

תוכן העניינים

<u>עמוד</u>	<u>הנושא</u>
1	דף פותח את הדו"ח
2	תקציר
3	מסכנות והמלצות
3-4	מבוא
4	מטרות המחקר
4-8	פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר
8-9	דיון וסיכום
10	בבליוגרפיה

דוח לתכנית מחקר מספר 132-1919-18

שנת המחקר: 2 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 (*Orobanchae 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 לטפיל עלקת באמצעות השימוש בטכנולוגיה CRISPR/Cas9.

מהלך ושיטות עבודה: בשנה זו התמקדנו: בהכנת תבנית שתכיל את שלושת ה-*sgRNAs* מחוברים ביחד באותה תבנית טרנספורמציה, טרנספורמציה לזן העגבנייה T5, סריקה וסלקציה לצמחי T0 טרנסגנים, ריבוי הקווים הטרנסגנים לקבלת צמחי T1 ואנליזה מולקולארית למוטציות בגן המטרה *CCD8* בצמחונים מותמרים ע"י ראקצית חיתוך וריצוף ובדיקת מוטציות לא רצויות (Off-target) בגיונם העגבנייה באמצעות התכנה P-CRISPR. כמו כן נבדקה העמידות של קווי העגבנייה (1, 2, 5, 11) מוטנטים לעלקת שהתקבלו בשנה הראשונה למחקר, בקווים אלו נבדקה גם תכולת הסטריגולקטונים במיצי שורשים בהשוואה לצמחי WT באמצעות LC-MS/MS ובחינת הפרופיל המטבולי הראשוני של הקווים המוטנטים באמצעות HPLC.

תוצאות עיקריות: הוכן קונסטראקט שהכיל את שלושת ה-*sgRNAs* מחוברים ביחד באותה תבנית כאשר *sgRNA1* ממוקם על אקסון 1, *sgRNA2* ממוקם על אקסון 2 ו-*sgRNA3* ממוקם על אקסון 6 במטרה לבצע מוטציות בשלושה אקסונים בגן המטרה *CCD8*. נעשתה טרנספורמציה של התבנית pYLCRISPR:Cas9:sgRNA-1-2-3 לעגבנייה מזן T5 לקבלת המוטנטים. בסריקה עם גן הסלקציה קנאמיצין, התקבלו 9 קווים טרנסגנים בדור T0. הצמחים הטרנסגנים עברו הכלאה עצמית לקבלת דור T1 להמשך העבודה. להוכחת 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 (*BccI* ו-*MvaI* בהתאמה). 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. לבדיקת השפעת התבנית שהכילה שלושה *sgRNAs* על גנום העגבנייה בוצעה סריקה של מוטציות לא רצויות (Off-target). לא התקבלו מוטציות לא מתוכננות בגנום. מופע הצמחים המוטנטים היה שונה מצמחי ה-WT, הצמחים היו נמוכים יותר עם הרבה הסתעפויות של ענפים ובמקרים מסויימים מסת השורשים של הקווים המוטנטים גדלה. התקבלה הפחתה משמעותית בתכולת הסטריגולקטון (אורבנכול) בקווים המוטנטים (1, 2, 5, 11) במיוחד בקו 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 בקו 5 בלבד.

מסקנות והמלצות: התוצאות שהתקבלו בשנה ראשונה, תמכו בהיפותזת המחקר (התקבלו מוטציות שונות). לעומת זאת התבנית שהוכנה בשנת המחקר השנייה אשר הכילה שלושה sgRNAs מחוברים יחדיו לאותה תבנית לקבלת סינרגיזם להפחתה ברמת ההורמון סטריגולקטון, אינה תומכת בהיפותיזת המחקר : לא התקבלו מוטציות בגן המטרה משני ה- sgRNA1 ו- sgRNA3 הממוקמים על אקסון 1 ואקסון 6 בהתאמה. כנראה לא היה שיעתוק של שני ה- sgRNA הנ"ל או שלא הצליחו להתחבר לאנזים Cas9. באותה תבנית שהכילה שלושה sgRNAs התקבלו מוטציות אך ורק מפעילות ה- sgRNA2 ולכן נבחרו עוד שלושה קווים (12, 13 ו- 14) להמשך העבודה. בקווים המוטנטים משנה ראשונה של המחקר (1, 2, 5, 11), תכולת האורבנכול (סטימולנט להנבטת זרעי הטפיל) פחתה משמעותית וכתוצאה התקבלו קווים עמידים לטפיל עלקת במיוחד בקו 5. לא התקבלו מוטציות לא רצויות (Off-target) בגנום העגבנייה. מופע הצמחים המוטנטים היה שונה מצמחי ה- WT (ננסות וריבוי הסתעפויות של ענפים). התקבלה עלייה מובהקת בפרופיל המטבולי הראשוני (חומצות האמינו) של הקווים המוטנטים בהשוואה ל WT במיוחד בעלים. הוכנה התשתית הדרושה להמשך המחקר לפי המטרות שהצבנו.

מבוא

העלקת (*Orobanchae* 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 Repeats (CRISPR/Cas9) 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. ובנוסף לזה, בדור 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 בכוונתנו לערוך שינוי גנטי בגן *CCD8* בזן העגבנייה T5 שישמש ככנה עמידה לעלוקת לזנים מסחריים.

מטרות המחקר: המטרה העיקרית של המחקר היא לפתח כנת עגבנייה עמידה לצמחי עלוקת טפילים באמצעות השימוש בטכנולוגיה CRISPR/Cas9. מטרות המשנה הן: 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. בחינת קווי המוטנטים שיראו עמידות גבוהה לעלוקת מצרית ככנות להרכבה של זני עגבנייה מסחריים ובדיקת עמידותם לעלוקת.

עיקרי הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו לתקופת הדו"ח

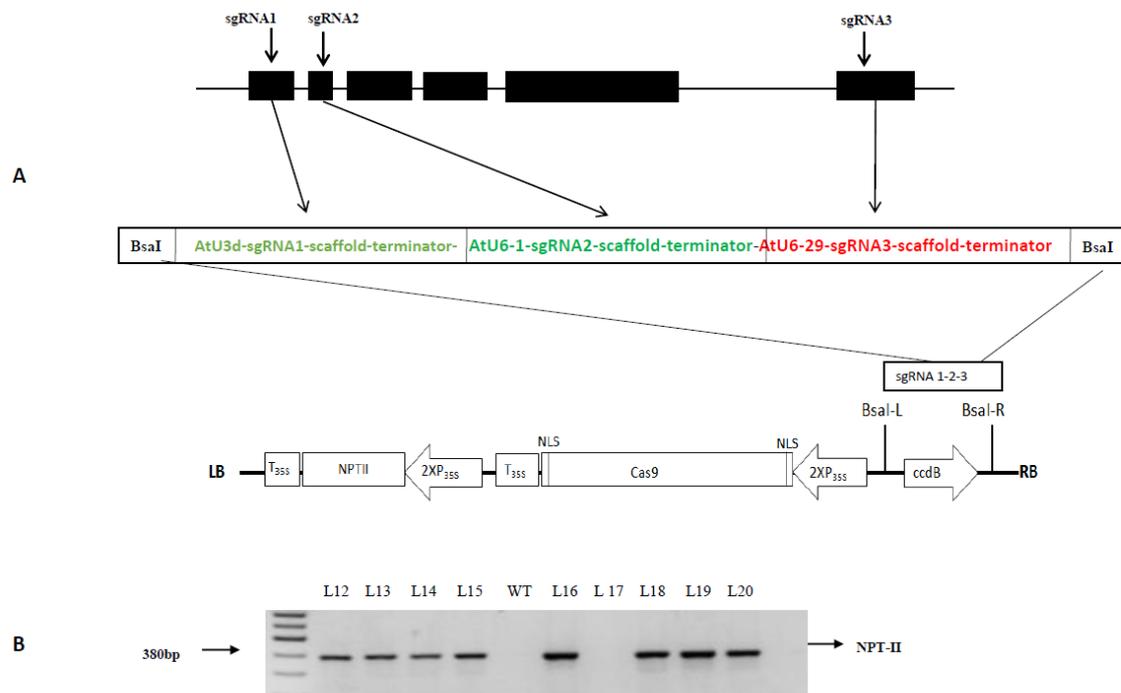
הכנת תבנית גנטית שתכיל את שלושת ה-*sgRNAs* מחוברים ביחד ושיבוט בווקטור - *pYLCRISPR* לקבלת מוטציה בגן המטרה *CCD8*

על רצף הגן: *SICCD8* Solyc08g062950 (JF831532) GenBank accession no. ובאמצעות האתר <http://CRISPRscan.org> תוכננו שלושה *sgRNAs*: (*sgRNA1*, *sgRNA2* *sgRNA3*). לקבלת תבנית שתכיל את שלושת ה-*sgRNAs*, השיבוט נעשה ע"פ (10). נעשה שיבוט של כל *sgRNA* בנפרד לפלסמיד *pYLCRISPR* (9) תחת הבקרה של פרומוטורים שונים: (*Arabidopsis U3d*, *AtU6-1* and *AtU6-29*) באמצעות PCR וליגציות ע"י *T4 DNA ligase* עד לקבלת הפלסמיד *pYLCRISPR:Cas9:sgRNA-1-2-3* (איור 1A). 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 1B) במטרה לבחור רק צמחים טרנסגניים. התקבלו 9 קווים טרנסגניים ואלה נשתלו בעציצים בחממה טרנסגנית לקבלת זרעים של דור T1. בצמחים הטרנסגניים 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).



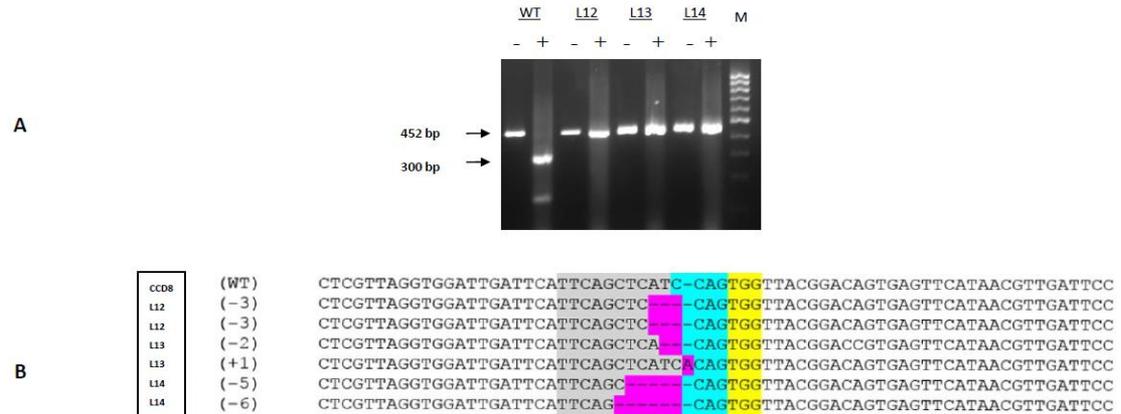
איור 1 : סכימה המתארת את שיבוט שלושת ה- sgRNA בתוך הויקטור *pYLCRISPR* לקבלת מוטציה בגן המטרה *CCD8* וסריקה לקווים טרנסגנים ע"י הגן קנאמיצין

(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 2A). 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 2B), התקבלו מוטציות שונות של חוסרים (deletion) של 3-6 בסיסים או הוספה של אחד ברצף הבסיסים.



איור 2: (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.

אפיון הצמחים המוטנטים בדור T1: הפינוטיפ, בדיקת העמידות לטפיל עלקת, רמת הסטריגולקטון ופרופיל

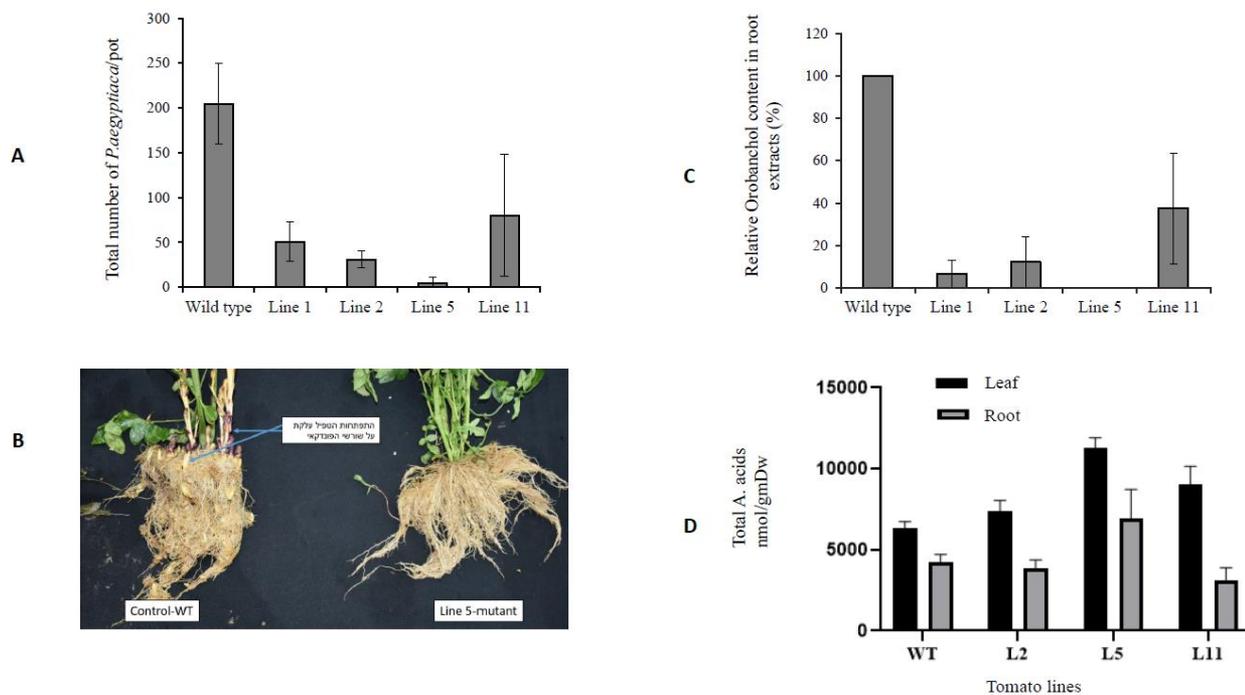
מטבוליטי ראשוני בהשוואה לצמחי הבקורת WT

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 3A). 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: 3B ו- 4 A,B). רמת

הסטריגולקטון (אורבנכול) ירדה באופן מובהק בקווים המוטנטים בהשוואה לרמה בביקורת בתמצית של השורשים (איור 4C). 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 4D). בעלים עלו באופן משמעותי בקווים 5 ו-11, חומצות האמינו המסועפות, פנילאלין, אלנין בעוד שרמת הגלוטמאט ירדה.



איור 3 : מופע הצמחים המוטנטים ובדיקת עמידותם לטפיל עלקת בעציצים בהשוואה לצמחי הביקורת (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 מההדבקה בעלקת בעציצים) בהשוואה לביקורת WT (מסומנים בחץ אדום קצר).



איור 4: בדיקה ואפיון העמידות לעלקת, רמת הסטריגולקטון (אורבנכול) והפרופיל המטבולי הראשוני בקווי עגבנייה מטונטים בהשוואה לביקורת WT. (A), ממוצע מספר העלקות שהתפתחו על קווים מטונטים בהשוואה לביקורת בכל צמח (עציץ). כל עמודה מייצגת ממוצע של 8 חזרות. (B), השוואה בהתפתחות העלקת על הקוו העמיד 5 לעומת הביקורת WT, חצים כחולים מייצגים את העלקות. (C), רמת האורבנכול ב-% בשורשים של קווי עגבנייה מטונטים לעומת הביקורת כאשר כל עמודה מייצגת ממוצע אוסף של שורשים מ-8 דוגמאות. (D), רמת חומצות האמינו הכללית (nmol/gmDw) בעלים ובשורשים בקווים מטונטים בהשוואה לביקורת WT. העמודות מייצגות ממוצעים של דוגמאות משורשים ועלים.

דיון ומסקנות

המטרה העיקרית למחקר היא לפתח כנת עגבנייה עמידה לטפיל עלקת. 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 תומכת בהיפותיזת המחקר כי לא התקבלו מוטציות בגן המטרה משני ה-RNAs guide (ה-sgRNA1 וה-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 וה-sgRNA3). באותה תבנית שהכילה שלושה ה-sgRNAs התקבלו מוטציות אך ורק מפעילות ה-sgRNA2 ולכן נבחרו עוד

שלושה קווים (12, 13 ו-14) (איור 2) 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 טכנולוגיה ה-siRNA (8).

תכולת האורבנכול (סטימולנט להנבטת זרעי הטפיל) פחתה משמעותית וכתוצאה התקבלו קווים עמידים לטפיל עלקת במיוחד בקוו 5. תוצאה זו עונה על מטרת והיפוטזת 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 משמעותית של אורבנכול התקבלה ירידה משמעותית במספר העלקות שהתפתחו על קווים אלה מלבד קוו 11 שהראה רגישות לעלקת למרות המוטציה. יתכן שהסיבה לכך היא החסרה של החומצה האמינית המעגלית Pro-244 האחראית על קיפול ואקטיבציה של החלבון *CCD8*.

בשנה זו נבדקה גם השפעת המוטציות בקווים (L1, L2, L5, L11) על פרופיל המטבוליטים שכלל 15 חומצות אמינו שונות בעלים ושורשים 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 בקוו 5 (איור 4D). בקוו 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.

מסקנות: המוטציות (L1, L2, L5, L11) שהתקבלו כתוצאה מפעילות ה-sgRNA2, תומכות בהיפותיזת המחקר ומטרותיו: 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. תכולת הסטריגולקטון (אורבנכול) ירדה משמעותית בקווים המוטנטים, אך רמת ח. האמינו עלתה משמעותית בעלים. מופע הצמחים המוטנטים היה שונה מצמחי ה-WT, כתוצאה ממוטציות באנזים *CCD8*, אנזים מפתח במסלול יצירת הסטריגולקטון בעגבנייה שהינו אחראי על עיצוב והתפתחות הצמח. הצמחים המוטנטים היו נמוכים יותר עם הרבה הסתעפויות של ענפים ושורשים אדוונטיביים. למרות הפגיעה במופע הצמחים המוטנטים הם הראו עמידות לטפיל עלקת במיוחד בקווים (1, 2 ו-5). לאור התוצאות, הוכנה התשתית הדרושה להמשך המחקר לפי המטרות שהצבנו.

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, Winer 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. Merces, 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).