הידע הקשור בתהליך ההנדסה הגנומית על שלביו והשלכותיו. עד היום לא נמצא ששימוש בצמחים או בעלי חיים ששוננו בטכניקות הנדסה גנומית גרם לאיזושהי תופעה מזיקה.

עריכה גנומית: כחלק מהמאמץ לפתח צמחים בעלי שינויים גנטיים ללא עקבות גנים זרים או גנים המקנים עמידויות, שלא באמצעות השי"ט מוטציות כימיות או פיזיקליות, פותחו טכנולוגיות חדשות לעריכה גנומית המאפשרות לבחור כל מקום בגנום ולבצע בו את השינוי המ"בוקש. זו יכולה להיות תוספת, מחיקה או שינוי של גן המטרה. באופן כללי ניתן לסווג ש"ארגז הכלים של העריכה הגנטית מתבסס על פתרונות של מערכות ביולוגיות טבעיות (מחיידקים או וירוסים), דהיינו חלבונים הנקשרים באופן ספציפי (בהתאם לרצף) לדנ"א בשילוב עם חלבונים 'חותכי דנ"א', המכונים גם אנדונוקלאזות (Endonucleases) ועקב כך משנים את רצף הדנ"א ואת פעילות הגן.

מערכת ZFN: בשנות התשעים המוקדמות גילו חוקרים כיצד חלבוני 'אצבעות אבץ' נקשרים לדנ"א, קיבלו את הרעיון לחבר אליהם חלבונים 'חותכי דנ"א' ולקבל אפליקציה של זיהוי רצף דנ"א וחיתוך שלו באותו האזור. משפחת חלבונים זו מכונה ZFN, כאשר כל יחידת 'אצבע אבץ' מזהה רצף שונה של שלושה בסיסי דנ"א. כך ניתן לשרשר מספר אצבעות ולייצר את הרצף הנדרש (איור 4).



איור 4:

מערכות העריכה הגנטית הנפוצות ZFN, TALEN, CRISPR-Cas9. החלבון חותך הדנ"א מוצג בכחול, הרצף המנחה הנצמד לדנ"א מוצג לוחית מוצג בצהוב וסגול.