



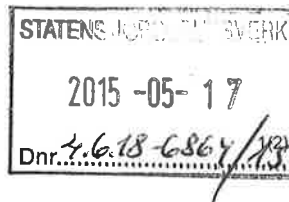
## Appendix B

Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Department of Plant Biology  
Associate Professor Jens Sundström

2015-06-09

Jordbruksverket



### Förfrågan med anledning av planerade fältförsök med *Arabidopsis* som muterats med hjälp av CRISPR Cas9

Vi arbetar med CRISPR Cas9-metoden för att orsaka riktade mutationer i två lokus i *Arabidopsis* (At1g20120 och At1g20150). Genen i lokus At1g20120 kodar för ett lipas och genen i lokus At1g20150 kodar för ett peptidas. Bägge dessa proteiner antas vara viktiga under ståndarutvecklingen, varvid förväntad genotyp efter mutation är en nedsatt hanfertilitet. Vi vill i detta forskningssteg få bekräftat att de mutationer som induceras med hjälp av CRISPR Cas9 kommer att resultera i nedsatt hanfertilitet även vid fältförsök.

Försöket med CRISPR Cas9 och mutation som orsakar nedsatt hanfertilitet är intressant då det vid en framtida tillämpning har potential att underlätta förädlingsprocessen för hybridutsäde, i första hand för oljeväxter. Hybrid sorter har en högre avkastning, högre odlingssäkerhet och bättre enhetlighet, vilket gör dem viktiga för produktiviteten inom såväl nationell som internationell växtodling.

Genom den riktade mutation som induceras av CRISPR Cas9 kommer vi att ta fram tre olika typer av mutanter:

1. En enkel mutant med 1-2 nukleotiders deletion i första exonen i lokus At1g20120.
2. En enkel mutant med 3-4 nukleotiders deletion i första exonen av lokus At1g20120.
3. En mutant med 30 kb. deletion. CRISPR Cas9 kommer att orsaka ett dubbelsträngsbrott i At1g20120 samt i At1g20150, vilket resulterar i en deletion från första exonen av At1g20120 till och med At1g20150. Deletion av de gener som ligger i lokus At1g20130, At1g20132, At1g20135 och At1g20140 kommer således att ske.

De tre mutanterna erhålles genom att genspecifika guide-RNA (gRNA) designas och klonas in i den binära vektorn pFGC-pcoCas9. Cas9-vektorn kommer därefter att föras över till *Agrobacterium* för att sedan användas i en transformation av *Arabidopsis*. Transformationen kommer att ske genom en så kallad floral dip vilket innebär att vävnad från en sekundärt producerad blomstjälk (endast ett fåtal blommor) inokuleras i en vätska som består av *Agrobacterium tumefaciens*, 5%

sukros och 500 mikroliter per liter av surfactant Silwet L-77<sup>1</sup>. Transformationen kommer att göras på den transformationsplattform som finns på SLU i Uppsala där tillstånd för innesluten användning av genmodifierade växter finns<sup>2</sup>.

Efter transformationen kommer vi att erhålla en heterozygot med avseende på transgenen. I nästa generation kommer transgenen att segregeras bort och homozygota linjer som bär på CRISPR Cas9 kommer att väljas ut. Vid fältförsök med de tre mutanterna kommer transgenen på så sätt att vara bortsegregerad.

#### Frågor som vi vill få besvarade:

- Faller plantor som modifierats med hjälp av CRISPR Cas9 in under den rådande GMO-lagstiftningen?
- Måste vi söka tillstånd för att genomföra fältförsök med dessa plantor?
- Enligt vilket regelverk skall vi i sådana fall utforma våra fältförsök? Om regelverk saknas kan vi ändå utföra fältförsöken?

Detektion av de mutationer som skapas kommer för de två enkla mutanterna med 1-2 respektive 3-4 nukleotiders deletion att kunna ske genom en multiplex PCR-reaktion; en metod som är speciellt lämplig för detektion av mutationer och deletion av gener<sup>3</sup>. Detektionen av mutationerna som skapats i de två enkla mutanterna kommer dock inte kunna särskiljas från spontana mutationer. Den stora deletionen om 30 kb. kommer både att kunna detekteras med multiplex PCR och kommer även i princip att kunna särskiljas då denna typ av stora deletioner sker med mycket låg frekvens.

Vidare kommer vi att komplementera mutant #3, vilket innebär att vi kommer återställa denna till vildtyp. Detta kommer att göras genom transformation med *Agrobacterium*.

#### Fråga som vi vill få besvarad:

Behöver vi söka tillstånd för GMO för att få genomföra fältförsök med den återställda vildtypen?



Jens Sundström (Lektor/Projektledare)



Ida Eriksson (Agronomstudent)

<sup>1</sup> Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-

<sup>2</sup> The Uppsala Transgenic Arabidopsis Facility. [http://lcpu.se/?page\\_id=763](http://lcpu.se/?page_id=763)

<sup>3</sup> Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., & Vogt, P. H. (1997).

Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*, 23(3), 504–511.



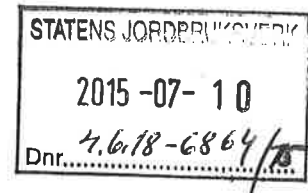
## Appendix C

Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Department of Plant Biology  
Associate Professor Jens Sundström

2015-07-08

Jordbruksverket  
Regelenheten  
Staffan Eklöf



1(3)

### Kompletterande information till förfrågan om fältförsök med CRISPR-muterad *Arabidopsis* (Dnr 4.6.18-6864/15)

Nedan finns svar på de kompletterande frågor som vi blivit ålagda att besvara inför bedömning av huruvida vi behöver ansöka om tillstånd för att genomföra fältförsök med CRISPR-muterad *Arabidopsis* eller ej.

Fråga 1. (I er text står att homozygota linjer som bär på CRISPR Cas9 kommer att väljas ut. Menar ni inte "CRISPR Cas9-inducerade mutationer", alternativt "väljas bort"?)

**Svar:** Efter transformationen erhålls heterozygoter med avseende på transgenen. I nästa generation väljs homozygoter som **inte** bär på CRISPR Cas9-transgenen ut.

Fråga 2. (Hur har bortkorsningen bekräftats?)

**Svar:** De CRISPR Cas9-mutationer som induceras uppstår redan i primärtransformanterna ( $T_0$ ). Då primärtransformanter alltid är heterozygota med avseende på transgenen, kommer T-DNA:t kunna segregeras bort i nästföljande generation ( $T_1$ ). Att bortsegrering av T-DNA:t verkligen skett kommer att kontrolleras genom att genomföra följande:

- i) Riktad PCR mot gRNA:t och Bastagenen som ingår i DNA:t (se tabell 1 för primersekvenser). Förväntat resultat av en sådan analys kommer vara att transgenen går att detektera i  $\frac{3}{4}$  av  $T_1$ -plantorna medan  $\frac{1}{4}$  visar negativa resultat.
- ii) Delar av avkomman till den  $\frac{1}{4}$ -del av  $T_1$ -plantorna som visat negativa resultat i PCR-screenen kommer att odlas på Basta-medium (50 mg/l) för att kontrollera att transgenen inte finns kvar.
- iii) För att säkerställa att endast vildtypsallelen av det lokus som bär på transgenen finns med i de linjer som används vid fältförsöken kommer positionen av transgenen i genomet att fastställas med hjälp av TAIL-PCR ([http://bit.ly/Liu\\_Chen\\_2007](http://bit.ly/Liu_Chen_2007)). Utifrån

resultatet av TAIL-PCR försöken kommer primrar för genotypning som särskiljer ett vildtypslokus från ett lokus som bär på transgenen att konstrueras. Dessa primrar kommer därefter att användas för att genotypa plantor där T-DNA:t segregeras bort.

Tabell 1. Primersekvenser för riktad PCR mot gRNA:t och Bastagenen.

Primertyp	Primernamn	Sekvens
Basta	Basta (fwd)	GCACCATCGTCAACCACTAC (fwd)
	Basta (rev)	GTCATCAGATTTTCGGTGACG (rev)
gRNA	U6_F1 type 1 (fwd)	GCGGAATTCAGAAATCTCAAAATTCCG
	U6_R2 type 1 (rev)	GCGTCTAGATAATGCCAACTTTGTACA
gRNA	U6_F1 type 2 (fwd)	GCGTCTAGAAGAAATCTCAAAATTCCG
	U6_R2 type 2 (rev)	GCGGCGATCGCTAATGCCAACTTTGTACA

Fråga 3. (Har off-target-mutationer analyserats i växterna?)

**Svar:** Vid design av de gRNA-sekvenser som klonats in i vektorn pFGC-pcoCas9 i detta försök, har sekvenser med så låg off-target-frekvens som möjligt medvetet valts ut. Information om exakta positioner för var off-target-mutationer potentiellt kan ske finns sparad tillsammans med gRNA-sekvenserna.

Primärt har vi inte tänkt analysera eventuella off-target-mutationer eftersom detta inte är ett krav vid traditionell mutationsförädling. I *Arabidopsis* finns flera mutantlinjer framtagna med Ethyl methanesulfonate (EMS) som inte räknas som genetiskt modifierade organismer men som ofta bär på ett stort antal off-target mutationer. Dessutom kommer slumpmässiga mutationer naturligt att ske och skilja mellan generationerna, vilket gör att det är svårt att säkerställa huruvida en detekterad mutation är ett resultat av off-target eller om den uppstått spontant.

Om sekvensering ändå krävs kan denna göras på två olika nivåer:

- i) Sekvensering av de regioner i genomet som bedöms ha störst risk för att bära på off-target-mutationer.
- ii) Sekvensering av hela genomet.

Då sekvensering är ett kostsamt alternativ, speciellt vid sekvensering av hela genomet, vill vi om möjligt undvika det.

Vid konventionella mutationsförsök där man använder sig av EMS eller radioaktiv strålning och hundratals mutationer introduceras i ett slag brukar man göra en serie återkorsningar för att minska på antalet off-targets. Av hävd brukar man göra ca sex återkorsningar. Ett alternativ eller komplement till att sekvensera skulle kunna vara att göra återkorsningar till vild-typ för de linjer som vi avser använda i fältförsöken.

Hälsningar

Jens Sundström och Ida Eriksson