

תוכן העניינים

<u>עמוד</u>	<u>הנושא</u>
1	דף פותח את הדו"ח
2-4	תקציר
4	מבוא
4	מטרות המחקר
5-17	פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר
17-19	דיון ומסקנות
20-21	בבליוגרפיה

דוח לתכנית מחקר מספר 132-1919-18

שנת המחקר: 3 מתוך 3 שנים

פיתוח כנת עגבנייה עמידה לצמחים טפילים באמצעות עריכה גנטית ושימוש בטכנולוגיה
CRISPR/Cas9

**Development of resistant tomato rootstock to parasitic weeds by gene editing
using CRISPR/Cas9**

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות – הגנת הצומח

ע"י

ראדי עלי, פיטופתולוגיה וחקר עשבים, מינהל המחקר החקלאי, נוה יער

רחל אמיר: מדעי הצמח, מיגל, מכללת תל חי

שאול גרף: מו"פ צפון

Radi Aly, Dept. of Phytopathology and Weed Research, ARO, Neve Ya'ar Research Center,
P.O.B. 1021 Ramat Yishay 30095. E-mail: radil@volcani.agri.gov.il

Rachel Amir, Plant Science, Migal Tel Hai College

Shaul Graf, Northern Research and development

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים לא מהווים המלצות לחקלאים



חתימת החוקר

מעריכים מומלצים לבדיקת הדו"ח המדעי

1. ד"ר מאור מוצרפי

2. ד"ר עמית גלאון

3. ד"ר יעקב גולדוואסר

תקציר

הצגת הבעיה: עלקת (*Orobanche and Phelipanche spp.*) הינה עשב טפילי אובליגטורי התוקפת שורשים של צמחים רבים, גורמת לנזקים קשים בטווח רחב של יבולים חקלאיים והדברתה קשה מאד.

מטרת המחקר: פיתוח כנת עגבנייה עמידה לטיפול עלקת באמצעות השימוש בטכנולוגיה CRISPR/Cas9.

מהלך ושיטות עבודה: הוכנו שלושה תבניות גנטיות עם sgRNA ושובטו כל אחת בנפרד בווקטור CRISPR/Cas9 לפגיעה בגן המטרה *CCD8*, ריבוי הקווים הטרנסגנים לקבלת צמחי T1 ואנליזה מולקולארית למוטציות בגן המטרה *CCD8* בצמחונים מותמרים ע"י ראקצית חיתוך וריצוף. לבדיקת מוטציות (Off-target) בגינום העגבנייה, השתמשנו בתוכנה P-CRISPR. בשנת המחקר השנייה, הוכנה תבנית שתכיל את שלושת ה-sgRNAs מחוברים ביחד באותה תבנית טרנספורמציה, ריבוי הקווים הטרנסגנים לקבלת צמחי T1 ואנליזה מולקולארית למוטציות בגן המטרה *CCD8*. כמו כן נבדקה העמידות של קווי העגבנייה (1, 2, 5, 11) מוטנטים לעלקת שהתקבלו. בקווים אלו נבדקה גם תכולת הסטריגולקטונים במיצי שורשים בהשוואה לצמחי WT באמצעות LC-MS/MS ובחינת הפרופיל המטבולי הראשוני של הקווים המוטנטים באמצעות HPLC.

בשנה האחרונה למחקר, נמשך ריבוי הקווים המוטנטים ונבחנה עמידותם של הקווים בדור T2 ו-T3 הומוזיגוטיים נגד עלקת מצרית. ניסויים לבחינת השפעת המוטציות בגן המטרה (*CCD8*) על התפתחות העלקת נערכו בבית רשת בעציצים. לכל קוו מוטנטי הועמדו 15 חזרות בדליים של 10 ליטר. קווי העגבנייה מוטנטים שהראו עמידות גבוהה לעלקת מצרית בעציצים, נבחרו לשימוש ככנות להרכבה עם זן העגבנייה T5 (wt.). העמידות של הכנה לעלקת נבדקה בעציצים בחממה מבוקרת ובבית רשת. בשנה זו נבדק גם הפרופיל של חומצות האמינו ומטבוליטים שונים הן בעלים והן בשורשים של הצמחים המוטנטים בהשוואה לבקורות.

תוצאות ומסקנות: התבנית הגנטית (pMR290:Cas9:sgRNA2) שהכילה sgRNA2 נבחרה להמשך העבודה. לאחר טרנספורמציה הצמחים הטרנסגנים עברו הכלאה עצמית לקבלת דור T1 ומצמחי דור זה נבחרו ארבעה קווים טרנסגנים (1, 2, 5, ו-11) להמשך העבודה. נעשתה ראקצית חיתוך וריצוף לפרגמנט שהתקבל (452bp). הפרגמנט נחתך ע"י Bsr1 ולפי התוצאות, לא התקבל חיתוך בקווים 1, 5, ו-11 לעומת זאת צמחי ה-WT וקו 2 התקבל חיתוך שלם והניב שני מקטעים (156bp, 296bp). התקבלו מוטציות שונות של החסרה בבסיסים בגדלים שונים (6-1 בסיסים) ובמקרים אחרים החסרה של קטעים גדולים יותר. לא התקבלו מוטציות לא מתוכננות בגנום. מופע הצמחים המוטנטים היה שונה מצמחי ה-WT, הצמחים היו נמוכים יותר עם הרבה הסתעפויות של ענפים. הוכן קונסטראקט שהכיל את שלושת ה-sgRNAs מחוברים ביחד באותה תבנית במטרה לבצע מוטציות בשלושה אקסונים בגן המטרה *CCD8*. נעשתה טרנספורמציה של התבנית pYLCRISPR:Cas9:sgRNA-1-2-3 לעגבנייה מזן T5 לקבלת המוטנטים. התקבלו 9 קווים טרנסגנים בדור T0 והצמחים הטרנסגנים עברו הכלאה עצמית לקבלת דור T1 להמשך העבודה. תוצאות החיתוך הראו שכל המוטציות נחתכו לשני פרגמנטים בדומה ל-WT אינדקציה להעדר מוטציה. לעומת זאת הפרגמנט שהוגבר משני צידי ה-sgRNA2 נחתך ע"י Bsr1 ולפי התוצאות, בחלק מהקווים התקבל חיתוך שלם

בדומה ל-WT ובחלק אחר לא התקבל חיתוך. נבחרו רק שלושה קווים (12, 13, 14) להמשך העבודה. לא התקבלו מוטציות לא מתוכננות בגנום. התקבלה הפחתה משמעותית בתכולת הסטריגולקטון (אורבנכול) בקווים המוטנטים (1, 2, 5, 11) במיוחד בקוו 5 בהשוואה לביקורת WT. כמו כן באותם הקווים המוטנטים התקבלה ירידה משמעותית במספר העלקות של הטפיל שהתפתחו על הפונדקאי בהשוואה לביקורת WT. נרשמה עלייה מובהקת בפרופיל חומצות האמינו של הקווים המוטנטים בהשוואה ל WT במיוחד בעלים. בשורשים נמצאה עליה משמעותית בקוו 5 בלבד. בשנת המחקר השלישית, נמשך ריבוי הקווים המוטנטים, הכלאות עצמיות לקבלת קווים הומוזיגוטים ובחינת עמידותם של קווים אלה נגד הטפיל עלקת מצרית. כל האינדקציות הראו שקוו 5 הינו המתאים ביותר לאינדקציות שהוזכרו בהשוואה לשאר הקווים שנבחרו (1, 2, 11, 12, 13, 14) ולכן בשנה זו רב הניסויים התמקדו בקוו 5 העמיד ביותר לטפיל וקוו 11 הרגיש ביותר ביחד עם ה-WT. שני הקווים המוטנטים (5 ו-11) שימשו ככנה לבדיקת עמידותם לעלקת. נבחנו שבעת הטיפולים: (wt/wt, 5/5, 11/11 and wt/11, 5/wt, wt/5, 11/11) בניסויי ההרכבות כאשר הקו המוטנטי שימש פעם בתור כנה ופעם בתור רוכב. התוצאות הראו באופן חד משמעי ומובהק שהכנה של קו 5 הינה העמידה ביותר לטפיל עלקת, התפתחו רק 1-2 עלקות על כנה זו בהשוואה ל -24 – 56 עלקות שהתפתחו על כנת הקו 11 וה-WT בהתאמה. מן הראוי לציין ששני הקווים 5 ו-11 היו הומוזיגוטים לדור T3. באנליזה של תכולת חומצות אמינו שונות כמו (אלנין, וואלין, סירין, לאוצין, גלצין, טירוזין ועוד) הן בשורשים והן בעלים של צמחים מוטנטים שהודבקו בעלקת, התקבלה עליה משמעותית בתכולת החומצות בקווים המוטנטים בעיקר בקוו 5. בנוסף לכך נרשמה עליה בתכולת המטבוליטים (TCA cycle) והסוכרים בעיקר בקוו 5 ללא הדבקה בעלקת. התוצאות תומכות בהיפותיזת העבודה: קוו 5 הראה את העמידות הגבוהה ביותר לעלקת כאשר הורכב על עצמו או כאשר שימש כנה ל-WT. לאור הנתונים והתוצאות, נרשם פטנט על הכנה של קוו 5. כנה זו תשמש בעתיד ככנה עמידה לעלקת לזני עגבנייה מסחריים.

מבוא

העלקת (*Orobanche* או *Phelipanche* spp.) הינה טפיל שורש מוחלט, נטול מערכת פוטוסינטטית ותלוי בפונדקאי הנושא אותו (6). העלקת גורמת לנזקים כבדים בארץ ובעולם לשורה ארוכה של גידולים חשובים והדברתה כרוכה בהוצאות כבדות ובמקרים רבים אינה יעילה כלל. גישות רבות הוצעו להדברת הטפיל כמו הדברה כימית, ביולוגית, גידולים עמידים ואמצעי סניטציה אך יעילותם הייתה חלקית בלבד (1, 6). האינטראקציה ההתחלתית בין הטפיל עלקת לפונדקאי היא סיגנל נביטה כימי ספציפי - סטריגולקטון (14, 13, 7) המופרש בדרך כלל על ידי שורשי הצמחים הפונדקאים המתאימים, הנקלט על ידי זרעי העלקת וגורם לנביטתם. סטריגולקטונים נוצרים במסלול הפירוק של קרטנואידים (8) ע"י שני אנזימים חשובים Carotenoid Cleavage Dioxygenases (*CCD7* and *CCD8*). לאחרונה פותחה טכנולוגיה ליצירת צמחים מוטנטים, המבוססת על מערכת החיסון של החיידק סטריפטוקוקוס, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic

CRISPR/Cas9) Repeats שתפקידה למנוע חדירה או לפרק DNA זר שהצליח לחדור לחיידק. מערכת זו הותאמה גם לבצע עריכה גנומית באורגניזמים רבים (5). המערכת מבוססת על נוקלאז Cas9 המונחה לחיתוך ספציפי של DNA באמצעות רצף מוביל Single-guide-RNA (sgRNA). באמצעות טכנולוגיה חדשה זו ניתן לפגוע בגנים צמחיים אם ידוע רצף הגן וקיימת מערכת של רגנרציה וטרנספורמציה. מערכת ה-CRISPR/Cas9 הוכחה כיעילה מאד בצמחים שונים חד-פסיגים (תירס, אורז) ודו-פסיגים (סולניים, מצליבים, דלועיים) (2, 3, 9). במחקרים קודמים הוכח שמערכת ה-CRISPR/Cas9 (2, 3) הינה יעילה, פשוטה וזולה, במקרים מסוימים ניתן להגיע למוטציה הומוזיגוטית על שני הכרומוזומים כבר בדור הראשון. זה חוסך את ההכלאות העצמיות שיכולים להימשך עד מספר דורות, הצמחים המותמרים בטכנולוגיה זו מוגדרים כלא-טרנסגנים, יש אישור לכך מהועדה לאישור צמחים מהונדסים (ורצ"מ) בישראל וגם מה- USDA בארה"ב. מחקרים מדווחים שבדור השני או השלישי המוטציה תישאר אך הפלסמיד CRISPR/Cas9 על כל מרכיביו ייעלמו מהצמח המותמר. תכונה זו תפתור את הסוגיה של אלה המתנגדים לשימוש בצמחים טרנסגניים (2). על בסיס זה ובאמצעות השימוש ב-CRISPR/Cas9 ערכנו שינוי גנטי בגן *CCD8* בזן העגבנייה T5 שישמש בעתיד כנה עמידה לעלוקת לזנים מסחריים.

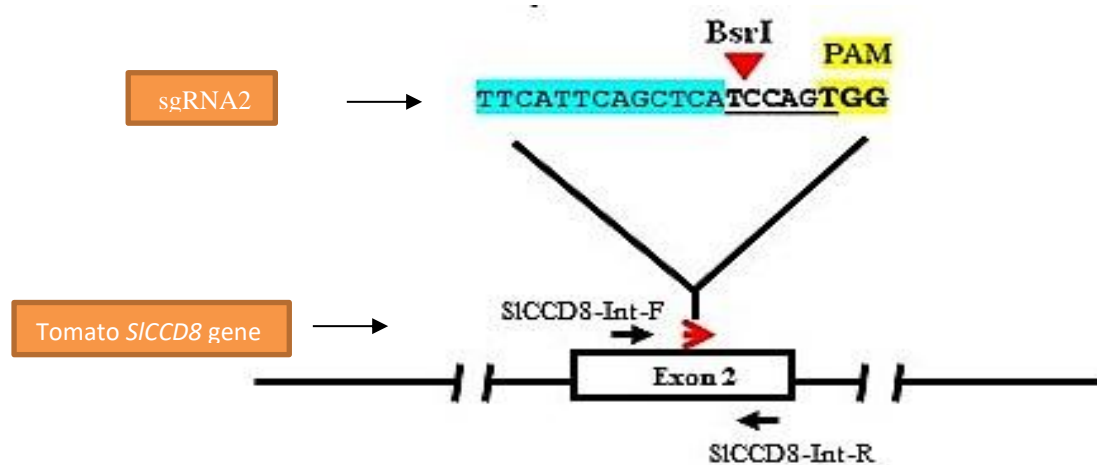
מטרות המחקר: המטרה העיקרית של המחקר היתה לפתח כנת עגבנייה עמידה לצמחי עלוקת טפילים באמצעות השימוש בטכנולוגיה CRISPR/Cas9. מטרות המשנה היו: הכנת התבניות לעריכה גנומית, טרנספורמציה של התבניות לצמחי העגבנייה, וולידציה של המוטציה בגן המטרה בעזרת אנליזה מולקולרית, ריבוי והכלאה עצמית של הקווים המוטנטים ובדיקת עמידותם של הצמחים המוטנטים להדבקה בטפיל עלוקת ובדיקת תכולת הסטימולנט אורבנכול והמטבוליטים בשורשים של הקווים המוטנטים. קווים מוטנטים שהראו עמידות גבוהה לעלוקת מצרית שימשו כנות עמידות לעלוקת בהמשך המחקר.

עיקרי הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו לתקופת המחקר

בניית תבניות גנטיות ושיבוטם בווקטור CRISPR/Cas9-gRNA לקבלת מוטציה בגן המטרה

על רצף הגן: *SICCD8* Solyc08g062950 (JF831532) GenBank accession no. ובאמצעות האתר <http://CRISPRscan.org> תוכננו שלושה sgRNAs: (sgRNA1, sgRNA2, sgRNA3). נעשה שיבוט של כל sgRNA בנפרד לפלסמיד (pENT-L1L2) ע"י ליגציה עם T4 ligase ולאחר מכן שיבוט ומיזוג עם הפלסמיד (pMR290:Cas9) ע"י ראקציית LR-Gateway (Invitrogen life technologies kit). התקבלו שלוש תבניות של pMR290:Cas9:sgRNA עם sgRNAs שונים. לאחר אימות הרצפים של הווקטורים עם ה-sgRNA ע"י ריצוף, רק התבנית עם sgRNA2 בגודל של 19bp (הומולוג לקטע הממוקם על אקסון 2 בגן *SICCD8* בין bp 1640-1658) (תמונה 1), נבחרה להמשך העבודה כי בשתי התבניות האחרות לא התקבלה אורינטציה נכונה של שיבוט ה-sgRNAs בפלסמיד הסופי (pMR290:Cas9:sgRNA). נעשתה טרנספורמציה לתבנית עם ה-

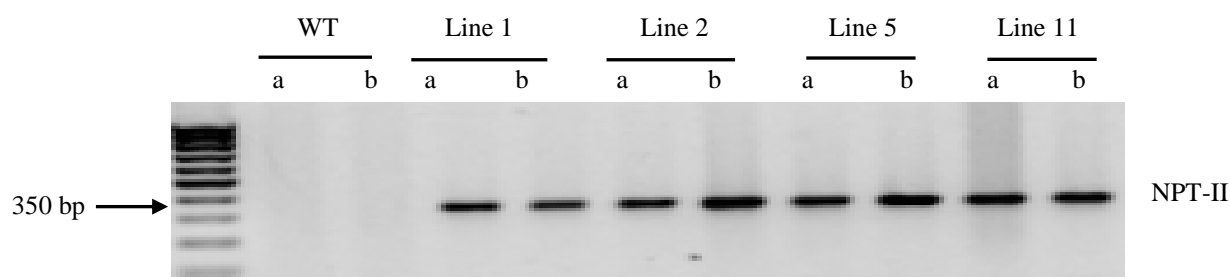
sgRNA2 לאגרובקטריום EHA105 ולאחר מכן טרנספורמציה לעגבנייה מזן T5 ע"פ פרוטוקול של דליה וולף, מדעי הצמח, מרכז וולקני.



תמונה 1 : תיאור סכמתי של מפת גן המטרה *SICCD8* ומיקום ה-sgRNA על הגן. רצף ה-sgRNA2 שתוכנן בצבע תכלת ממוקם על אקסון 2 של גן המטרה הכולל את אתר החיתוך של אנזים הריסטרקציה BsrI מסומן במשולש אדום וה-PAM (רצף ההכרה של האנזים Cas9 מסומן בצהוב). שני פריימרים ספציפיים *SICCD8-Int-F* ו-*SICCD8-Int-R* תוכננו להגביר את הקטע משני צידי ה-sgRNA היכן שאמורה להתרחש המוטציה בגן המטרה.

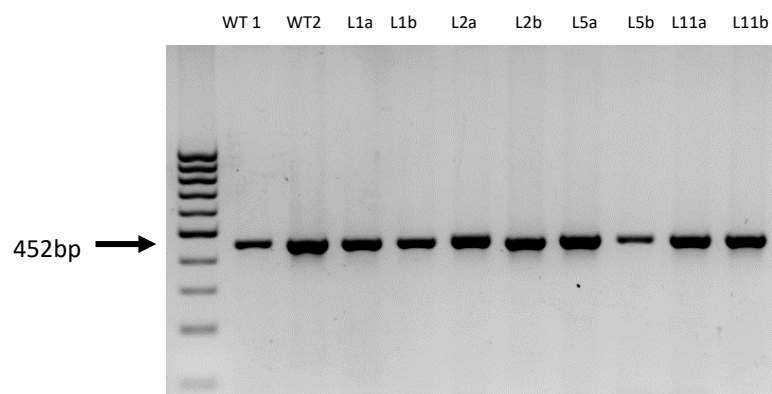
אפיון צמחים טרנסגנים בדור T0

נעשתה סריקה לצמחי T0 באמצעות גן הסלקציה קנאמיצין (תמונה 2) במטרה לבחור רק צמחים טרנסגנים. התקבלו 10 קווים טרנסגנים ואלה נשתלו בעציצים בחממה טרנסגנית לקבלת זרעים של דור T1. בצמחים הטרנסגנים של דור T0 לא אופיינה המוטציה, אפיון המוטציה נעשה ישירות על צמחי דור T1.



תמונה 2: בדיקת האנטגרציה של התבנית (pMR290:Cas9:sgRNA2) בצמחי עגבנייה בדור T0 ע"י סריקה עם פריימרים ספציפיים לגן הסלקציה קנאמיצין (NPT-II). WT, מייצג את צמחי זן הבר ללא טרנספורמציה. הקווים הטרנסגנים שעברו טרנספורמציה מיוצגים ע"י (Line 1 עד Line 11). בכל קוו נבדקו שתי דוגמאות (a) (b).

לפי תוצאות הסריקה התקבל מקטע של 350 bp עם הגן קנאמיצין לאחר הרצת תוצרי ה-PCR על גל אגרוז 1%, הוכחה לכך שהתבנית עברה אנטגרציה והתקבלו צמחי עגבנייה טרנסגנים. בכדי לאפיין את המוטציה בצמחי עגבנייה דור T1, הופק DNA גנומי הן מצמחי זן הבר WT והן מצמחים טרנסגנים שעברו עריכה גנטית. על ה-DNA הגנומי שהופק נעשתה הגברה לקטע הגן *CCD8* משני צידי ה-sgRNA ב-PCR, (היכן שאמורה להתרחש המוטציה בגן המטרה) באמצעות שני פריימרים ספציפיים *SICCD8-Int-R* ו-*SICCD8-Int-F*.

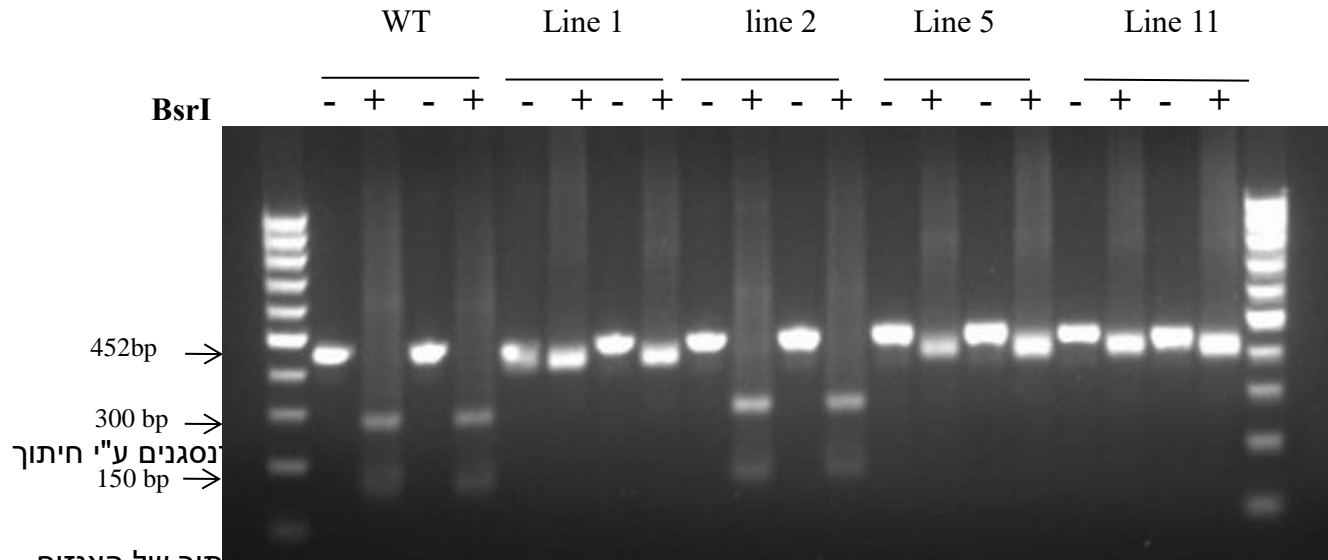


תמונה 3: הגברת קטע הגן *CCD8* משני צידי ה-sgRNA בצמחים שעברו מוטציה ובצמחי ה-WT באמצעות שני הפריימרים *SICCD8-Int-R* ו-*SICCD8-Int-F* והרצה על גל אגרוז 1%. לפי התוצאות, כצפוי, התקבל תוצר PCR בגודל של 452bp מסומן בחץ (תמונה 3). WT, מייצג הגברה של DNA שהופק מצמחי זן הבר שלא עברו מוטציה, הקווים (L1a עד L11b), מייצגים את הקווים הטרנסגנים שעברו מוטציה. כל דוגמא נבדקה פעמיים.

אפיון המוטציה בגן המטרה *CCD8*

לאחר קבלת צמחי T1 טרנסגנים נבחרו הקווים (1, 2, 5, ו-11) לאבחון המוטציה ע"י שתי גישות:

1. ראקצית חיתוך לתוצר ה- PCR (452bp) שהתקבל משני צידי ה-sgRNA .
 לבדיקת התרחשות המוטציה נעשתה ריאקצית חיתוך לתוצרי ה- PCR שהתקבלו (תמונה 3) עם האנזים BsrI והפרדת תוצרי החיתוך על גל אגרוז 1% .
 כפי שניתן לראות בתמונה 4 , התקבלו מספר פרופילים של חיתוכים: כצפוי בצמחי ה- WT התקבל חיתוך מלא לתוצר (אין מוטציה) עם שני פרגמנטים בגדלים של 300bp ו- 150bp (WT +) .



לעומת זאת בקווים 1, 2, 5 ו- 11 לא נחזק בגלל חוסר מוטציה באותו חיתוך של האנזים BsrI . בקוו 2 התקבל חיתוך מלא כמו ב- WT . (-) ראקצית חיתוך ללא האנזים BsrI , (+) ראקצית חיתוך עם האנזים. החצים מסמנים את גודל הפרגמנט שהתקבל.

2. ריצוף לתוצר ה- PCR :

הגישה השניה לוודות התרחשות מוטציה באתר המטרה היא ע"י ריצוף לתוצר ה- PCR (452bp) שהתקבל משני צידי ה-sgRNA .

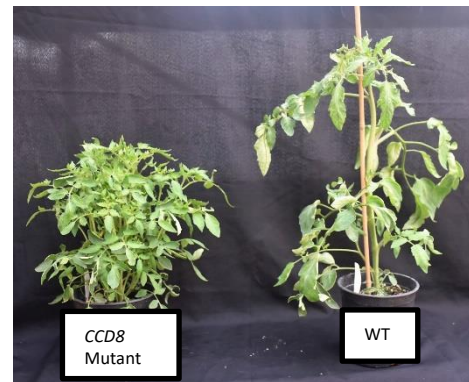
SlCCD8	(WT)	...AGGTGGATTGATTCATT CAGCTC AGTGG TTACGGACAGTGAG...	(wt)
Line_1a	(-1bp)	...AGGTGGATTGATTCATT CAGCTC ATC- AGTGG TTACGGACAGTGAG...	(stop)
Line_1b	(-1bp)	...AGGTGGATTGATTCATT CAGCTC ATC- AGTGG TTACGGACAGTGAG...	(stop)
Line_2a	(-3bp)	...AGGTGGATTGATTCATT CAGCTC --- CAGTGG TTACGGACAGTGAG...	(-His243)
Line_2b	(-3bp)	...AGGTGGATTGATTCATT CAGCTC --- CAGTGG TTACGGACAGTGAG...	(-His243)
Line_5a	(*)	...AGGTGGATTGATTCATT CAGCTC -----	(*)
Line_5c	(-4bp)	...AGGTGGATTGATTCATT CAGCT --- CAGTGG TTACGGACAGTGAG...	(stop)
Line_11a	(-6bp)	...AGGTGGATTGATTCATT CAG --- CAGTGG TTACGGACAGTGAG...	(-His243-Pro244)
Line_11b	(*)	...AGGTGGATTGATTCATT CAGCA -----	(*)

תמונה 5: תוצאות הריצוף של תוצר ה- PCR (452bp) שהתקבל משני צידי ה-sgRNA בקווים הטרנסגנים בהשוואה לביקורת WT.

רצף ה-WT שורה עליונה בתרשים, הרצף המסומן בצבע תכלת מייצג את ה-sgRNA, קטע הרצף המסומן בקו תחתון הינו אתר החיתוך של האנזים BsrI, הרצף בצהוב מייצג את ה-PAM ומספר הבסיסים החסרים מופיע בצד שמאל של התרשים.

לפי תוצאות הריצוף תמונה 5, התקבלו מוטציות שונות של חוסרים (deletion) ברצף הבסיסים בקווים הטרנסגנים 1, 2, 5 ו-11 (חוסרים של בסיס 1 כמו בקו 1a line), חוסר של שלושה בסיסים (line 2a), חוסר של ששה בסיסים (line 11a), ובמקרים אחרים התקבלו חוסרים של קטעים שלמים כמו ב-line 5a, line 11b (מסומנים ב-*) . למרות התרחשות המוטציה בקוו 2, התקבל חיתוך מלא ע"י BsrI, והסיבה לכך למרות המוטציה אתר אנזים החיתוך TCCAG נשמר ברצף.

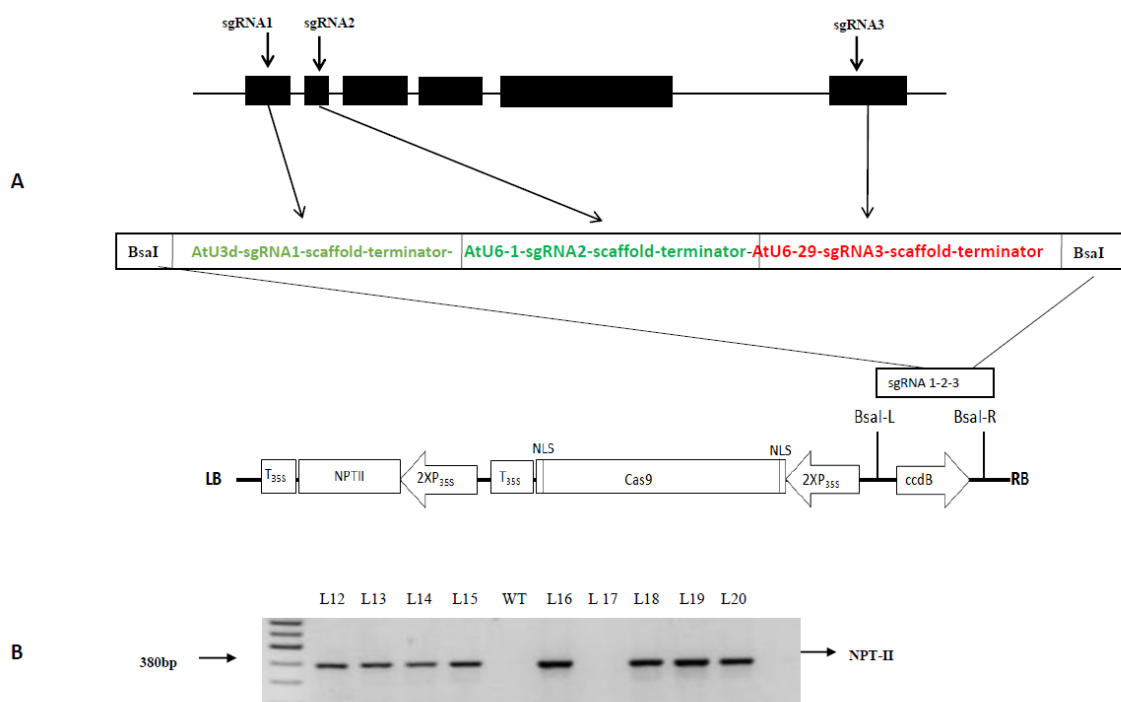
אפיון מופע (פינוטיפ) הצמחים המוטנטים בהשוואה לצמחי הבקורת WT



תמונה 6: מופע הצמחים המוטנטים בהשוואה לצמחי הבקורת (WT) ללא המוטציה לאחר הוכחת התרחשות המוטציה בגן המטרה CCD8 בשתי הגישות שהוזכרו למעלה, נבדק מופע הצמחים המוטנטים (תמונה 6, CCD8 mutant) בהשוואה לצמחים לא מוטנטים (WT) (תמונה 6, צד ימין). לאחר 42 ימים מהזריעה הצמחים המוטנטים הראו ננסות והרבה הסתעפויות של הענפים בהשוואה ל-WT שהתפתחו באופן נורמלי.

על מנת לבדוק אם יש אפקט מצטבר לשלושת ה-sgRNA שהוכנו בשנה השנייה מחוברים יחדיו באותה תבנית על עמידות העגבנייה לעלקת, הוכנה תבנית גנטית שתכיל את שלושת ה-sgRNAs מחוברים ביחד ושיבוט בווקטור pYLCRISPR לקבלת מוטציות בגן המטרה CCD8.

על רצף הגן: Solyc08g062950 *SICCD8* (JF831532) GenBank accession no. ובאמצעות האתר <http://CRISPRscan.org> תוכננו שלושה sgRNAs: (sgRNA1, sgRNA2, sgRNA3). לקבלת תבנית שתכיל את שלושת ה-sgRNAs באותה תבנית, השיבוט נעשה ע"פ (10). במהלך העבודה נעשה שיבוט של כל sgRNA בנפרד לפלסמיד pYLCRISPR (9) תחת הבקרה של פרומוטורים שונים: Arabidopsis U3d, AtU6-1 and AtU6-29 באמצעות PCR וליגזות ע"י T4 DNA ligase עד לקבלת הפלסמיד *pYLCRISPR:Cas9:sgRNA-1-2-3* (איור 7-A). לאחר אישור האורינטציה הנכונה, הפלסמיד *pYLCRISPR:Cas9:sgRNA-1-2-3* עבר טרנספורמציה לאגרובקטריום (EHA105) ולאחר מכן לעגבנייה מזן T5. נעשתה סריקה לצמחי T0 באמצעות גן הסלקציה קנאמיצין (איור 7-B) במטרה לבחור רק צמחים טרנסגנים. התקבלו 9 קווים טרנסגנים ואלה נשתלו בעציצים בחממה טרנסגנית לקבלת זרעים של דור T1. בצמחים הטרנסגנים של דור T0 לא אופיינה המוטציה, אפיון המוטציה נעשה ישירות על צמחי דור T1. אפיון המוטציות בגן המטרה CCD8 בעגבנייה לאחר טרנספורמציה עם *pYLCRISPR:Cas9:sgRNA-1-2-3* להוכחת התרחשות המוטציה בגן המטרה, נעשתה ראקצית חיתוך וריצוף לפרגמנט שהתקבל (מאמפלפקציה עם פריימרים ספציפיים משני צידי ה-sgRNA השונים). הפרגמנטים שהתקבלו מאמפלפקציה משני צידי ה-sgRNA (1 ו-3) נחתכו באנזימי הרסטרקציה (BclI ו-MvaI בהתאמה).

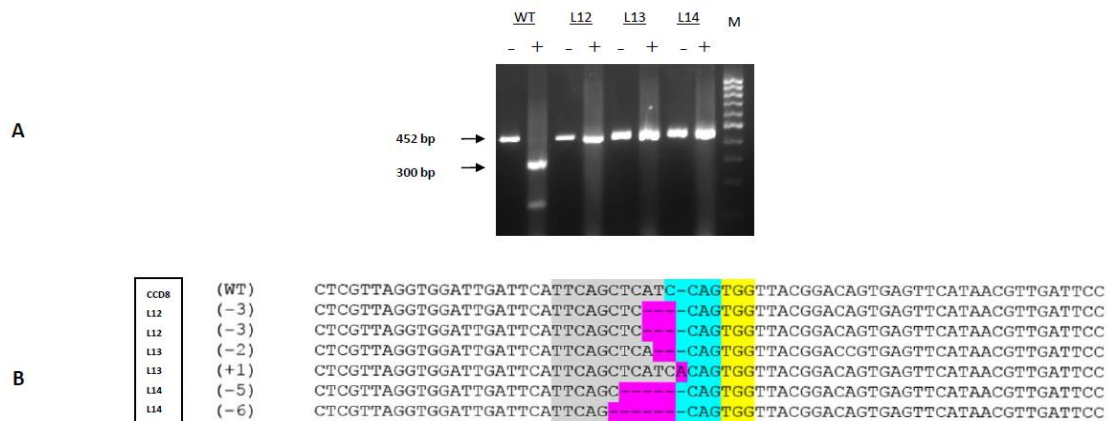


תמונה 7 : סכימה המתארת את שיבוט שלושת ה- sgRNA בתוך הוויקטור *pYLCRISPR* לקבלת מוטציה בגן המטרה *CCD8* וסריקה לקווים טרנסגנים ע"י הגן קנאמיצין

(A) סכימה למיקום שלושת ה- sgRNAs (1, 2 ו- 3) על שלושת האקסונים (1, 2 ו- 6) של הגן *CCD8* המטרה בהתאמה. sgRNA1 שובט תחת בקרת הפרומוטור *Atu3d*, sgRNA2 שובט תחת בקרת הפרומוטור *AtU6-1* ו- sgRNA3 שובט תחת בקרת הפרומוטור *AtU6-29*. הפרגמנט שהכיל את שלושת ה- sgRNAs והפרומוטורים שלהם שובט באתר הריסטרקציה *BsaI*.

(B) בדיקת האינטגרציה של הפלסמיד בצמחי העגבנייה בדור T0 וסריקה לקווים טרנסגנים באמצעות פריימרים ספציפיים לגן הסלקציה קנאמיצין (NPT-II). בדור T0 התקבלו 9 קווים ואלה נשתלו בעציצים בחממה טרנסגנית לקבלת זרעים של דור T1. בצמחים הטרנסגנים של דור T0 לא אופיינה המוטציה, אפיון המוטציה נעשה ישירות על צמחי דור T1. WT, מייצג את צמחי זן הבר ללא טרנספורמציה. הקווים הטרנסגנים שעברו טרנספורמציה מיוצגים ע"י (L12 עד L20).

תוצאות החיתוך הראו שכל המוטציות נחתכו לשני פרגמנטים בדומה ל- WT אינדקציה להעדר מוטציה. לעומת זאת הפרגמנט שהוגבר משני צידי ה- sgRNA2 נחתך ע"י *Bsr1* ולפי התוצאות, בחלק מהקווים התקבל חיתוך שלם בדומה ל- WT ובחלק אחר לא התקבל חיתוך. הקווים (12, 13, 14) שבהם לא התקבל חיתוך (אינדקציה להתרחשות מוטציה) נבחרו להמשך העבודה. כפי שניתן לראות (באיור A-8). כצפוי בצמחי ה- WT התקבל חיתוך מלא לתוצר (אין מוטציה) עם שני פרגמנטים בגדלים של 300bp ו- 150bp (WT +) לעומת זאת הקווים (12, 13 ו- 14), לא נחתכו ע"י האנזים, אינדקציה להתרחשות מוטציה. לפי תוצאות הריצוף (איור B-8), התקבלו מוטציות שונות של חוסרים (deletion) של 3-6 בסיסים או הוספה של אחד ברצף הבסיסים.



איור 8 : (A) פרופיל החיתוך של תוצר ה-PCR (452 bp) שהתקבל בצמחי WT והקווים הטרנסגנים ע"י חיתוך באנזים BsrI והפרדת תוצרי החיתוך על גל אגרוז 1%.
(-) ראקציה חיתוך ללא האנזים BsrI, (+) ראקציה חיתוך עם האנזים. החצים מסמנים את גודל הפרגמנט שהתקבל. (B) תוצאות הריצוף של תוצר ה-PCR (452bp) שהתקבל משני צידי ה-sgRNA2 בקווים הטרנסגנים בהשוואה לביקורת WT. רצף ה-WT שורה עליונה בתרשים, הרצף המסומן בצבע תכלת מייצג את ה-sgRNA והרצף בצהוב מייצג את ה-PAM ומספר הבסיסים החסרים (צבע סגול) מופיע בצד שמאל של התרשים. פרופיל החיתוך, הרצף ומיקום המוטציה בקווים 12, 13 ו-14 שהתקבלו בטרנספורמציה השנייה (כאשר שלושת ה-sgRNA היו מחוברים יחדיו) היה דומה מאד לאלה שהתקבלו בקווים 1, 2, 5 ו-11 לכן הזרעים שלהם נשמרו והמחקר המשיך רק עם הקווים 1, 2, 5 ו-11.
אפיון הצמחים המוטנטים בדור T1: הפינוטיפ, בדיקת העמידות לטפיל עלקת, רמת הסטריגולקטון ופרופיל

מטבוליטי ראשוני בהשוואה לצמחי הביקורת WT

בבדיקת מופע הצמחים המוטנטים (L1, L2, L5, L11) בהשוואה לצמחים לא מוטנטים (WT), 42 ימים מהזריעה, הצמחים המוטנטים הראו ננסות, הרבה הסתעפויות של הענפים והגדלה במסת השורשים האדוונטיבים בהשוואה ל-WT שהתפתחו באופן נורמלי (תמונה A-9). לבדיקת העמידות של המוטנטים לטפיל עלקת, שתילים של עגבניות בגיל שבועיים נשתלו בעציצים המכילים אדמה שאולחה מראש בזרעי הטפיל בריכוז 20mg/liter. לאחר 55 ימים מההדבקה בזרעי הטפיל, העציצים נשטפו במים בכדי לספור את פקעיות והנצרונים של הטפיל שהתפתחו על הקווים השונים. בקווים המוטנטים (L1, L2, L5, L11) התקבלה ירידה משמעותית במספר העלקות שהתפתחו על קווים אלה מלבד קוו 11 (איורים: B-9 ו-10, A, B). רמת הסטריגולקטון (אורבנכול) ירדה באופן מובהק בקווים המוטנטים בהשוואה לרמה בביקורת בתמצית של השורשים (איור C-10). בקוו 5, לא זוהה ואובחן אורבנכול בכלל. בנוסף לכך נבדקה השפעת המוטציות על פרופיל המטבוליטים שכלל 15 חומצות אמינו שונות בעלים ושורשים של עגבנייה. תכולת חומצות האמינו הכללית (nmol/gmDw) עלתה באופן מובהק בעלים אך ללא שינוי בולט בשורשים מלבד בקוו 5 (איור D-10). בעלים עלו באופן משמעותי בקווים 5 ו-11, חומצות האמינו המסועפות, פנילאלנין, אלנין בעוד שרמת הגלוטמאט ירדה.

הרכבות:

קווי עגבנייה מוטנטים שהראו עמידות גבוהה לעלקת מצרית כמו קוו 5 או נמוכה כמו קוו 11 נבחרו לשימוש ככנות להרכבה. רק קווים הומוזיגוטיים שימשו ככנות להרכבה. ההרכבות בוצעו במרכז מחקר צפון-נוה יער בהדרכתו של ד"ר מנחם אדלשטיין מהמחלקה לדלועיים – בעל נסיון עשיר בבצוע הרכבות. להלן ההרכבות שבוצעו (טבלה 1).



איור 9 : מופע הצמחים המוטנטים ובדיקת עמידותם לטפיל עלקת בעציצים בהשוואה לצמחי הבקורת (WT) (A), השוואה בין מופע והתפתחות הצמחים המוטנטים (L1, L2, L5, L11) בהשוואה לצמחי הביקורת WT. (B), מספר העלקות שהתפתחו על הצמחים המוטנטים (55 ימים מהדבקה בעלקת בעציצים) בהשוואה לביקורת WT (מסומנים בחץ אדום קצר).

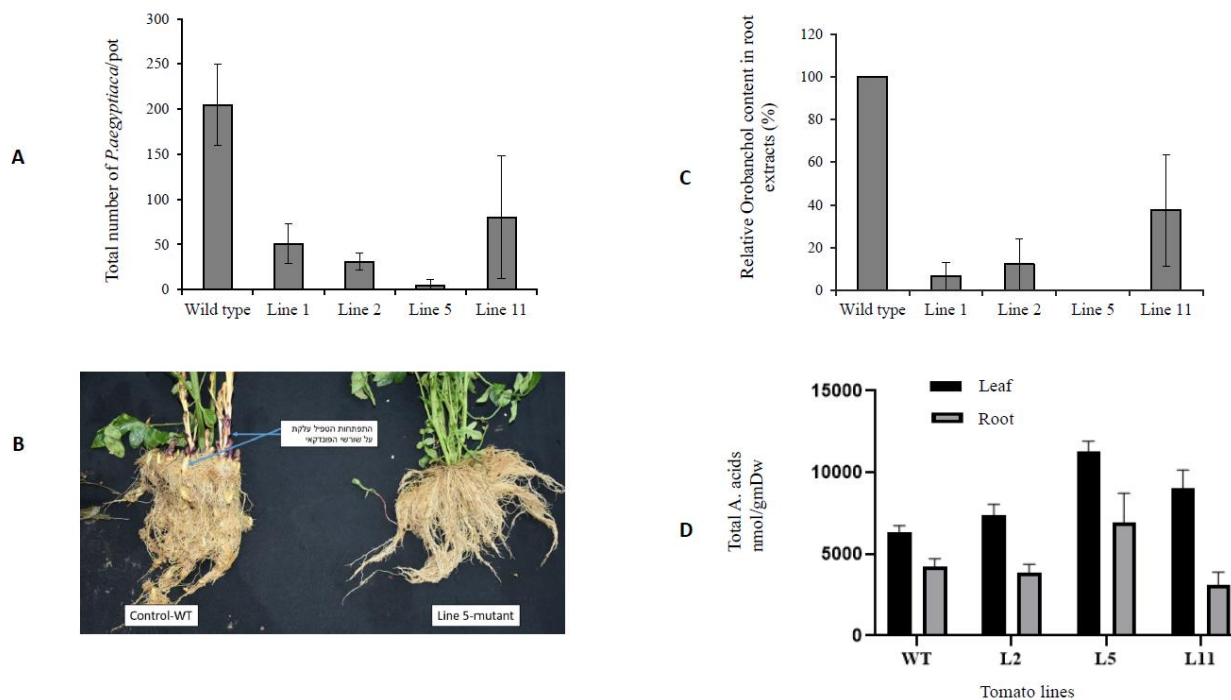
כנה	רוכב
WT	WT
Line 5	Line 5
Line 11	Line 11
Line 5	WT
WT	Line 5
Line 11	WT

Line 11

WT

טבלה 1 : טבלת הטיפולים בהרכבות

לפי התוצאות (תמונה 12), בשילובי ההרכבות, כאשר ה-WT שימש גם כנה וגם רוכב (WT/WT) התפתח מספר רב של עלקות על הכנה (כ- 55) בממוצע בגדלים שונים. בשילוב של הקוו 11/11, התקבלו כ- 15 עלקות ובשילוב של הקוו 5/5 התקבלה ירידה משמעותית במספר העלקות (2-3) עלקות בהשוואה לקוו 11 או ל-WT. כאשר ה-WT שימש כנה לקוו 5 התקבלה עלייה משמעותית במספר העלקות קרוב ל- 65 עלקות, לעומת זאת כאשר קוו 5 שימש כנה והרוכב היה WT התקבלה ירידה משמעותית במספר העלקות שהתפתחו על הכנה אינדקציה לכנה עמידה יותר. בשילובים השונים של קוו 11 עם ה-WT, התקבלו יותר עלקות, 20-35 עלקות אינדקציה לקוו פחות עמיד מקוו 5.

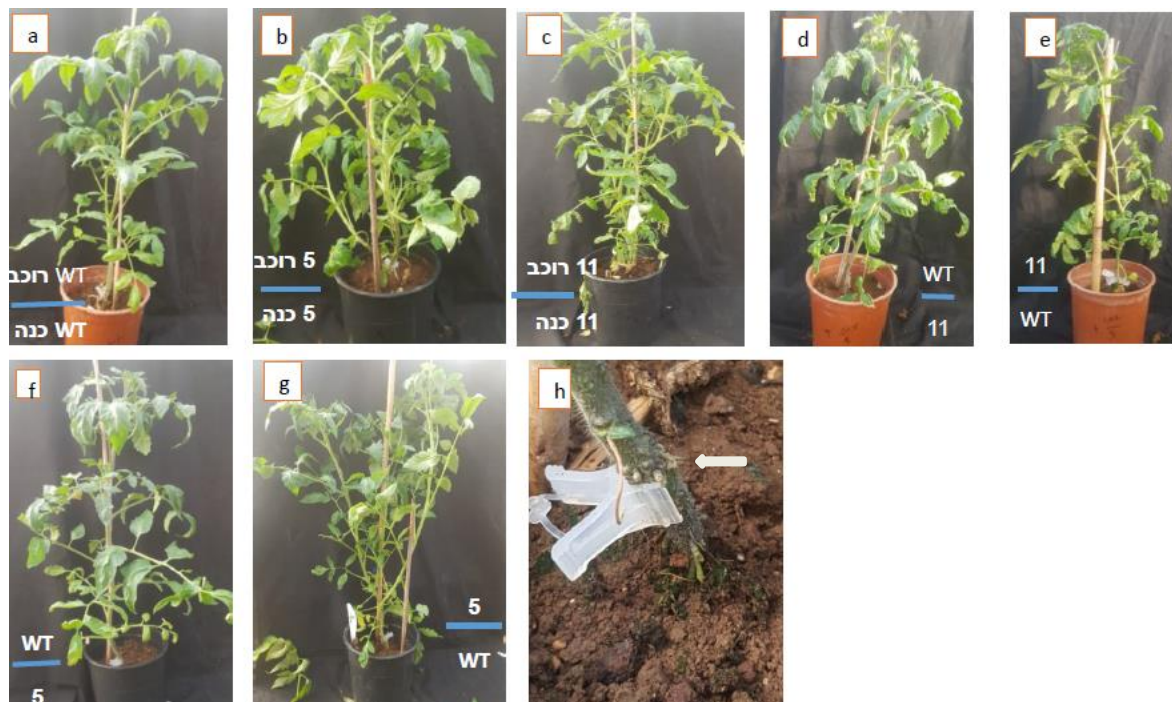


איור 10: בדיקה ואפיון העמידות לעלקת, רמת הסטריגולקטון (אורבנכול) והפרופיל המטבולי הראשוני בקווי עגבנייה מטונטים בהשוואה לביקורת WT.

(A), ממוצע מספר העלקות שהתפתחו על קווים מוטנטים בהשוואה לביקורת בכל צמח (עציץ). כל עמודה מייצגת ממוצע של 8 חזרות. (B), השוואה בהתפתחות העלקות על הקוו העמיד 5 לעומת הביקורת WT, חצים כחולים מייצגים את העלקות. (C), רמת האורבנכול ב-% בשורשים של קווי עגבנייה מוטנטים לעומת

הביקורת כאשר כל עמודה מייצגת ממוצע אוסף של שורשים מ- 8 דוגמאות. (D), רמת חומצות האמינו הכללית (nmol/gmDw) בעלים ובשורשים בקווים מוטנטים בהשוואה לביקורת WT. העמודות מייצגות ממוצעים של דוגמאות משורשים ועלים.

כחודשיים לאחר ביצוע ההרכבות, בית השורשים של הצמחים המורכבים נשטף בכדי לאבחן בצורה ויזואלית את התפתחות העלקות על הכנות (תמונה 13). בתמונה 13, החלק העליון של התמונה מייצג ההרכבות של כל קוו על עצמו דהיינו הכנה והרכב מאותו קוו, לדוגמא הרכבה של WT/WT(-) ללא עלקת והרכבה של WT/WT(+) עם עלקת. כנ"ל לגבי הקוו העמיד 5 והקוו הרגיש 11. בחלק התחתון של התמונה הרכבות המשלבות קווים שונים. החץ מראה את מספר העלקות שהתפתחו על כל כנה.

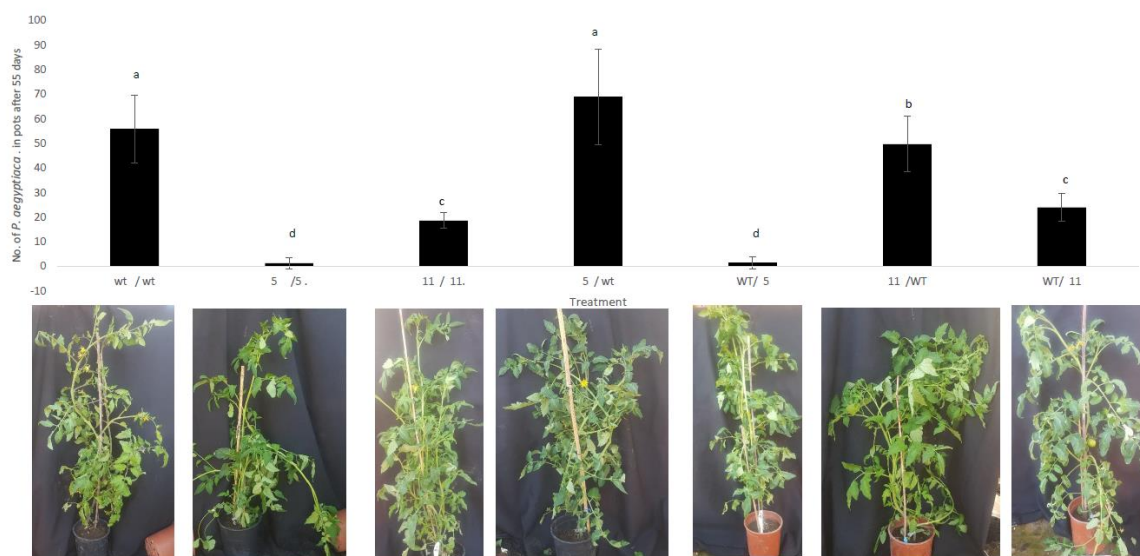


תמונה 11: השוואה בין מופע והתפתחות הצמחים המוטנטים המורכבים (L5, L11) בהשוואה לצמחי הביקורת WT.

בתמונה (a עד g), הרכבות בשילובים שונים כאשר המספר מעל הקוו הכחול מייצג את הרכוב ומתחת לקוו הכחול מייצג את הכנה. בתמונה h, ניתן לראות את החיבור בין הכנה לרכוב מסומן בחץ לבן.

אנליזה של ח. אמינו, מטבוליטים וסוכרים בקווי עגבנייה מוטנטים בהשוואה לביקורת

בשנה השלישית המשכנו גם באנליזה ומעכב על השינויים שחלו בפרופיל חומצות אמינו, מיטבוליטים וסוכרים בעלים ושורשים של עגבנייה מוטנטית לעומת צמחי ה-WT. להלן התוצאות שהתקבלו: (1) ההצטברות של חומצות אמינו (ח. אמינו) שונות כמו (אלנין, וואלין, סירין לאוצין גלוטמאט איזוליצין ועוד) בעלי עגבנייה הייתה יותר גבוהה בקווים המוטנטים 5 ו-11 בהשוואה לצמחי ה-WT מודבקים או ללא הדבקה בעלקת.



תמונה 12 : השוואת העמידות של כנות הקווים המוטנטים לעומת כנת ה-WT לעלקת

בחלק העליון של התמונה, ממוצע מספר העלקות שהתפתחו על קווים מוטנטים מורכבים בהשוואה לביקורת בכל צמח. כל עמודה מייצגת ממוצע של 10 חזרות עם סטיית התקן ואותיות קטנות באנגלית מייצגות את רמת המובהקות בין הטיפולים. בחלק התחתון של התמונה, מופע הצמחים המורכבים בכל שילוב לאחר 56 ימים מביצוע ההרכבה.



תמונה 13 : השוואה בין מספר העלקות שהתפתחו על הכנות (בית השורשים) לאחר השטיפה. הטיפולים כללו 7 טיפולים : WT/WT ללא עלקת (-) , WT/WT(+) עם עלקת, 5/5(-) , 5/5(+), 11/11(-) , 11/11(+). החץ מראה על כמות העלקות שהתפתחו על כל כנה.

(2) ההצטברות של ח. אמינו בשורשים הייתה גבוהה יותר בקוו המוטנטי 5 בהשוואה לשאר הקווים או צמחי הביקורת WT. (3) מעגל ה-TCA הצטבר לרמה מקסימלית בעלים ושורשים של קוו 5 המוטנטי שהראה עמידות גבוהה נגד עלקת. (4) התקבלה הצטברות גבוהה של סוכרים כמו (פרוקטוז, גלוקוז, גלקטוז, סוכרוז, מאנוז ועוד) באופן מובהק בשורשים של קוו 5 המוטנטי בהשוואה לשאר הקווים או צמחי הביקורת WT במיוחד ללא הדבקה בעלקת. (5) בעלקת, התקבלה תמונה שונה של הצטברות סוכרים ומטבוליטים שונים. הצטברות גבוהה של הנ"ל התקבלה בצמחי ה-WT וגם בקוו המוטנטי הרגיש 11.

דיון ומסקנות

מטרת המחקר העיקרית הייתה, פיתוח כנת עגבנייה עמידה לטפיל עלקת. המחקר הנוכחי משלב ידע בסיסי ויישומי המושתת על מעורבות גנים כמו (*CCD8*) ביצירת סטריגולקטונים (הורמונים צמחיים המופרשים ע"י שורשי צמחים רבים ולהם יש תפקיד חשוב בעיצוב וארכיטקטורה של הפונדקאי והנבטת זרעי הטפיל (6, 10)). בשנה הראשונה למחקר, נבנו שלוש תבניות גנטיות עם *sgRNA* בודד לכל תבנית ושיבוטם בווקטור

CRISPR/Cas9 לקבלת מוטנטים בגן המטרה *CCD8*. נבדקה האוריינטציה של ה-*sgRNA* בכל תבנית ע"י ריצוף. התבנית הגנטית שהכילה *sgRNA2* הממוקם על אקסון מס 2 של הגן *CCD8* נבחרה להמשך העבודה כי שתי התבניות האחרות שהכילו *sgRNA1* ו-*sgRNA3* לא עבדו כמתוכנן ככל הנראה בגלל המיקום שלהם על גן המטרה. לאחר הטרנספורמציה, נעשתה אנליזה מולקולרית על צמחי T1 טרנסגנים ונבחרו הקווים (1), (2, 5, ו-11) לאבחון המוטציה. התקבלו קווי עגבנייה טרנסגנים עם מוטציות שונות של החסרה (Deletion) ברצף הבסיסים של הגן *CCD8*, כנראה בגלל פעילות שונה של האנזים Cas9 (3) והוכחה לכך שה-*sgRNA* וה-*Cas9* שנבחרו עשו את המוטציה באתר הנכון. מדיווחים בספרות (2, 9) ידוע ששימוש במערכת CRISPR לעריכה גנטית יכול במקרים מסויימים לגרום למוטציה לא רצויה בגנום (Off-target). בכדי לשלול את התופעה במחקר זה, גינום העגבנייה נסרק ע"י התוכנה P-CRISPR וה-*sgRNA2*, לשמחתנו לא התקבלו מוטציות לא רצויות בגנום העגבנייה. כאשר נבדק ויזואלית מופע הצמחים המוטנטים, התקבלו צמחים שונים מצמחי ה-WT, הצמחים המוטנטים היו נמוכים יותר עם הרבה הסתעפויות של ענפים צדדיים. הסיבה לכך היא בגלל המוטציה שהתרחשה בגן המטרה שהינו מעורב ביצירת ההורמון הצמחי סטריגולקטון האחראי על הארכטיקטורה ועיצוב הצמח. בספרות המדעית ידוע שהפחתה ברמת הסטריגולקטון תגרום לינוס הצמח ויצירת הסתעפויות רבות של הענפים והגברה למסת השורשים. תופעה דומה נצפתה גם בדיווח מדעי אחר שבו השתיקו את גן המטרה *CCD8* בעגבנייה באמצעות טכנולוגית ה-siRNA (7).

בשנת המחקר השנייה נבנתה תבנית אשר הכילה שלושה *sgRNAs* מחוברים יחדיו לאותה תבנית לקבלת סינרגיזם להפחתה ברמת ההורמון סטריגולקטון. תבנית זו לא השיגה את המטרה ואינה תומכות בהיפותיזת המחקר כי לא התקבלו מוטציות בגן המטרה משני ה-*sgRNA* (ה-*sgRNA1* ו-*sgRNA3*) הממוקמים על אקסון 1 ואקסון 6 בהתאמה. יתכן שהסיבה לכך הוא המיקום שלהם על גן המטרה, יתכן שלא היה שיעתוק של שני ה-*sgRNA* הנ"ל או שלא הצליחו להתחבר לאנזים *Cas9*. ראוי לציין שגם בשנת המחקר הראשונה כאשר כל *sgRNA* שובט בנפרד לתבנית, לא התקבלו מוטציות עם שני ה-*guides* (*sgRNA1* ו-*sgRNA3*). באותה תבנית שהכילה שלושת ה-*sgRNAs* התקבלו מוטציות אך ורק מפעילות ה-*sgRNA2* ולכן נבחרו עוד שלושה קווים (12, 13 ו-14) (איור 8) שצורפו לקווים מוטנטים משנה ראשונה להמשך העבודה. בקווים אלו התקבלו מוטציות שונות של החסרה בבסיסים (Deletion) כמו בקווים (12, 14) או הוספה של בסיס (קוו 13) ברצף הבסיסים של הגן *CCD8*. כנראה זה נובע מפעילות שונה של האנזים *Cas9* (3). בשנת המחקר השנייה, הקווים המוטנטים (1, 2, 5, 11) של דור T1 שהוכנו בשנת המחקר הראשונה אופיינו ונבדקה עמידותם לעלקת. בבדיקת הפינוטיפ של הקווים הנ"ל, הצמחים המוטנטים הראו ננסות, ריבוי בהסתעפויות של הענפים ובשורשים האדוונטיביים. התוצאות שלנו תואמות לדיווחים בספרות (4, 7) שפגיעה או מוטציה בגן *CCD8* תגרום לתופעות שנזכרו לעיל. תופעה דומה נצפתה גם בדיווח מדעי אחר שבו השתיקו את גן המטרה *CCD8* בעגבנייה באמצעות טכנולוגית ה-siRNA (8).

תכולת האורבנכול (סטימולנט להנבטת זרעי הטפיל) פחתה משמעותית וכתוצאה התקבלו קווים עמידים לטפיל עלקת במיוחד בקו 5. תוצאה זו עונה על מטרת והיפוזתת המחקר (פחות סטימולנט, פחות נביטה של זרעי הטפיל). בסריקת גנום העגבנייה למוטציות לא רצויות, לא התקבלו מוטציות כאלה (Off-target).

העמידות של הקווים המוטנטים (L1, L2, L5, L11) לטפיל עלקת נבדקה ונמצא שבעקבות ירידה משמעותיים של אורבנכול התקבלה ירידה משמעותית במספר העלקות שהתפתחו על קווים אלה מלבד קו 11 שהראה רגישות לעלקת למרות המוטציה. יתכן שהסיבה לכך היא החסרה של החומצה האמינית המעגלית Pro-244 האחראית על קיפול ואקטיבציה של החלבון CCD8.

השפעת המוטציות של הקווים (L1, L2, L5, L11) על פרופיל המטבוליטים שכלל 15 חומצות אמינו שונות נבדקה גם בעלים וגם בשורשים של עגבנייה. הבדיקה בוצעה במעבדה של רחל אמיר במיגל. לפי התוצאות, תכולת חומצות האמינו הכללית (nmol/gmDw) עלתה באופן מובהק בעלים אך ללא שינוי בולט בשורשים מלבד בקו 5 (איור 10-D). בקו 5 העמיד ביותר לעלקת, ח. האמינו שעלו (אספרטאט, מתיונין, טראונין, הומוסרין), קשורות למשפחת האספרטאט. והחומצות (ולין, איזולאוצין ולאוצין), ח. אמינו מסועפות. כתוצאה מהעלייה של כל אלו עלה סה"כ החומצות האמינו בקו זה. כל אלו מעידים שהמוטציה שהתרחשה ב CCD8 גרמה לפנוטיפ מטבולי של עקה בשורשים. התקבלה ההצטברות גבוהה של חומצות אמינו שונות כמו (אלנין, וואלין, סירין לאוצין גלוטמאט איזוליצין ועוד) בעלי עגבנייה בקווים המוטנטים 5 ו-11 בהשוואה לצמחי ה-WT מודבקים או ללא הדבקה בעלקת. עלייה נוספת נצפתה גם במעגל קריפס (TCA), ככל הנראה זה התרחש בעקבות העקה שגרמה המוטציה לצמח העגבנייה, הצמח נדרש לייצר יותר אנרגיה.

בנושא ההרכבות, בכל השילובים שבוצעו כאשר הקו המוטנטי שימש ככנה לדוגמא הקווים 5 ו-11 התקבלה עמידות גבוהה לעלקת בהשוואה לכנת ה-WT. קו 5 הראה את העמידות הגבוהה ביותר לעלקת כאשר הורכב על עצמו או כאשר שימש כנה ל-WT.

מסקנות: התוצאות תומכות בהיפוזתת העבודה: התקבלו קווי עגבנייה טרנסגנים עם מוטציות שונות של החסרה ברצף הבסיסים בגן המטרה CCD8, המוטציות אושרו ע"י חיתוך באנזים הרסטרקציה Bsr1 וריצוף למקטע משני צידי המוטציה וכמו כן לא התקבלו מוטציות לא רצויות בגנום העגבנייה. מופע הצמחים המוטנטים (L1, L2, L5, L11) היה שונה מצמחי ה-WT, הצמחים היו נמוכים יותר עם הרבה הסתעפויות של ענפים בגלל המוטציה ופגיעה ביצירת הסטריגולקטון. כתוצאה ממוטציות באנזים CCD8, אנזים מפתח במסלול יצירת הסטריגולקטון בעגבנייה שהינו אחראי על עיצוב והתפתחות הצמח. תכולת הסטריגולקטון (אורבנכול) ירדה משמעותית בקווים המוטנטים, אך רמת ח. האמינו עלתה משמעותית בעלים. למרות הפגיעה במופע הצמחים המוטנטים הם הראו עמידות לטפיל עלקת במיוחד בקווים (1, 2 ו-5). לאור התוצאות, ובגלל הפגיעה של המוטציה בנוף הקווים המוטנטים, הוכנה התשתית הדרושה להמשך המחקר לפי המטרות שהצבנו דהיינו שימוש בצמחים המוטנטים העמידים ככנות לזני עגבנייה אחרים. קו 5 הראה את העמידות הגבוהה ביותר

לעלקת כאשר הורכב על עצמו או כאשר שימש כנה ל- WT . לאור הנתונים והתוצאות, נרשם פטנט על הכנה של קוו 5 . כנה זו תשמש בעתיד ככנה עמידה לעלקת לזני עגבנייה מסחריים.

References:

1. Aly, Radi. 2007. "Conventional and Biotechnological Approaches for Control of Parasitic Weeds." *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 43(4):304–17.
2. Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., kamoun, S., Patron, N.J. and Nekrasov, V. (2015) Editing Plant genomes with CRISPR/Cas9. *Curr.Opin.Biotechnol.*32: 76-84.
3. Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z., Van Eck, J. (2014) Efficient gene editing in tomato in the first generation using the CRISPR/Cas9 system. *Plant Physiol.* 166: 1292-1297.
4. Gomez-Roldan, V. et al. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455, 189-194, doi:10.1038/nature07271 (2008).
5. Horvath, P., and Barrangou, R. (2010) CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science.* 327, 167.
6. Joel, D. M. et al. 2007. "Biology and Management of Weedy Root Parasites." Pp. 267–349 in *Horticultural Reviews*, vol. 33.
7. Kapulnik Y, Delaux PM, Resnick N, Mayzlish-Gati E, Wininger S, Bhattacharya C, Séjalon-Delmas N, Combiér JP, Bécárd G, Belausov E, et al. (2011) Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in Arabidopsis. *Planta* 233: 209–216.
8. Kohlen, W., Charnikhova, T., Lammers, M., Pollina, T., Tóth, P., Haider, I., Pozo, MJ., de Maagd, RA., Ruyter- Spira, C., Bouwmeester, HJ., López-Ráez, JA. (2012) The tomato CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 (SICCD8) regulates rhizosphere signaling, plant architecture and affects reproductive development through strigolactone biosynthesis. *New Phytologist* 196: 535-47
9. Li, JF., Norville, JE., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., Bush, J., Church, GM., Sheen, J. (2013) Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol*, 31: 688-691.
10. Ma X., Zhang Q., Zhu Q., Liu W., Chen Y., Qiu R., Wang B., Yang Z., Li H., Lin Y., Xie Y., Shen R., Chen S., WangZ., Chen Y., Guo J., Chen L., Zhao X., Dong Z., and Liu Y.-G.(2015). A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants. *Mol. Plant.*8, 1274–1284.

11. Mercs, S., Tollet, J., Magy, B., Narvarre, C. and Boutry, M. (2016). Gene inactivation by CRISPR-Cas9 in *Nicotiana tabacum* BY-2 Suspension Cells. *Front. Plant Sci.* 7:40. doi: 10.3389/fpls.2016.00040.
12. Umehara, M. et al. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455, 195-U129, doi:10.1038/nature07272 (2008).
13. Xie, Xiaonan, Kaori Yoneyama, and Koichi Yoneyama. 2010. "The Strigolactone Story." *Annu. Rev. Phytopathol* 48:93–117.
14. Wang, Y. T. & Bouwmeester, H. J. Structural diversity in the strigolactones. *Journal of Experimental Botany* 69, 2219-2230, doi:10.1093/jxb/ery091 (2018).

פירסומים

Bari, V.K., Abu-Nassar, J., Lati, R., Marzouk-Kheredin, S., Gal-On, A., Ron, M., Britt, A., Steele, D., Yoder, J. and **Aly, R****. (2019). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of *CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 8* in tomato provides resistance against the parasitic weed *Phelipanche aegyptiaca*. *Scientific Reports-Nature* 9: 10.1038/s41598-019-47893-z.