

דו"ח מסכם לתכנית מחקר מספר 10-0875-256

השריית נינוס וסיעוף בצמחי נוי באמצעים ביוטכנולוגיים ע"מ לחסוך בידיים עובדות במשתלות
Biotechnological induction of dwarfism and branching in pot plants to reduce labor in
nurseries

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י:

צחי ארזי, המחלקה לפרחים וצמחי נוי, המכון למדעי הצמח, מכון וולקני - tarazi@agri.gov.il.
עינת שדות, המחלקה לפרחים וצמחי נוי, המכון למדעי הצמח, מכון וולקני - vhesadot@agri.gov.il.
משה ראובני, המחלקה לפרחים וצמחי נוי, המכון למדעי הצמח, מכון וולקני - vhmoshe@agri.gov.il.
סשה ויינשטיין, המכון למדעי הצמח וגנטיקה בחקלאות, פקולטה לחקלאות, רחובות - vain@agri.huji.ac.il.
דוד וייס, המכון למדעי הצמח וגנטיקה בחקלאות, פקולטה לחקלאות, רחובות - weiss@agri.huji.ac.il.
סתרן, המחלקה לפרחים וצמחי נוי, המכון למדעי הצמח, מכון וולקני - ranstav@agri.gov.il.
אבו-עביד מוחמד, המחלקה לפרחים וצמחי נוי, המכון למדעי הצמח, מכון וולקני - abuabied@agri.gov.il.
אבנור דליה, המחלקה לפרחים וצמחי נוי, המכון למדעי הצמח, מכון וולקני - vhevenor@agri.gov.il.

דצמבר 2015

אדר א תשע"ו

מעריכים מומלצים לבדיקת הדוח המדעי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.
הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

חתימת החוקר

*

רשימת פרסומים

תוכן העניינים:

2	תקציר
3	מבוא
4	מטרות המחקר:
4	פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר:
4	פתוח פרוטוקול לטרנספורמציה של אקליפטוס
5	טרנספורמציה של אקליפטוס עם 35S:GAMT1
6	פיתוח פרוטוקול לטרנספורמציה של אקליפטוס נוי מהזן Moon Lagoone
6	פיתוח פרוטוקול לטרנספורמציה של פרח שעווה
9	איפיון צרופי גן-פרומטור לנינוס וסיעוף:
16	דיון
18	ביבליוגרפיה

תקציר

הצגת הבעיה: נינוס וסיעוף בצמחי נוי בעציצים מושרים במשתלות ע"י טיפולים כימיים או פיזיים הדורשים כח אדם רב. במחקר התמקדנו בפרח שעווה (שוק עציצים בשיא) ואיקליפטוס (שוק עציצים מתפתח) שלהם לא היתה מערכת טרנספורמציה בתחילת המחקר. במקביל, נוצלו צמחי מודל שונים ללימוד השפעות הגנים השונים לנינוס והסתעפות כולל עץ הנוי צפצפה, כמייצג צמחים מעוצים. **מטרת המחקר:** לנצל את התפתחות הידע בנושא בקרת ארכיטקטורת הצימוח בשלוב עם הנדסה גנטית כדי ליצר צמחי עציץ מהונדסים בעלי ארכיטקטורה של עציץ פורח ללא צורך בעיצוב נוסף ובכך לחסוך בכח אדם במשתלות. מטרות המשנה היו, פיתוח פרוטוקול לרגנרציה וטרנספורמציה לאיקליפטוס ופרח שעווה. זיהוי ואפיון צירופי גן – פרומטור המאפשרים נינוס וסיעוף של צמחי המודל חרצית וצפצפה. שימוש בגן ופרומטור שזוהו בסעיף 2 ליצירת צמחי אקליפטוס ופרח שעווה טרנסגנים מנוגסים ומסועפים המתאימים לגידולי עציץ פורח. **שיטות העבודה:** מציאת הליך טרנספורמציה מיטבי תוך שימוש בגן מדווח באקליפטוס ופרח שעווה. במקביל, ביצענו טרנספורמציה של צמחי מודל עם צרופי גן-פרומטור חדשים ובחנו את המופע שלהם למציאת צרוף מצטיין המשרה נינוס וסיעוף. **תוצאות עיקריות:** איפיון מספר רב של צרופי פרומטור: גן המשרים נינוס וסיעוף בצמחי מודל. איפיון זה הוביל לזיהוי של מספר צרופים המשרים נינוס, סיעוף או שניהם. הצרוף המצטיין היה 35S:GAMT1 שהשרה נינוס וסיעוף בצמחי מודל ובעץ צפצפה וכן מנע הזדקנות. הצלחנו לבסס פרוטוקולים לטרנספורמציה של אקליפטוס גראנדיס, לסריקה של צמחי אקליפטוס טרנסגנים, וכן כוילנו השרשה של פרח שעווה בתרבית ופיתחנו פרוטוקול לטרנספורמציה של פרח שעווה עם הצלחה חלקית. תוך שימוש בפרוטוקול שפיתחנו הצלחנו להתמיר בהצלחה צמחי אקליפטוס בטרנסגן 35S:GAMT1 ואנו ממתינים לאיפיונם **המלצות:** אין.

מבוא

ענף צמחי הנוי בעציצים ליצוא הצליח בשנים האחרונות לשמור על רווחיות למרות כל המשברים. במשתלות הגדולות מדובר בייצור של מאות אלפי עד שני מיליון עציצים לייצוא בשנה. אבל אליה וקוץ בה, המשקים העוסקים בשתלנות של צמחי נוי מעסיקים מספר גבוה יחסית של פועלים שחלק ניכר מזמנם מושקע בטיפול עיצוב הצמח שכוללים גיזום לשם עידוד סיעוף וריסוסים לנינוס. שני צמחי נוי מעוצים השייכים למשפחת ההדסיים (Myrtaceae) ומשמשים לעיצוב עציצים ליצוא הינם פרח שעווה (*Chamelaucium uncinatum*) ואקליפטוס (*Eucalyptus*). פרח שעווה הוא שיח מעוצה רב שנתי נושא ענפים פורחים הגדל באופן טבעי במערב אוסטרליה ומשמש כגידול לענפי קישוט ועציצים פורחים. ישראל היא היצואנית העיקרית של פרח השעווה לאירופה בחורף וכיום מיוצאים סדר גודל של כ- 250,000 עציצים פורחים כאשר הפדיון לכל עציץ כ- 3 יורו בממוצע. הסוג איקליפטוס כולל כ-700 מיני עצים שמוצאם בעיקר מאוסטרליה. בארץ כבר מגדלים כמה מינים לענפי קטיפה בעיקר לשוק מקומי (היקף של כ-500 דונם) וכמו כן קיים ייצור התחלתי ומבטיח של עציצים בהיקף יצוא של כ- 10,000 עציצים לשנה בעיקר של הזנים סילבר דולר, ביבי בלו וגוני. ההורמונים ג'יברלין וציטוקינין מעורבים במגוון תהליכי התפתחות במהלך חיי הצמח. להורמונים אלה תפקיד מרכזי בקביעת הארכיטקטורה של הצמח. ציטוקינין מעורב בעיקר בעידוד הסתעפות הצמח ע"י עידוד חלוקת התאים במריסטמות הצדדיות וכך עידוד התפתחות הניצנים הלטרנלים ליצירת ענפים צדדיים. ג'יברלין, אשר פועל במקרים רבים כאנטגוניסט לציטוקינין ומעודד שלטון קודקודי, מעכב התפתחות הענפים הצדדיים ופועל לעידוד התארכות ענפי הצמח [1]. מכאן שאם ברצוננו לקבל צמח מנונס ומסועף, יש לעכב את יצור או פעולת הג'יברלין ולעודד את יצירתו או פעילותו של ציטוקינין. בשנים האחרונות חלה התפתחות רבה בהבנת מנגנון הפעולה של גנים רבים המעורבים בייצור שני ההורמונים, פירוקם, נטרול פעולתם ע"י מודיפיקציות מולקולאריות, מעבר הסיגנל שלהם והשפעתם על ארכיטקטורת הצמח. השלבים הראשונים של המסלול לסינטזה של גיברלין, מ- *transgeranylgeranyl* diphosphate עד *GA12-aldehyde*, משותפים לכל המינים. השלבים האחרונים ליצירת ג'יברלינים פעילים ספציפיים לכל מין אך ברוב המקרים GA_{12} הופך לצורה הפעילה של ג'יברלין, GA_4 , ע"י פעולתם של האנזימים *GA20-oxidase* (GA_{20ox}) האחראי לחמצון C-20 על GA_{12} ו- *GA3-oxidase* (GA_{3ox}) אשר אחראי לחמצון C-3 על GA_{12} . לעומת זאת, האנזים *GA2-oxidase* (GA_{2ox}) מבצע דה-אקטיבציה של המולקולות ומביא ליצירת ג'יברלינים בלתי פעילים. הרמה האנדוגנית של ג'יברלינים פעילים נשלטת ע"י בקרת היזון חוזר, כאשר ג'יברלינים פעילים מעכבים את ביטוי הגנים GA_{20ox} ו- GA_{3ox} ומעודדים את ביטוי הגן GA_{2ox} וכך למעשה מורידים את רמת הג'יברלין הפעיל ברקמה [2]. כמו כן נמצא על ידנו שרמת הג'יברלין בצמח מבוקרת גם ע"י מתילציה של הג'יברלין הפעיל ליצירת ג'יברלין מתיל אסתר בלתי פעיל. ראקציה זו מבוקרת ע"י האנזים *GA methyl transferase* (*GAMT*) [3]. ביטוי ביתר של גן זה הביא לנינוס במספר צמחים. מסלול מעבר סיגנל ציטוקינין מתחיל בקישור ההורמון לרצפטור ממברנלי מסוג *histidine kinase* בארבידופסיס (*AHK*). בעקבות הקשור להורמון עובר הרצפטור זירחון עצמי, והזרחון מועבר לחלבוני His-

AHP Phosphotransfer), אשר נעים בין הציטוזול לגרעין. החלבון AHP המזורחן מעבר בגרעין את הזרחן לחלבוני שעתוק מסוג type-B ARR ואלו מפעילים את התגובות לציטוקינין [4].

מטרות המחקר:

המטרה הסופית של המחקר היתה ליצר צמחי עציץ מהונדסים בעלי ארכיטקטורה של עציץ פורח ללא צורך בעיצוב נוסף ובכך לחסוך בכח אדם במשתלות. במחקר התמקדנו בפרח שעווה (שוק עציצים בשיא) ואיקליפטוס (שוק עציצים מתפתח) שלהם לא היתה מערכת טרנספורמציה בתחילת המחקר. במקביל, נוצלו צמחי מודל ללימוד השפעות הגנים השונים לנינוס והסתעפות. צמחים אלה כללו את צמח הנוי החשוב חרצית כמייצגת צמחים עשבוניים ואת עץ הנוי צפצפה, כמייצג צמחים מעוצים. לאור זאת מטרות המשנה של הפרויקט הן:

1. פיתוח פרוטוקול לרגנרציה וטרנספורמציה לאיקליפטוס ופרח שעווה.
2. זיהוי ואפיון צירופי גן – פרומוטר המאפשרים נינוס וסיעוף של צמחי המודל חרצית וצפצפה.
3. שימוש בגן ופרומוטר שזוהו בסעיף 2 ליצירת צמחי אקליפטוס ופרח שעווה טרנסגנים מנונסיים ומסועפים המתאימים לגידולי עציץ פורח.

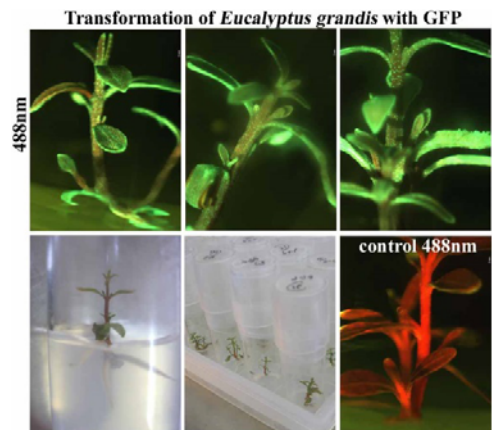
פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר:

פתוח פרוטוקול לטרנספורמציה של אקליפטוס

מכיוון שטרנספורמציה של אקליפטוס גראנדיס כבר הודגמה בעבר [5], רצינו בשלב ראשון לשחזרה במעבדתנו ולאחר מכן לבחון את התאמתה הפרוטוקול לזני אקליפטוס נוי המתאימים לעיצוץ. נסיונות אלו נמשכו כשנתיים עד להגעה לפרוטוקול מוצלח. בקצרה, זרעים של אקליפטוס גרנדיס נאספו בחלקת יער משקי של דר' רקובר ממושב גדיש. הזרעים נוקו חוטאו ב- 1% אקונומיקה ונזרעו באופן סטרילי על מצע MS. בהתחלה גודלו הנבטים הצעירים הועברו למבחנות סטריליות ובעת הופעת כשמונה עלים צעירים, העלים נותקו מהצמחונים ובהם השתמשנו לטרנספורמציה. התוצאות לא היו משביעות רצון ולכן התחלנו לעבוד עם פסיגים והיפוקוטיל של נבטים בני שבועיים. אלו הופרדו זה מזה והונחו למשך שבוע על מצע woody plant medium הכולל BA ו- 2,4,D. לאחר מכן נטבלו בתמיסת חידקי אגרובקטריום מזן EHA105 שהכילו פלסמיד בינארי pART27 המבטא GFP תחת הפרומוטר הקונסטיטטיבי החזק 35S, זאת כדי שנוכל לעקוב אחרי תאים המבטאים את הגן המדווח במהלך הסלקציה והרגנרציה. הפסיגים וההיפוקוטילים המודבקים בתרבית החידקים הונחו על צלחות כנ"ל למשך שבוע בחושך. לאחר שבוע הועברו העלים לצלחות עם מצע שהכיל הורמונים (TDZ, NAA) מעכבי חימצון (PVP, ascorbate, cysteine), פוליאמין (putresine) ושתי אנטיביוטיקות, קנמיצין לסלקציה של תאים טרנספורמנטים וכלופורן על מנת להיפתר מחידקי האגרובקטריום. בהמשך הועברו מקטעי הצמחים לצלחות טריות אחת לשבועיים. כעבור כשבועיים שלושה התחיל להיווצר קאלוס באיזורי החתך ובצמחים שעברו טרנספורמציה נראה בו ביטוי של GFP אך היעילות הייתה נמוכה. בשנה השלישית חזרנו על התהליך והפעם

הנבטים הצעירים נחתכו בשלב של שני פסיגים כמתואר במאמר [6]. נאספו שני חלקים, היפוקוטיל ומקטע היפוקוטיל קצר ביחד עם שני הפסיגים. המקטעים הונחו על מצע רגנרציה של נצרונים שהכיל קומבינציות שונות של זיאטין ו NAA. המקטעים שהראו יכולות רגנרציה טובות ביותר, שנמדדו ביכולת ייצור נצרונים רבים נבחרו לטרנספורמציה בפרוטוקול המצויין לעיל. ראוי לציין שכ- 80% מהמקטעים שהודבקו החלו לפתח קאלוס זוהר. הקאלוס המשיך להתפתח ולאחר כ 3 חודשים החלו להתמייין על גביו צמחונים בעלי ביטוי GFP. הצמחונים נחתכו והושרשו בנוכחות IBA. בסה"כ התקבלו כ 30 צמחונים טרנסגנים מושרשים (איור 1). הזהירה בכל חלקי הצמח מעידה שכנראה לא מדובר בכימרה אלא בביטוי טרנסגן יציב.

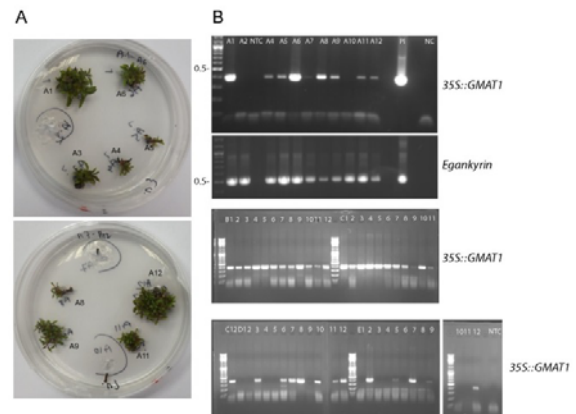
איור 1. צמחוני איקליפטוס גרנדיס טרנסגנים המבטאים GFP. שורה עליונה: שלושה צמחונים טרנסגנים מוארים באור כחול, באורך גל 488 נ"מ. הצבע הירוק מראה על זהירת GFP. שורה שניה מימין: צמחון ביקורת מואר באור כחול, הזהירה האדומה מראה פלואורסנציה עצמית של הכלורופיל. זהירה זו ממוסכת ע"י הזהירה החזקה של ה GFP בצמחים הטרנסגנים. שורה שניה אמצע ושמאל: הצמחונים הטרנסגנים המושרשים.



טרנספורמציה של אקליפטוס עם 35S:GAMT1

במסגרת הפרויקט אופיינו צרוף גן-פרומוטר מצטיין (35S:GAMT1) המשרה נינוס וסיעוף בצמחי מודל ובעץ צפצפה (ראה בהמשך) ולכן מתאים להתמרה של אקליפטוס ופרח שעווה. לאור הצלחתנו בכיול פרוטוקול התמרה לאקליפטוס וזיהוי טרנסגן מננס, בשנה הרביעית והחמישית השתמשנו בפרוטוקול הטרנספורמציה המשופר על מנת להחדיר את 35S:GAMT1 לאקליפטוס גרנדיס. מקטעי היפוקוטיל נטבלו בתמיסת חידיקי אגרובקטריום מזן GV3101 שהכילו את הפלסמיד הבינארי pPZP212-35S:GAMT1 המבטא GAMT1 תחת הפרומוטר הקונסטיטוטיבי החזק 35S. המקטעים המודבקים בתרבית החידיקים עברו רגנרציה בנוכחות קאנאמיצין. רגנרציה זו נמשכה כ- 8 חודשים בקרוב. לאחר התמיינות הצמחונים נבדקה נוכחות הטרנסגן בעזרת פרוטוקול PCR שהותאם לבדיקת עצים [6] ונעשה על מיצוי עלים. כבקורת ליעילות המיצוי בוצע במקביל על כל דוגמא PCR לגן האנדוגני של האקליפטוס EgANKRIN. בסה"כ התקבלו כ- 42 צמחונים טרנסגנים מתוך 59 צמחונים רגנרנטים שנבחנו (יעילות של 71%, איור 2). בהמשך הושרשו הצמחונים. לצערנו במהלך השרשת הצמחונים בתרבית הזדהמו התרביות כתוצאה מחילופי סטודנטים בפרויקט. מיד לאחר מכן חודש תהליך הטרנספורמציות לאיקליפטוס גרנדיס נאספו זרעים, הונבטו, עברו ריבוי בתרבית והודבקו בתרבית אגרובקטריום. התרביות כיום בשלב הקאלוס המתפתח על אנטיביוטיקה.

איור 2. צמחוני איקליפטוס גרנדיס טרנסגנים לקונסטרוקט מנס. A. צמחוני איקליפטוס טרנסגנים *35S:GAMT1* הגדלים על מצע סלקציה לפני העברה למצע השרשה. B. PCR של דנ"א גנומי לבחינת נוכחות הטרנסגן *35S:GAMT1*. הראקציה בוצעה על מיצוי עלים של צמחונים כדוגמת הצמחונים (A1-A12) המתוארים ב-A. *35S:GAMT1* – PCR בעזרת זוג פריימרים ששימשו לזיהוי הטרנסגן. *EgANKRIN* – PCR בעזרת פריימרים לזיהוי גן אנדוגני של איקליפטוס (*EgANKRIN*) (מוצג רק לפנל העליון). NTC – מים; PI – הפלסמיד הבינארי ששימש לטרנספורמציה; NC – בקורת שלילית של צמחון שלא הודבק על ידי אגרו. המספרים מציינים את מספר הצמחון שנבדק.



פיתוח פרוטוקול לטרנספורמציה של איקליפטוס נוי מהזן Moon Lagoon

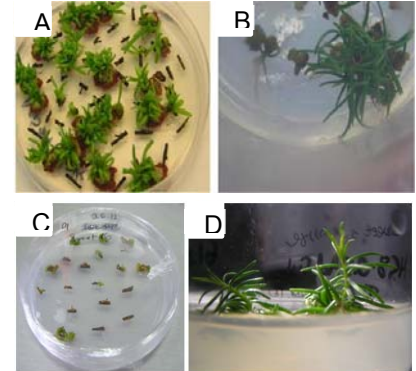
במקביל לשחזור פרוטוקול הטרנספורמציה של איקליפטוס גראנדיס המשכנו בניסיונות לפתח פרוטוקול לטרנספורמציה של איקליפטוס נוי מהזן Moon Lagoon המשמש בהכנת עציצי נוי. בשנה הראשונה מצאנו צמחוני איקליפטוס השתרשו ללא בעיות ברגע שהגיעו לגודל גדול מ-4 סנטימטר ושגודל זה הכרחי להשתרשות. על מנת לבחון האם ניתן יהיה להקשיח צמחונים אלו בדרך לקבלת צמח בוגר. צמחונים מושרשים של איקליפטוס הועברו להקשחה במספר מצעי עציץ בתערובות שונות של כבול, ורמיקוליט וקוקוס אך ההקשחה לא צלחה וכל הצמחונים המושרשים מתו. לאור זאת, שערנו כי המצעים ששימשו להקשחה מכילים חומרים אשר מזיקים לצמחוני האייליפטוס העדינים ולא מאפשרים את התפתחותם. השערה זו התבררה כמדויקת מכיוון שכאשר העברנו צמחונים מושרשים למצע של ורמיקוליט נקי ללא תוספות תחת התזה יומית במתקן הריבוי במחלקה לפרחים, נקלטו אלו והתפתחו לצמחי איקליפטוס מוקשחים. לאחר השהות בורמיקוליט הועברו הצמחים למצע גן רגיל בעציצים. צמחונים אלו רובו והוכנסו לתרבות. למרות נסיונות חוזרים ונשנים במשך שנות הפרויקט לא מצאנו תנאים אשר מאפשרים רגנרציה של צמחונים מקאלוס ולכן פיתוח פרוטוקול מלא לטרנספורמציה של זן זה לא צלח.

פיתוח פרוטוקול לטרנספורמציה של פרח שעווה

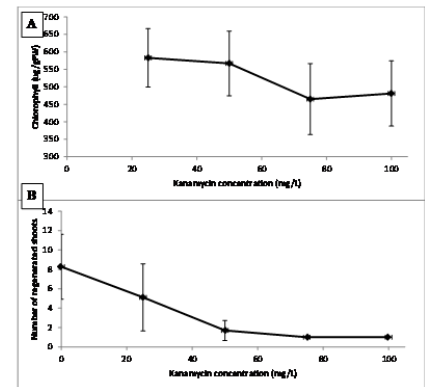
על מנת לייצר חומר מוצא לטרנספורמציה של פרח שעווה, בתחילה כייילנו את הפרוטוקול המתאים לריבוי בתרבות של שני זני פרח שעווה Ivory pearl ו-Sweet 16. בקצרה, ענפים מהזנים הנ"ל נקטפו בשדה והופשטו מהעלים. לאחר מכן מקטעי ענפים ללא עלים עברו חיטוי בסבון, פונגצידים אתנול ואקונומיקה בכדי לחטאם. הריבוי נעשה על מצע בסיסי (MS) בתוספת, 3% סוכרוז ו 8 גרם/לליטר אגר. אנו מצאנו שהמצע המתאים ביותר לריבוי הינו מצע שמכיל DPG או AdSul בריכוז 0.5 µg/L (איור 3). בשלב הבא נבדקה תגובת הצמחונים לאנטיביוטיקה Kanamycin על מנת לזהות את הריכוז האופטימאלי של האנטיביוטיקה שיאפשר ביצוע סלקציה לצמחים הטרנספורמנטים. תוצאות בדיקה זו מראות כי ריכוז אנטיביוטיקה מעל 75 mg/L גורם להלבנה של

העלים ולאובדן כלורופיל ומוות (איור 4A) ואילו ריכוז אנטיביוטיקה של 50 mg/L מספיק על מנת לעצור את ריבוי צמחוני פרח השעווה אך לא גורם למוות מידי של הצמחונים (איור 4B).

איור 3. ריבוי צמחוני פרח שעווה Ivory Pearl (A-B) ו- Sweet16 (C-D) בתרבית.



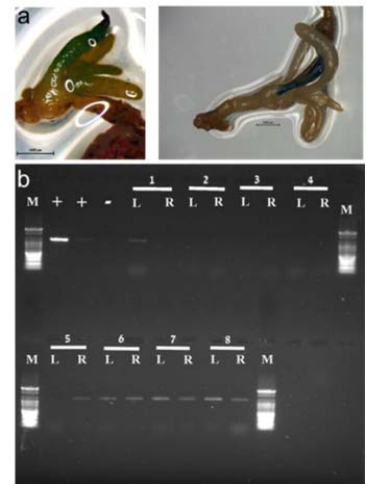
איור 4. תגובה של צמחוני פרח שעווה לריכוזים שונים של Kanamycin. A: ירידה בכמות הכלורופיל עם העלייה בריכוז של Kanamycin. B: ירידה בקצב הריבוי של צמחוני פרח השעווה לעלייה בריכוז של Kanamycin במצע הריבוי.



לאחר מכן בדקנו את יכולתם של צמחוני השעווה בתרבית לעבור טרנספורמציה על ידי אינקובציה בנוכחות אגרובקטיום מזן EHA105 המכיל פלסמיד בינארי pME504 המבטא את הגן GUS כסמן. סה"ע הודגרו בנוכחות החיידק כ- 500 צמחונים סטריליים מתרבית, אך כולם מתו גם בהדגרה קצרה של מספר דקות כנראה בגלל האופי האלים של חיידק אגרו זה. לכן בוצעו מספר נסיונות טרנספורמציה של צמחונים מהזן Ivory perl על ידי זן אגרו פחות אלים (GV3101). כדי להתמיר פרח שעווה, מקטעי עלים מצמחונים שגודלו באופן סטרילי הודגרו עם אגרו בקטריום מהזן GV3101 המכיל את הפלסמיד הבינארי pART-27-35S:YFP המבטא את הגן המדווח YFP באופן קונסטיטטיבי. לאחר ההדגרה, העלים המודבקים הונחו על מצע סלקציה הכולל קנאמיצין בריכוז של 25 mg/liter וכלפורן. כל שלושה שבועות העלים הועברו למצע טרי. לאחר חודשיים התפתחו צמחונים שעברו רגנרציה בנוכחות האנטיביוטיקה. בהגיעם לגודל של 1 ס"מ כל צמחון עמיד הועבר לצנצנת וכדי לוודא האם בוצעה התמרה של הצמחונים העמידים לאנטיביוטיקה והם מכילים את הטרנסגן 35S:YFP, בוצע PCR על הדנ"א הגנומי שלהם לזיהוי הטרנסגן. אנליזה זו הראתה כי מתוך 15 הצמחונים שנבדקו, שישה הכילו את המקטע המצופה של YFP אך להפתעתנו צמחונים אלו לא הראו פלורסנציה משמעותית במיקרוסקופ ומכאן ייתכן או שלא בטאו את הטרנסגן או שמייצגים צמחים כימרים ולא טרנספורמנטים אמיתיים. לפיכך חזרנו לבצע טרנספורמציה על ידי אגרובקטריום מהזן EHA105. התברר שהוספת חלק מהעלה לגבעולים שהודבקו באגרו

מקטינה בצורה משמעותית את מות החומר הצמחי לאחר האינקובציה עם החיידק. בנוסף, קיבלנו רגנרציה וקאלוס אמבריוני מקצוות העלים. לכן ביצענו מספר נסיונות טרנספורמציה של צמחונים מהזן Ivory perl על ידי אגרו מהזן EHA105 המכיל פלסמידה בינארי pME504 לביטוי הגן GUS. מצאנו שבשיטה החדשה ישנו אחוז גדול יחסית ($55\pm 6\%$) של צמחונים אשר ביטאו את הגן הטרנסגני *GUS* (צבע כחול באיור 4a). מכיוון שהביטוי זוהה לאחר זמן ממושך של מספר שבועות קרי 3-4 העברות על מצע המכיל קנמיצין, אנו מניחים שהאזורים הכחולים מייצגים רקמה טרנסגנית שהותמרה באופן יציב אך שוב רק חלק מהצמחון הותמר ולא כולו. אנליזה של צמחים מבטאי GUS החשודים כטרנסגנים (איור 4b) איששה את חששנו כי קיימים צמחים כימריים (צמחים 1 ו-5) אבל גם זיהתה צמחים שייטכן ומייצגים טרנסגנים מלאים (צמחים 6,7,8).

האנטיביוטיקה קנמיצין. צמחונים הוצאו ממצעם והועברו לצביעת GUS על מנת לזהות את התאים המבטאים את הטרנסגן (צבע כחול). לאחר מכן הרקמה הובהרה בעזרת אתנול, קובעה וצולמה. (b) אנליזת PCR של צמחי שעווה החשודים כטרנסגניים. משמונה צמחים הגדלים על מצע סלקציה נלקחו עלים משני צדי הגבעול מסומנים כ R ו L דנ"א גנומי הופק מעלים אלו וראקציית PCR בוצעה על תחילים של הגן GUS. (+) מסמן בקורת חיובית של פלסמיד (-) מסמן ביקורת שלילית של דנ"א מצמח שעווה לא טרנסגני ו 1-8 מסמנים את שמונת הצמחים שגדלו על מצע סלקציה (KAN). בכל צמח יש שני דוגמאות לשני צדי הצמחון. צמחונים 2,3,4 לא הראו את נוכחות הגן GUS, צמחים 1 ו 5 הראו כימריזם, כלומר הגן GUS היה רק בחלק של הצמח ואילו צמחים 6,7,8 הראו נוכחות הגן בשני הצדדים של הצמחון.



איור 2. נסיון התמרה של פרח שעווה מהזן Ivory perl עם הצרוף *35S:GUS*. (a) אנליזת GUS לצמחוני שעווה החשודים כטרנסגנים. הצמחונים עברו רגנרציה בנוכחות

במקביל לנסיונות הטרנספורמציה, כוילו תנאי ההשרשה של צמחוני שעווה בתרבית. לשם כך השרשה בשעווה Ivory Pearl נבחנה בארבעה מצעים השונים בריכוז ה- IBA, ריכוז המלחים העיקריים והמשניים כלומר MS וכמות הסוכר (טבלה 1). להשתרשות נלקחו ענפים בודדים שנותקו מנקודת ההסתעפות שלהם. הענפים נלקחו באורך של כ 1-3 ס"מ ונשתלו באגר (0.75%) בנוכחות המצע לפי ההרכב בטבלה 1. בכל המצעים הייתה השתרשות של הענפים אבל במצע עם 0.5 מ"ג לליטר IBA ו- 0.5 MS הייתה ההשתרשות הטובה ביותר והמהירה ביותר. כמו כן בדקנו גם אם יש הבדל בין ענפים מצמח שהיה הרבה זמן בתרבית לצמח שמעט זמן בתרבית והתברר שענפים מהראשון (בתרבית מספר חודשים) משתרשים יותר מהר. נסיונות אלו הובילו לזיהוי התנאים האופטימליים להשתרשות של צמחוני פרח השעווה בתרבית (איור 5).

איור 5 . צמחונים של פרח שעווה משתרשים במגנטה (ימין), צילום מלמטה) ולאחר הוצאתם (שמאל).



איפיון צרופי גן-פרומוטור לנינוס וסיעוף:

במסגרת המחקר יוצרו קונסטרוקטים לביטוי גנים המעורבים בייצור, ניטרול, מעבר סיגנל ותגובה להורמונים ג'יברלין ציטוקינין ונבחנו ליכולתם לננס ולסעף צמחים על ידי החדרתם לצמחי מודל "פשוטים" יחסית כמו ארבידופסיס ועגבנייה ובמקביל לצמחי המודל "המסובכים" יותר חרצית וצפצפה. צירופי פרומוטור:גן שנבחנו במהלך המחקר והצמחים שבהם הם נבחנו מסוכמים בטבלה 1.

טבלה 1 – צרופי גן פרומוטור שנבדקו בצמחי מודל להשפעתם על נינוס וסיעוף.

שם הגן	הפרומוטור	מסלול הפעולה	מנגנון פעולה	צמח המודל הנבדק
GAMT	35S	ג'יברלין	ניטרול מוגבר	עגבנייה, צפצפה, חרצית
RGA-Δ17	35S	ג'יברלין	עיכוב סיגנל	עגבנייה, צפצפה
IPT	CRC	ציטוקינין	ייצור מוגבר	ארבידופסיס
IPT	CUC2	ציטוקינין	ייצור מוגבר	ארבידופסיס
IPT	AS1	ציטוקינין	ייצור מוגבר	ארבידופסיס
TCP14	FIL	ציטוקינין	תגובה מוגברת	עגבנייה
TCP15	FIL	ציטוקינין	תגובה מוגברת	עגבנייה
TCP14	AS1	ציטוקינין	תגובה מוגברת	עגבנייה, צפצפה
TCP15	AS1	ציטוקינין	תגובה מוגברת	עגבנייה
ΔPRO	35S	ג'יברלין	עיכוב סיגנל	עגבנייה
ΔPRO	FIL	ג'יברלין	עיכוב סיגנל	עגבנייה
GID1A*	-	ג'יברלין	עיכוב סיגנל	עגבנייה
GID1B*	-	ג'יברלין	עיכוב סיגנל	עגבנייה
GID1C*	-	ג'יברלין	עיכוב סיגנל	עגבנייה

* השתקה באמצעות CRISPR-Cas9

GAMT - צמחי עגבניה שביטאו גן זה תחת הפרומוטור הקונסטרוטיבי 35S הראו דרגות שונות של נינוס וסיעוף (קוים טרנסגנים שונים) וזאת מבלי לפגוע בצורה הכללית של הצמח. מצאנו כי ביטוי הטרנסגן היה בקורלציה לחומרת הפנוטיפ ורמת הביטוי היא שקבעה את רמת הנינוס והסיעוף של הצמח (איור 6).

איור 6. רמת ביטוי הגן *GAMT1* קובעת את רמת הנינוס וסיעוף הצמחים הטרנסגנים. (a) צמחי עגבנייה ביקורת M82 ושלושה קווים טרנסגנים המבטאים את הגן *GAMT1* תחת בקרת הפרומטר 35S. (b) העלים של אותם צמחים. (c) ביטוי הטרנסגן *GAMT1* בצמחים השונים. הערכים (אנליזת qRT-PCR) הינם ממוצע של שלוש חזרות ביולוגיות.

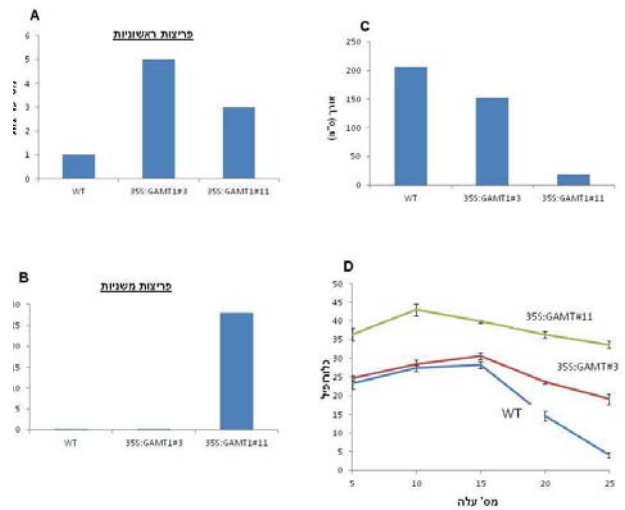


כיוון שביטוי ביתר של הגן *GAMT* הביא למופע הרצוי, בצענו טרנספורמציה שלו לצמחי חרצית וצפצפה. הקונסטראקט *35S:GAMT* בפלסמיד בינארי הוחדר לחיידק אגרובקטריום מזן AGLO אשר שימש להדבקת מקטעי גבעול עשבונים מצמחים צעירים של צמחי צפצפה *Populus tremula*. המקטעים המודבקים הושמו על מצע רגנרציה. נצרים שהתפתחו עברו סלקציה על מצע רגנרציה שהכיל אנטיביוטיקה. הנצרים המותמרים עברו למצע השרשה המכיל את האנטיביוטיקה kanamycin והצמחונים שהתקבלו במבחנה, הועברו לעציצים לגידול בתנאי טמפרטורה מתונה ועוצמת אור נמוכה יחסית להקשחה. לאחר מכן העציצים הועברו לחממה המיועדת לצמחים טרנסגנים. התקבלו קווים טרנסגנים רבים שמתוכם בחרנו מספר קווים אשר הראו רמות שונות של פנוטיפ להמשך הלימוד. כפי שניתן לראות באיור 7, הצמחים הטרנסגנים שגודלו בעציצים הראו דרגות שונות של נינוס וסיעוף. לדעתנו, מופע הביניים (קו 3), הוא המופע הרצוי שאותו אנו מחפשים בעבודה זו. צמחי קו זה היו מעוכבי התארכות, אך הראו התארכות המתאימה לצמחי עציץ (בשונה מצמחי קו 11 שהיו מנונסים מדי). בנוסף לנינוס, צמחים אלה היו מסועפים בהשוואה לצמחי הביקורת ועתירי כלורופיל (איור 8). כלומר התקבל המופע הרצוי לצמחי עציץ ללא טיפול בכימיקלים וללא קיטום הצמח. תוצאה זו מצביעה כמובן על הקונסטראקט *35S:GAMT* כמתאים ביותר להשגת מטרות המיזם ולכן זהו הקונסטראקט הראשון שנבחר להתמרה של צמחי אקליפטוס ופרח שעווה (ראה למעלה). הקונסטראקט *35S:GAMT* הוחדר גם לצמחי חרצית מהזן *Reflection pink*. הטרנספורמציה נערכה למקטעי עלים צעירים תוך שימוש באגרובקטריום AGLO. הסלקציה נערכה על מצע רגנרציה עם האנטיביוטיקה kanamycin. למרות שהתפתחו נצרים מרקמת הקאלוס, הצמחונים לא הצליחו להתפתח ונשארו כגוש צפוף של צימוח אשר לאחר זמן מה איבד את הכלורופיל והתנוון. חזרנו על הטרנספורמציה וגם בניסיון השני התקבלו צמחונים עמידים לאנטיביוטיקה אשר לא התפתחו. עדיין לא ברורה לנו הסיבה לחוסר הצלחה זה. יתכן שצמח החרצית רגיש במיוחד לפעילות החלבון *GAMT*.

איור 7. צמחי צפצפה טרנסגנים בני 18 חודשים המבטאים ביתר את הגן *GAMT1*. ניתן לראות שהטרנסגן מנס את הצמח, מגביר את סיעופו ומעכב את הזדקנות העלווה.



איור 8. ביטוי ביתר של הגן *GAMT1* בצפצפה מעודד סיעוף (A ו-B), מעכב התארכות (בגרף אורך הענף המרכזי) (C) ומעלה את ריכוז הכלורופיל בעלים (D).



RGAD17 הוא חלבון בקרה גרעיני מקבוצת ה- DELLA המעורב בעיכוב סיגנל הג'יברלין בארבידופסיס אשר מתפרק בתגובה לעליה ברמת ההורמון ג'יברלין. אנו השתמשנו במוטנט של הגן אשר חסר את אתר ה- DELLA ולכן יציב ופעיל תמידית. כל הניסיונות לקבל צמחי צפצפה טרנסגנים עם קונסטראקט זה (35S:RGAD17) נכשלו. הצימחונים הטרנסגנים מתו מיד לאחר התמיינותם. בעגבניה בניגוד לזאת הצמחים הטרנסגנים

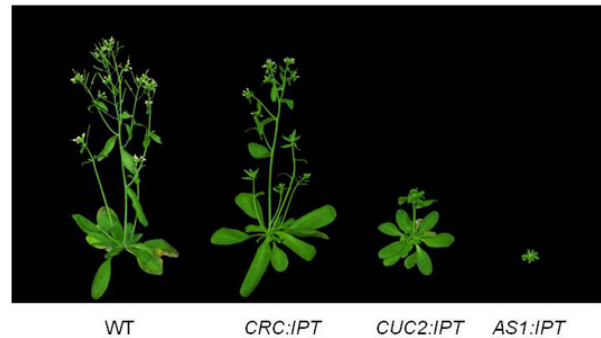
המבטאים את אותו הגן התפתחו יפה. הטרנסגן בדומה ל- *35S:GAMT* גרם לנינוס וסיעוף מוגבר של הצמח. הגן המוטנט גרם גם לאיחור פריחה חזק. ממעקב אחר צמחים הטרנזיגוטים והומוזיגוטים לטרנסגן, התקבל הרושם שרמת הנינוס והסיעוף בצמח ההטרנזיגוט מתאימה לעיצוב של צמחי עציץ (איור 9). במצב ההומוזיגוטי, השפעת הטרנסגן חזקה מידי.

איור 9. צמחי עגבנייה טרנסגנים המבטאים ביתר (35S) את גן ה- *RGAΔ17* המוטנט (מוטנט gain of function). בתמונה צמחים צעירים של צמח הביקורת (M82), צמחים טרנסגנים הטרנזיגוטים לטרנסגן ($\Delta RGA+/-$) והומוזיגוטים ($\Delta RGA+/+$).



-IPT הגן המקודד לאנזים מפתח בייצור ציטוקינין הוחדר לצמחי ארבידופסיס תחת בקרת פרומוטורים שונים הפועלים במריסטמות לטרליות בשלבים שונים וכן פרומוטר ספציפי לפרח. הגברת ייצור ציטוקינין בעלה שחלה לא השפיע על התפתחות הצמח וגרם לשינוי מבנה השחלה כולל יצירת טריכומות רבות על גבי איבר זה (איור 11). ביטוי הגן *IPT* תחת הפרומוטר *AS1* הפועל בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרימורדיות גרם לנינוס חזק מאוד של הצמח. ביטוי הגן תחת בקרת הפרומוטר *CUC2* הפועל בשלב מאוחר יותר מ- *AS1* הביא לנינוס ויצירת תפרחות צדדיות רבות.

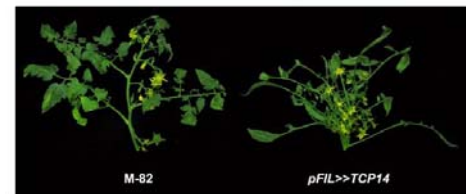
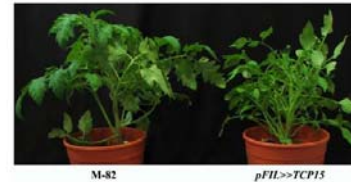
איור 10. צמחי ארבידופסיס טרנסגנים המבטאים את הגן *IPT* תחת בקרת פרומוטורים שונים.



TCP14/15 - TCP14 הינו גן מארבידופסיס המקודד לחלבון שעתוק המעורב בתגובות ציטוקינין ובפרוליפרציה של תאים. מצאנו כי ביטוי קונסטיטוטיבי של *TCP14* הינו מזיק לצמח ואילו ביטוי ממוקד תחת פרומוטר *FIL* בעגבנייה, בהתאמה, גורם לנינוס חלקי ולסיעוף מוגבר של הצמח (איור 11). הפרומוטר *AS1* פועל בפרימורדיות צדדיות. מצאנו שביטוי הגן *TCP14* תחת בקרת הפרומוטר *AS1* בארבידופסיס, מביא למופע ננסי למחצה ומסועף. כדי לבדוק את השפעתו בצפצפה הותמרו צמחי הצפצפה עם הקונטראקט *AS1:TCP14*. מרבית הקווים הטרנסגנים לא הראו מופע שונה מזה של צמחי הביקורת שאינם טרנסגנים. אולם קו אחד הראה

פנוטיפ ברור של סיעוף וננסות מסויימת. לאחר שנת גידול, צמח הביקורת והקו הטרוסגני שהראה ננסות וסיעוף נגזמו (הענף הראשי נקטם) ונערך מעקב אחר התפרצותם של הענפים הצדדיים. מהתוצאות נראה שבעוד שהסתעפותו של צמח הביקורת עוכבה, לצמח הטרוסגני שלטון קודקודי מוחלש והוא מסתעף בקלות (איור 12).

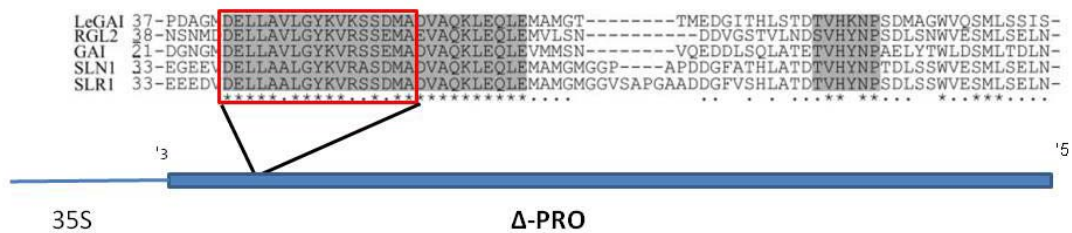
איור 12. צמחי עגבניה M82 (ביקורת) וצמחים טרוסגנים המבטאים את הגנים TCP15 (צמח שלם) ו-TCP14 (ענף מרכזי) תחת בקרת הפרומוטר *FIL*.



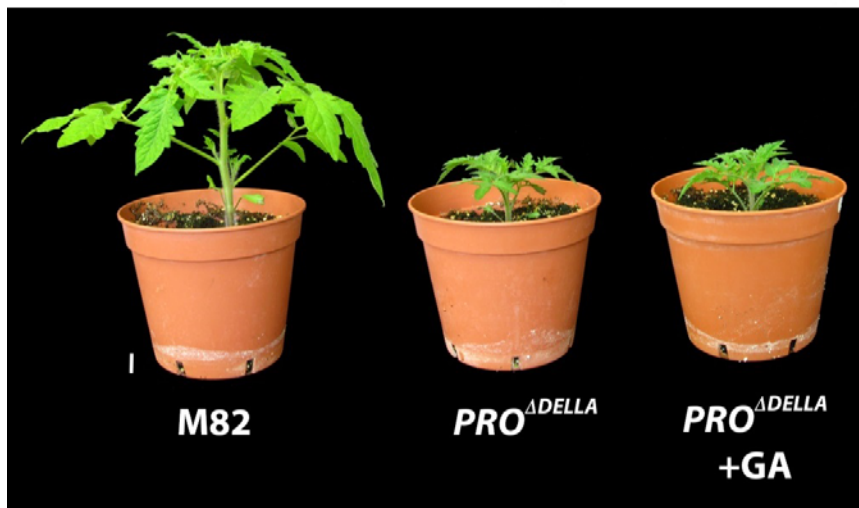
איור 12. צמחי צפצה טרוסגנים בני 14 חודשים המבטאים ביתר את הגן *TCP14* תחת בקרת הפרומוטר *AS1*. לאחר שנת גידול נקטם הענף הראשי ונערך מעקב אחר התפתחותם של הענפים הצדדיים. התמונה צולמה שלושה חודשים לאחר הקיטום. ניתן לראות שהטרוסגן (מצד ימין) מננס את הצמח ומחליש את השלטון הקודקודי.



ΔPRO - בודדנו את גן העגבנייה *PRO* (המקודד לחלבון *DELLA*) ויצרנו מוטציית חסר באתר ה- *DELLA* ליצירת ΔPRO שאותו חיברנו לפרומוטר 35S (איור 13). קונסטראקט זה אמור לקודד לחלבון מוטנט של חלבון ה- *DELLA* של עגבנייה *PROCERA* אשר הינו יציב ואינו מתפרק כתוצאה מפעילות ג'יברלין ולכן פעיל תמידית ומעכב את השפעתו של הורמון מעודד התארכות זה. מכאן צפינו שפעילות תמידית זו תגרום לננסות ויתכן שגם לסיעוף מוגבר. על מנת לבחון זאת, הצרוף *35S:PROΔDELLA* שימש לטרנספורמציה של צמחי עגבנייה. הצמחים (M82 והצמחים הטרוסגנים *35S:PROΔDELLA*) גודלו בחממה טרוסגנית ומיד ניתן היה להבחין שהם מנונסים. על מנת לבחון האם הניוס נובע כתוצאה מפעילות עיכוב הג'יברלין של החלבון המוטנטי. בשלב הראשון נבדקה השפעת הטיפול בג'יברלין על צמחים אלה. בשלב שני עלים ניתנו לצמחים שלושה ריסוסים (תוך שלושה ימים) של $100\mu M$ GA3. הצמחים צולמו לאחר שבוע נוסף. כצפוי מצמחים המבטאים חלבון *DELLA* יציב, הצמחים הטרוסגנים לא הגיבו לג'יברלין בהתארכות (איור 14).

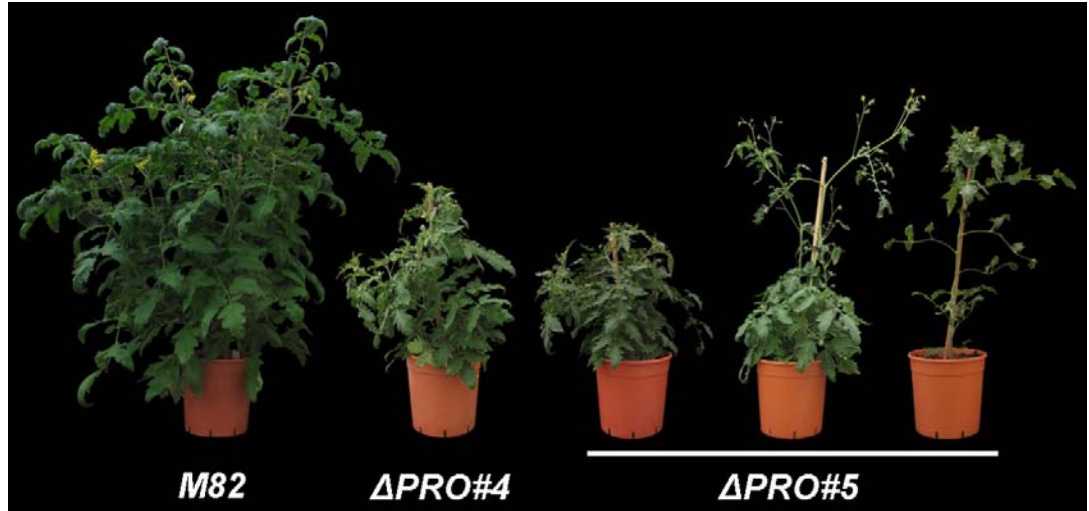


איור 13. הקונסטראקט Δ PRO. באיור רצף של חלבוני DELLA שונים כולל החלבון PRO (המופיע כ- LeGAI) והקונסטראקט שהוכן בו נערכה החסרה של אזור ה- DELLA.



איור 14. צמחי עגבנייה מהקו M82 וצמחים טרנסגנים ($PRO^{\Delta DELLA}$) אשר טופלו ב- GA_3 $100\mu M$. ניתן לראות את המופע הננסי של הצמחים הטרנסגנים ואת העובדה שהם לא הגיבו לטיפול חיצוני בג'יברלין.

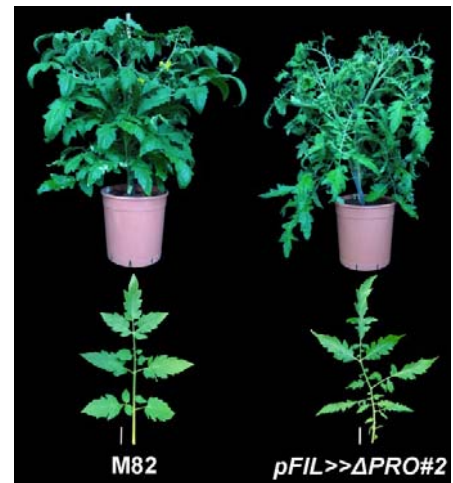
בשלב הבא גידלנו את הקווים השונים בחממה עד לשלב קבלת פירות. הצמחים הטרנסגנים שמרו על המופע המנונס שלהם, התפתחו היטב ופרחו. עלי הצמחים הטרנסגנים היו ירוקים יותר כתוצאה מצבירה גבוהה יותר של כלורופיל, תופעה ידועה הנגרמת כתוצאה מירידה בפעילות ג'יברלין. בבדיקות ראשוניות נראה שהצמחים לא רק מנונסים אלא גם מסועפים יותר. יש לזכור שהצמחים בשלב זה הם הטרנזיגוטים וסביר להניח שבמצב הומוזיגוט הם יהיו מנונסים יותר. בשנה האחרונה בדקנו קוים שונים (הומוזיגוטים והטרנזיגוטים) של הצמחים הטרנסגנים המבטאים את הגן המוטנט $PRO^{\Delta DELLA}$. מצאנו רמות נינוס שונות בקוים שונים. אולם במקרים אחדים מצאנו פנוטיפ מוארך במקום מנונס (איור 16). בבדיקה מולקולרית מצאנו שביטוי ביתר של הגן PRO גרם ל- Co-suppression (עיכוב ביטוי הטרנסגן והגן האנדוגני) מה שבהביא לקבלת פנוטיפ המזכיר את פנוטיפ המוטנט pro (loss-of-function).



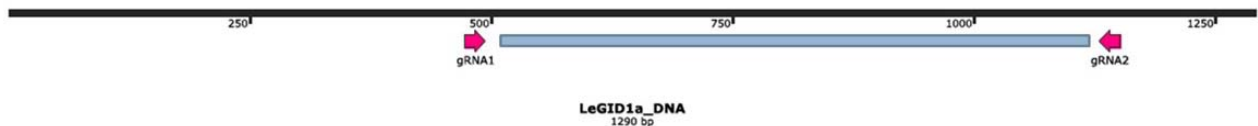
איור 16- קנים טרנסגנים שונים של עגבניה המבטאים ביתר את הגן המוטנט $PRO^{ΔDELLA}$ ($35S: PRO^{ΔDELLA}$). בחלק מהמקרים הטרנסגן גרם לנינוס וסיעוף מוגבר, אך במספר מקרים מצאנו תופעה של co-suppression.

בניסויים קודמים הראנו שביטוי של חלבוני השעתוק TCP14 ו-TCP15 תחת בקרת הפרומוטר *FIL* בעגבנייה גורם לננסות וסיעוף (איור 12). כיוון שביטוי ביתר של $PRO^{ΔDELLA}$ (תחת בקרת הפרומוטר 35S) הביא גם לנינוס וסיעוף, בדקנו השנה את הקומבינציה של $PRO^{ΔDELLA}$ עם הפרומוטר *FIL*. ערכנו טרנספורמציה לצמחי עגבנייה M82 עם הקונסטראקט $pFIL: PRO^{ΔDELLA}$ וקיבלנו מספר קווים טרנסגנים. כל הקווים הראו ביטוי גבוה של הטרנסגן בפרימורדיות העלים. הטרנסגן השפיע על מבנה העלים והם היו משוננים יותר. למעשה השינון התקבל כבר בפסיגים אשר באופן טבעי הם חלקים. למרות פנוטיפ העלים, הטרנסגן לא השפיע על התארכות הצמח ולא על הסיעוף שלו (איור 17).

איור 17- צמח טרנסגני של עגבניה המבטא ביתר את הגן המוטנט $PRO^{ΔDELLA}$ תחת בקרת הפרומוטר *FIL* ($FIL: PRO^{ΔDELLA}$). הטרנסגן הביא לשינון מוגבר של העלים אך לא גרם לנינוס או סיעוף.

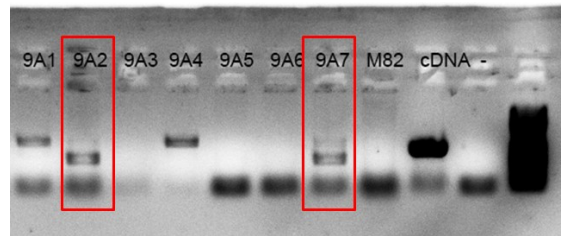


GID1 - דרך נוספת להשפיע על פעילות הג'יברלין היא להוריד את רמת הרצפטורים של ההורמון. בארבידופסיס ואורז איפיינו את הרצפטור GID1 שהוא הרצפטור היחיד לג'יברלין. בעוד שבאורז יש גן אחד לרצפטור, בארבידופסיס קיימים שלושה גנים המקודדים לרצפטור זה. בשלב הראשון סרקנו את רצפי DNA העגבניה באתר נתוני גנום העגבניה במטרה למצוא רצפים ההומולוגים ל-GID1 ומצאנו שלושה רצפים שונים, בדומה לארבידופסיס. על מנת ללמוד על תפקידם ולבדוק האם השתקתם תגרום לנינוס וסיעוף, החלטנו ליצור מוטנטים לגנים השונים באמצעות טכנולוגיית CRISPR-Cas9 שבה יוצרים מוטציות חסר מכוונות. בשלב ראשון בנינו את הקונסטראקטים להשתקה לשלושת הגנים. לאחר מכן יצרנו צמחים טרנסגנים של עגבניה עם הקונסטראקט ליצירת מוטצית חסר ב-GID1A. קונסטראקט זה אמור להסיר מקטע של 700 בסיסים מהרצף המקודד לחלבון (איור 18). לאחר שקבלנו צמחים טרנסגנים הם נבדקו ב-PCR למוטציה וזוהו מספר פרטים בהם נפגע הגן GID1A והתקבלה מוטצית חסר (איור 19). בשלב זה אנו מיצרים צמחים הומוזיגוטים למוטציה ומתחילים לייצר מוטנטים לשני הגנים האחרים.



איור 18 - איור סכמטי של הגן GID1A והאזור המתוכנן לחיתוך והוצאה ע"י CRISPR-Cas9 ליצירת מוטצית חסר.

איור 19 - תוצאות PCR שנערכו ל DNA מצמחי דור T1 לזיהוי מוטנטים שבהם נחתח והוצא חלק מהגן GID1A ע"י CRISPR-Cas9 ליצירת מוטצית חסר. באדום מסומנים שני פרטים עם מוטציות חסר.



דין

מטרת המחקר היתה ליצר צמחי עציץ מהונדסים בעלי ארכיטקטורה של עציץ פורח ללא צורך בעיצוב נוסף ובכך לחסוך בכח אדם במשתלות. על מנת לזהות טרנסגן שיכול לשמש לנינוס וסיעוף של צמחים אופיינו במהלך חמשת שנות המחקר מגוון צרופי פרומוטרגן נוספים לנינוס וסיעוף (טבלה 1). צרופים אלו כלל גנים המעורבים בייצור, ניטרול, מעבר סיגנל ותגובה להורמונים הצמחיים ג'יברלין ציטוקינין המבקרים תהליכים אלו בצמחים. צרופים אלו נבחנו ליכולתם לננס ולסעף צמחים על ידי החדרתם לצמחי מודל "פשוטים" יחסית כמו ארבידופסיס ועגבנייה ובמקביל לצמחי המודל "המסובכים" יותר חרצית וצפצה. פרט לחרצית שבא ההתמרה לא צלחה ההתמרות של צמחי המודל האחרים כולל הצפצה בהחלט דיווחו על יכולתם של צרופים מסויימים לננס ולסעף את הצמחים. מצאנו שהצרוף *35S:GAMT* הינו צרוף מצטיין מכיוון שעיבב התארכות במידה בנונית המתאימה לצמחי עציץ ועודד סיעוף בצמחי מודל פשוטים וגם בצפצה. בנוסף העלה את ריכוז הכלורופיל בצמח המותמר

תכונה מצוינת לצמחי עציץ. צרופים נוספים שהראו תוצאה מבטיחה היו *AS1:TCP14* ו *FIL:TCP14* שגרמו לסיעוף ולנינוס מסיים של צפצפה ועגבנייה. הקונסטרוקט *35S:PROΔDELLA* היה יעיל מאוד בנינוס וסיעוף ולדעתינו גם הוא מתאים ביותר לנינוס צמחי עציץ.

במחקר זה התמקדנו בפרח שעווה (שוק עציצים בשיא) ואיקליפטוס (שוק עציצים מתפתח) שלהם לא היתה מערכת טרנספורמציה בתחילת המחקר. עיקר המאמץ המחקרי הוקדש לפיתוח מערכות אלו. לאחר 4 שנות מחקר הצלחנו לבסס פרוטוקול טרנספורמציה אמין ויעיל לאקליפטוס גרנדיס. אומנם אקליפטוס גרנדיס אינו אקליפטוס נוי קלאסי אך אנו מאמינים שהפרוטוקול שפותח יכול לשמש בסיס טוב גם להתמרתם של זני אליפטוס המשמשים בייצור עציצים פורחים. בנוסף, פתחנו שיטה זולה לסריקת צמחוני האקליפטוס בעזרת PCR של פיסות עלים לזיהוי הצמחים הטרנסגנים. הצלחות אלו איפשרו לנו לייצר אקליפטוס טרנסגני המכיל את הצרוף *35S:GAMT1*, צרוף מצטיין שהוביל לנינוס בצמחי המודל עגבנייה וצפצפה. לאכזבתנו הרבה עקב תקלה טכנית לא הספקנו לאפיין את הצמחים הטרנסגנים בגלל זיהום חמור שנוצר במהלך העברתם מתרבית לתרבית לפני כשנה. כרגע סיבוב נוסף של טרנספורמציות הינו בדרך ואנו מקווים שבסיבוב זה אכן נוכל לייצר קווים מנוגסים של אקליפטוס. במקביל במהלך שנות המחקר התקדמנו בפיתוח פרוטוקול טרנספורמציה לפרח שעווה אך לאכזבתנו נכון לרגע זה לא הצלחנו להתמיר צמח זה התמרה מלאה אלא לקבל התמרה יציבה של כימרה. זאת ועוד, פתרנו גם את בעיית השתרשות של צמחוני שעווה בתרבית וכרגע בידנו המערך הכולל לריבוי צמחי שעווה טרנסגנים. לסיכום במחקר הנוכחי הצלחנו לזהות מספר צרופי פרומוטור:גן המתאימים לנינוס וסיעוף של צמחים כולל עצים. צרופים אלו ישמשו להתמרת אקליפטוס במטרה לייצר אקליפטוס נוי מנוגס המתאים לשיווק כצמח עציץ. בעתיד יהיה ניתן להשתמש בידע זה לייצור של צמחי נוי מותמרים נוספים המתאימים לגידול בעציץ.

ביבליוגרפיה

- D. Weiss, N. Ori, Mechanisms of Cross Talk between Gibberellin and Other Hormones, *Plant Physiol.* 144 (2007) 1240–1246. doi:10.1104/pp.107.100370. [1]
- M. Rebers, T. Kaneta, H. Kawaide, S. Yamaguchi, Y.-Y. Yang, R. Imai, et al., Regulation of gibberellin biosynthesis genes during flower and early fruit development of tomato, *Plant J.* 17 (1999) 241–250. doi:10.1046/j.1365-313X.1999.00366.x. [2]
- M. Varbanova, S. Yamaguchi, Y. Yang, K. McKelvey, A. Hanada, R. Borochoy, et al., Methylation of Gibberellins by *Arabidopsis* GAMT1 and GAMT2, *Plant Cell Online.* 19 (2007) 32–45. doi:10.1105/tpc.106.044602. [3]
- H. Sakakibara, Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation, *Annu Rev Plant Biol.* 57 (2006) 431–449. [4]
- E. Matsunaga, K. Nanto, M. Oishi, H. Ebinuma, Y. Morishita, N. Sakurai, et al., *Agrobacterium*-mediated transformation of *Eucalyptus globulus* using explants with shoot apex with introduction of bacterial choline oxidase gene to enhance salt tolerance, *Plant Cell Rep.* 31 (2012) 225–235. doi:10.1007/s00299-011-1159-y. [5]
- Z. Xin, J.P. Velten, M.J. Oliver, J.J. Burke, High-throughput DNA extraction method suitable for PCR, *BioTechniques.* 34 (2003) 820–824, 826. [6]

סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס לכל השאלות בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).
שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.
הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
1. פיתוח פרוטוקול לרגרציה וטרנספורמציה לאיקליפטוס ופרח שעווה.
2. זיהוי ואפיון צירופי גן – פרומוטר המאפשרים נינוס וסיעוף של צמחי המודל חרצית וצפצפה.
3. שימוש בגן ופרומוטר שזוהו בסעיף 2 ליצירת צמחי אקליפטוס ופרח שעווה טרנסגנים מנונסיים ומסועפים המתאימים לגידולי עציץ פורח.
עיקרי הניסויים והתוצאות.
איפיינו מספר רב של צרופי פרומוטר:גן המשרים נינוס וסיעוף בצמחי מודל. איפיון זה הוביל לזיהוי של מספר צרופים המשרי נינוס, סיעוף או שניהם. הצרוף המצטיין היה 35S:GAMT1 שהשרה נינוס וסיעוף בצמחי מודל ובעץ צפצפה וכן מנע הזדקנות. הצלחנו לבסס פרוטוקולים לטרנספורמציה של אקליפטוס גראנדיס, לסריקה של צמחי אקליפטוס טרנסגנים, וכן כיילנו השרשה של פרח שעווה בתרבית ופיתחנו פרוטוקול לטרנספורמציה של פרח שעווה עם הצלחה חלקית. תוך שימוש בפרוטוקול שפיתחנו הצלחנו להתמיר בהצלחה צמחי אקליפטוס בטרנסגן 35S:GAMT1 ואנו ממתינים לאיפיונם
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?
המחקר הנוכחי מוכיח כי ניתן להשפיע על ארכיטקטורת הצמח על ידי מניפולציה של גנים המשתתפים במסלולי הגיברלין והציטוקינין. זאת ועוד צרופי פרומוטר:גן מסוימים נמצאו כיעילים לנינוס, סיעוף ומניעת הזדקנות הצמח.
רוב מטרות המחקר הושגו אך לא כולן. לא הצלחנו לפתח מערכת טרנספורמציה לפרח שעווה ואקליפטוס נוי וכן לא הצלחנו לייצר צמח טרנסגני מנונס ומסועף שאנו צמח מודל. למרות זאת העובדה שזיהינו צרופי פרומוטר:גן מוצלחים והצלחנו להתמיר אקליפטוס מבטיחות כי בעתיד נוכל לייצר אקליפטוס נוי מנונס ומסועף המתאים לשיווק כצמח עציץ.
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - <u>ציטט</u> ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פנטטים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.
פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)
←
← לפרסם
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כ* -

*יש לענות על שאלה זו רק בדוח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדוח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש שנים

תרומה לפי קבוצות מחקר פרויקט אינטגרטיבי חסכון בידיים עובדות מספר 256-0875-10

קבוצת מחקר עינת שדות-

מטרות המחקר הספציפיות כפי שנכתבו בהצעת המחקר:

פיתוח מערכת טרנספורמציה לאיקליפטוס נוי.

תוצאות וממצאים:

הצלחנו להתמיר צמחי איקליפטוס גרנדיס בקונסראקט *35S:GAMT1* שאופיין כמצטיין לנינוס.

מסקנות ולקחים:

ניתן להתמיר אקליפטוס, בידנו פרוטוקול עובד. ההתמרה לוקחת מהדבקה ועד הקשחה כ- שנה וחודשיים לפחות.

ייתכן ופרוטוקול זה יתאים גם לאיקליפטוס נוי.

סטיות ושינויים מתכנית העבודה המקורית:

בשלב זה הטרנספורמציה נעשית על אקליפטוס גראנדיס ולא אקליפטוס נוי

מטרות המחקר המיועדות להתבצע בשנה הבאה:

סוף מחקר

קבוצת מחקר משה ראובני -

מטרות המחקר הספציפיות כפי שנכתבו בהצעת המחקר:

פיתוח מערכת טרנספורמציה לפרח שעווה

תוצאות וממצאים:

הצגנו צמחים מותמרים של פרח שעווה. ההתמרה יציבה וישנם כמה צמחים עם ארועי התמרה שונים. הצמחים

עדין מראים כימריזם. פתרנו גם את בעיית השתרשות של הצמחים בתרבית וכרגע יש לנו את כול המערך לריבוי

צמחים טרנספורמנטים.

מסקנות ולקחים:

פרוטוקול ההתמרה אינו מושלם ויידרש עוד זמן להגיע להתמרה מלאה

סטיות ושינויים מתכנית העבודה המקורית:

מטרות המחקר המיועדות להתבצע בשנה הבאה:

סוף מחקר

קבוצת מחקר צחי ארזי –

מטרות המחקר הספציפיות כפי שנכתבו בהצעת המחקר

איפיון מוליקולרי ופנוטיפי של כל צמחי האיקליפטוס ופרח שעווה הטרנסגנים המיוצרים במיזם.

תוצאות וממצאים

יושם פרוטוקול מיצוי דנ"א גנומי מעצים בנפח גבוה באקליפטוס. בעזרתו נסרקו צמחוני האקליפטוס *35S:GAMTI* שעברו את הסלקציה האנטיביוטית וזוהו בעזרת PCR אלו שהכילו את הטרנסגן.

מסקנות ולקחים

אין בשלב זה

סטיות ושינויים מתכנית העבודה המקורית

אין

מטרות המחקר המיועדות להתבצע בשנה הבאה

סוף מחקר

קבוצות המחקר דוד וייס ואלכסנדר ויינשטיין-

מטרות המחקר הספציפיות כפי שנכתבו בהצעת המחקר: בניית קונסטראקטים לביטוי מגוון גנים

ופרומוטרים לסיעוף ונינוס. החדרת הקונסטראקטים לצמחי המודל חרצית וצפצפה, אפיון מולקולארי ופנוטיפי של הצמחים הטרנסגנים בדגש לתכונות המבוקשות, הכוללות נינוס וסיעוף, כל זאת ללא כל התערבות חיצונית.

תוצאות וממצאים: זיהינו מספר צרופי פרומוטר:גן יעילים לנינוס וסיעוף גם בעצים. בשנה האחרונה, ייצרנו קווים שונים של עגבניה המבטאים את הגן המוטנט *PROADELLA* תחת בקרת הפרומוטר *35S*. הקווים השונים הראו רמות שונות של נינוס וסיעוף. יצרנו צמחים טרנסגנים המבטאים את *PROADELLA* תחת בקרת הפרומוטר *FIL*. הקונסטראקט השפיע על מבנה העלים אך לא הייתה לו השפעה על התפתחות הצמח (סיעוף ונינוס). התחלנו ליצר צמחים מוטנטים ברצפטורים לג'יברלין תוך שימוש בטכנולוגיית CRISPR-Cas9.

מסקנות ולקחים: הורדת רמת הג'יברלין הפעיל או עיכוב הסיגנל שלו משיגים את שתי מטרות הפרוייקט: נינוס וסיעוף הצמח ולכן יש להתמקד בגישה זו. ניתן להגיע לתוצאות דומות תוך עיכוב יצירת ההורמון, דה-אקטיבציה שלו או עיכוב מעבר הסיגנל שלו.

סטיות ושינויים מתכנית העבודה המקורית:

שימוש בצמחי עגבנייה במקום חרצית ללימוד צרופי פרומוטר גן עקב בעייתיות בהתמרה של חרצית.

מטרות המחקר המיועדות להתבצע בשנה הבאה:

סוף מחקר

כיצד שילוב התוצאות של קבוצות המחקר מקרב את המיזם לקראת מימוש יעדינו

במיזם הנוכחי השתתפו חמש קבוצות מחקר המחולקות לשתי תת קבוצות, קבוצת וולקני (עינת שדות, צחי ארזי ומשה ראובני) וקבוצת הפקולטה לחקלאות (דוד וייס ואלכסנדר ויינשטיין). בהתאמה חולקו גם האחראיות המחקריות. קבוצת המחקר במכון וולקני אחראית לפתח פרוטוקולי טרנספורמציה לאיקליפטוס ולפרח שעווה ובהמשך לפתח צמחי אקליפטוס ופרח שעווה טרנסגנים. קבוצת המחקר בפקולטה אחראית לזהות ולבחון גנים שביטויים בצמח גורם לנינוס ולסיעוף בצמחי מודל עשבוני ועצי, קרי גנים עם פוטנציאל לשינוי ארכיטקטורת צמחי עציץ בהתאמה כך שלא יזדקקו לטיפול אגרוטכני. קבוצת המחקר בוולקני כוללת מעבדות העוסקות בטרנספורמציה וריבוי של אקליפטוס ופרח שעווה (עינת שדות, משה ראובני) ומעבדה מולקולרית המתמחה באפיון צמחים טרנסגנים ובניית קונסטרוקטים מתאימים להתמרת הצמחים (צחי ארזי). הרכב זה נתן מענה להתמרת צמחי הנוי המדוברים ואפיונם, כאשר חלק הארי של המימון שקיבלה קבוצת וולקני מוקדש לפיתוח פרוטוקולים לטרנספורמציה ורגנרציה של צמחי הנוי הנ"ל. קבוצת המחקר בפקולטה כוללת מעבדה המתמחה בחקר מנגנונים הורמונליים הקשורים להתפתחות הנוף הצמחי (דוד וייס) ומעבדה המתמחה בטרנספורמציה (אלכסנדר ויינשטיין). הרכב זה נתן מענה לזיהוי גנים הקשורים לנינוס וסיעוף, בחינתם בצמחי מודל ובחירת הגנים המצטיינים לנינוס וסיעוף אקליפטוס ופרח שעווה. יחד המאמץ המקביל של קבוצת וולקני וקבוצת הפקולטה איפשר זיהוי גנים פוטנציאליים לנינוס וסיעוף והחדרתם לאחר מכן לאקליפטוס. בתום שנת המחקר השלישית הצליחה קבוצת הפקולטה לזהות הגן *GAMT* כגן שביטוי הטרנסגני מסוגל לננס ולסעף צמחי מודל עשבוניים כעגבניה ועצים כצפצפה ובתום השנה הרביעית הסתמן צרוף מצטיין נוסף על בסיס הגן *PROADELLA*. במקביל קבוצת וולקני הצליחה לפתח פרוטוקול לטרנספורמציה של אקליפטוס גראנדיס ואף לייצר צמחי אקליפטוס טרנסגנים המכילים את הצרוף *35S:GAMTI* המצטיין שאופיין על ידי קבוצת הפקולטה כמצטיין בנינוס. יעבור עוד זמן עד שנדע האם צמחי האקליפטוס הטרנסגנים אכן מנוגסים. לסכום, אומנם לא הצלחנו לייצר מוצר נוי טרנסגני מנוגס בחמש שנות המחקר אך עיקר יעדיו הושגו קרי זיהינו מספר צרופי פרומוטר:גן שיכולים לשמש לנינוס וסיעוף ואנו בדרך לוודא האם הם יעילים באקליפטוס ובהמשך בפרח שעווה.