

דו"ח מסכם לתכנית מחקר 203-0748

בקרת פוריות בגפן- איתור ואפיון הגורמים המעורבים בבקרת הסתעפות האנלאגן

צוות המחקר: אתי אור, אבי פרל, שמעון לביא, עליזה אוגרודוביץ,

המכון למטעים, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן, ת.ד. 50250.

דואר אלקטרוני: vhettior@agri.gov.il

Control of grapevine fertility: characterization of factors involved in reproductive meristem branching control

Etti Or, Avi Perl, Shimon Lavee, Aliza Ogredovitch

Institute of Horticulture, Volcani Center, Bet Dagan, P.O.B. 50250. Email: vhettior@agri.gov.il

חתימת החוקר:

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

מבוא מקוצר (מבוא מפורט נמצא בהצעת המחקר)

המריסטמה הווגטיבית והמריסטמה הרפרודוקטיבית נוצרות בגפן מאותה מריסטמה קודקודית בשריג הצומח ובפקעים הלטרליים. את תהליך ההתמיינות של המריסטמה הרפרודוקטיבית נהוג לחלק לשלושה שלבים: בשלב הראשון, החל במקביל לצימוח השריג באביב, מתמיינת מהמריסטמה הקודקודית בפקע הלטנטי פרימורדיה רפרודוקטיבית ראשונית הנקראת UCM. בשלב השני מתמיינת מריסטמת ה- UCM לקנוקנת או תפרחת בתלות בסביבת ההתמיינות. בפקע הלטנטי תתמייין מריסטמת ה- UCM לתפרחת או לקנוקנת ואילו מריסטמת UCM הנוצרת על גבי קודקוד הצימוח של השריג הגדל תתמייין לקנוקנת, כאשר בזנים הידועים כארוכי זמירה תתמייין על פי רוב מריסטמת ה- UCM בפקעים בסיסיים לקנוקנת ואילו התמיינות לפריחה תחול בפקעים עליונים. כתוצאה, בסיס הזמורה בזנים אלו אינו פורה. בתום השלב השני הפקעים הלטנטים נכנסים לתרדמה. בשלב השלישי, החל לקראת עונת הגידול הבאה, מתחדש תהליך ההתמיינות ובמהלכו חלות התפצלויות נוספות של פרימורדיית התפרחת היוצרות שדרת אשכול ולבסוף מתמיינים בקצה כל סעיף שלושה עד חמישה פרחים. מטרתו ארוכת הטווח של המחקר הינה לברר מה הוא המנגנון המבקר את פוריות הפקע. השערת המחקר היא כי בקרת מידת הסתעפות ה- UCM בפקעים לטנטים מעורבת בהכוונת התמיינותה לקנוקנת או תפרחת ולפיכך היא עשויה להיות בעלת תפקיד מרכזי בבקרת פוריות הפקע. בהתאמה, מטרת העבודה הנוכחית היא: (1) להשתמש בגרדיאנט הפוריות שעל השריג כדי לזהות גנים שעשויים להיות מעורבים בבקרת התמיינות ה- UCM והסתעפותה, (2) לבחון את אופי המתאם בין רמות הביטוי של גנים אלו, וגנים שקשורים עימם בקשר תפקודי, לשלבי התפתחות רפרודוקטיבית בגפן ולדרגת פוריות הפקעים, (3) לבחון אפשרות של קשר בין רמות הביטוי של גנים אלו לטרנספורמציה של מופע האיבר הרפרודוקטיבי ולנוכחות ג'יברלינים וציטוקינינים, שהם בעלי השפעה מוכחת והפוכה על זהות האיבר המתמייין מה- UCM ועל פוריות הפקעים.

תקציר תוצאות המחקר

בעבודה הנוכחית נאספו פקעים תחתונים ועליונים מהזן סופיריור הידוע כארוך זמירה, במשך 3 שנים רצופות במהלך התמיינות מריסטמת ה- UCM והתפרחת. ניתוח פוריות הראה כי פוריות הפקעים התחתונים עמדה על פחות מ 20% ואילו פוריות הפקעים העליונים עמדה על 72%. על בסיס שונות זו נבחנה השתנות פרופיל הביטוי של הטרנסקריפטום במהלך התפתחות הפקע והתמיינות התפרחת בתוכו על השריג המרכזי בעונת הגידול הראשונה, תוך שימוש בציפיים של גפן מתוצרת חברת "אפימטריקס". כ- 853 גנים הראו שונות בביטוי בין פקעים עליונים ותחתונים באופן מובהק (FDR של 0.005), ומתוכם בלטה קבוצה של 31 גנים המראים ביטוי

גבוה בפקעים פוריים, שבה נכלל הגן *VvTFL1A* שדווח בעבר כהומולוגי לגן *TFL1* מארבידופסיס. גן זה הראה ביטוי גבוה בפקעים עליונים פוריים וביטוי נמוך בפקעים תחתונים בעלי פוריות נמוכה. ידוע כי הגן *TFL1* מעורב בבקרת התמיינות התפרחת בארבידופסיס ובצמחי מודל אחרים באמצעות מניעת התמיינות דטרמיניסטית של קודקוד התפרחת. לפיכך, נבדק דגם הביטוי של גנים נוספים המעורבים בהתמיינות התפרחת: נבחן דגם הביטוי של *VFL* ו-*VAP1* ההומולוגים לגנים *AP1* ו-*LEAFY* שמעורבים בבקרה על התמיינות תפרחת והפרחים על גבי התפרחת בארבידופסיס. נבחן גם דגם הביטוי של הגן *VvFT*, הומולוג לגן *FT* מארבידופסיס, שהינו גן מפתח במספר מסלולי ביטוי המובילים לפריחה וביטוי משרה ביטוי הגנים *LEAFY* ו-*AP1*. בנוסף נבחן דגם הביטוי של הגן *VvMADS8* ההומולוגי לגן *SOC1* מארבידופסיס, שהינו בקר שיעתוק הידוע כגן מרכזי במעבר מגדילה ווגטיבית לרפרודוקטיבית ומקדם ביטוי הגן *LEAFY*. נמצא כי ביטוי גנים אלו גבוה בפקעים התחתונים ביחס לרמת ביטוי הגנים בפקעים העליונים. נמצא גם כי ביטוי הגנים *VFL* ו-*VvTFL1A* עולה עם התמיינות מריסטמת ה-*UCM* ויורד עם התמיינות התפרחת. בהמשך התמיינות התפרחת נשאר ביטוי הגן *VvTFL1A* ללא שינוי ואילו ביטוי הגן *VFL* עולה במקביל לעליה בביטוי הגן *VAP1* עם השלמת התמיינות התפרחת. בנוסף נמצא דמיון בפרופיל הביטוי של הגנים הנבחנים בקונקות המתמיינות לאורך השריג ובתפרחת הממיינת פרחים בעונת הגידול השנייה, ממצא המרמז על התמיינות מריסטמת פרח בזרועות הקונקט. על בסיס ממצאים אלו הוצע מודל על פיו בגפן ביטוי הגן *VvTFL1A* מעכב התמיינות מריסטמת פרח על גבי ה-*UCM* ובכך מאפשר המשך פיצול מריסטמה זו לסעיפים ולתתי סעיפים ליצירת תפרחת.

על מנת לבסס את המודל המוצע נבדק הקשר בין גיברלינים וציטוקינינים ובין ביטוי הגנים הנבחנים שצוינו לעיל. הקשר בין ההורמונים הצמחיים גיברלינים וציטוקינינים לפוריות הגפן ידוע מזה שנים רבות, כאשר במחקרים רבים נמצא כי מתן גיברלינים אקסוגניים לגפן מעכב התמיינות תפרחות ואילו עיכוב מסלול סינתזת הגיברלינים האנדוגני מעודד התמיינות תפרחות על גבי השריג. מאידך, מתן ציטוקינינים לקודקוד הצימוח ולקונקות הביא להתמיינות תפרחות במקום קונקות. בהתאמה, בקונקות שגודלו על מצע מזון המכיל ציטוקינין במשך שבועיים התפתחה תפרחת במקביל לעליה בביטוי הגן *VvTFL1A* ולירידה בביטוי הגן *VAP1* בהשוואה לקונקות ביקורת. השפעת ציטוקינין על ביטוי הגן *VvTFL1A* נבדקה במערכת של תאי קאלוס מגפן אליהם הוחדר הפרומוטור של הגן *VvTFL1A* המשוחרר לגנים המדווחים *GFP* ו-*GUS*. תאי קאלוס שגודלו על מצע מזון המעודד רגנרציה והמכיל ציטוקינין הראו ביטוי גבוה של *GFP* ו-*GUS* בהשוואה לתאי ביקורת. נמצאה גם עליה בביטוי הגן *VvTFL1A* בתאי קאלוס שאינם טרנסגנים בתגובה לטיפול בציטוקינין. בעקבות ממצאים אלו נבדקה רמת הציטוקינינים הקשורים והחופשיים בפקעי גפן מהזן סופיריור ונמצא כי רמת הציטוקינינים גבוהה בפקעים עליונים פוריים ביחס לרמתם בפקעים תחתונים.

בדומה לטיפול ציטוקינין נמצא שטיפול במעכב סינתזת גיברלינים מקדם התמיינות תפרחות בגפן. בהתאם רוססו גפני סולטנינה במעכב סינתזת גיברלינים ונמצא כי התמיינו תפרחות במקום קונקות בקודקוד הצימוח. באנליזת *In situ* של הפקעים מגפנים מטופלות נראה ביטוי של הגן *VvTFL1A* בקצות הסעיפים המתפצלים בתפרחת. בדומה לניסויי ציטוקינין שתוארו, גודלו קונקות על גבי מצע מזון המכיל מעכב סינתזת גיברלינים ובקונקות אלו התמיינו תפרחות במקביל לעליה בביטוי הגן *VvTFL1A* אך לא נראה שינוי ברמת ביטוי הגן *VAP1*. בנוסף לניסויים אלו נבחן פרופיל ביטוי הגנים *VFL*, *VAP1* ו-*VvTFL1A* בזן 4056. זן זה הראה רגישות מוגברת לטיפול מעכב סינתזת גיברלינים ובשריגים מטופלים התמיינו תפרחות בלבד. במקביל חלה עליה בביטוי הגן *VvTFL1A* בקודקודי השריגים המטופלים. שריגים בהם התמיינו תפרחות טופלו בגיברלין GA_3 על מנת להחזיר את הפנוטיפ הנורמאלי. נמצא כי במקביל להתמיינות קונקות בתגובה לטיפול זה חלה עליה בביטוי הגנים *VFL* ו-*VAP1*. עיכוב סינתזת הגיברלינים הוביל לעליה בביטוי הגן *VvTFL1A* במקביל להתמיינות תפרחות אולם נראה כי עליה זו בביטוי אינה כתוצאה ישירה מעיכוב סינתזת הגיברלינים. זאת משום שבתאי קאלוס טרנסגנים המבטאים *GFP* ו-*GUS* תחת הפרומוטור של *VvTFL1A* לא חלה עליה בביטוי גנים אלו עקב טיפול במעכב סינתזת גיברלינים. מניסויים אלו נראה כי עיכוב סינתזת הגיברלינים גורם להתמיינות תפרחות במקביל לעליה בביטוי הגן *VvTFL1A* ואילו טיפול ב- GA_3 מעודד התמיינות קונקות ועליה בביטוי הגנים *VFL* ו-*VAP1*. בהתאמה, נמצא כי רמת ביטוי הקולטן לגיברלינים *VGIDb* גבוהה בפקעים התחתונים בהם הפוריות נמוכה

ופקעים בעמדות אלו רגישים יותר ל- GA_3 ביחס לפקעים עליונים, מאחר והוספת GA_3 לפקעים אלו הביאה לירידה משמעותית בביטוי גן המקדד ל- $VGA20ox$, שהוא בקר מרכזי של ביוסינתזת גיברלינים אנדוגנים, כתוצאה מהיזון חוזר. בעקבות התוצאות שהתקבלו במחקר הוצע מודל לפיו התמיינות מריסטמת ה- UCM לקנוקנת, לאחר חלוקה ראשונית לשת זרועות, מבוקרת על ידי גנים המשרים התמיינות פרחים בקודקודי הזרועות ומונעים המשך פיצול הזרועות לתתי סעיפים. התמיינות זו היא ברירת המחדל בפקעים ובקודקוד הצימוח של השריג. עיכוב ביטוי גנים אלו בפקעים הפוריים על ידי תוצר הגן $VvTFL1A$ מאפשר המשך התפצלות הזרועות לתתי סעיפים והתמיינות תפוחת. נראה כי מנגנון בקרה גנטי זה מבוקר על ידי ההורמונים הצמחיים מקבוצת הציטוקינים והגיברלינים והיחס ביניהם המבקר ביטוי הגנים $VvTFL1A$ או $VFL/VAP1$.

תוצאות דיון

תאור התפתחותי במהלך נקודות הדגימה של פקעים מעמדות פוריות ולא פוריות

במעקב אחר פוריות הגפן מהזן סופיריור בכרם מסחרי במשך שלוש שנים נמצא כי פוריות הפקעים מעמדה 2 בזן זה היא פחות מ- 20% ואילו בפקעים עליונים בעמדות 8,9,10 מספר הפקעים נושאי האשכול עומד על 72% (דווח כתוצאות פרלימינאריות בתכנית המחקר). על בסיס ממצאים אלו נאספו פקעים עליונים ותחתונים בנפרד במשך 3 שנים, משבועיים לפני תחילת פריחה ובמשך 10 שבועות עוקבים, תחום זמן שבו על פי הספרות חלה האינדוקציה לפריחה ומתמיינת פרימורדיית התפוחת בפקע. בתמונה 1 מוצג תאור התפתחותי של השריג והפקע בנקודות הדגימה.

בחינת פרופיל הביטוי של VFL בפקעים פוריים ופקעים לא פוריים

RNA הופק מפקעים עליונים ותחתונים מ 10 מועדי איסוף נבחרים לפני פריחה ואחריה. על סמך רצף הנוקליאוטידים של הגן VFL (שהובאה בספרות תמיכה להיותו ההומולוג הפונקציונאלי של LEAFY באמצעות ביטוי בארבידופסיס) הורכבו פריימרים ספציפיים ל Real Time PCR ונבחן ביטוי הגן מדגימות שנדגמו בשלושת השנים המוזכרות (תמונה 2). מן התוצאות ניתן לקבוע כי רמת הביטוי של VFL מגפן גבוהה בפקעים תחתונים באופן מובהק מזו שבפקעים עליונים מהשלב הפנולוגי של סיום פריחה.

אנליזה פונקציונלית של VvAP1

זוהה ופורסם רצף של הגן הנחשב להומולוג של בקר הפריחה AP1 מארבידופסיס אולם לא נערכה אנליזה של השפעת ביטוי יתר שלו בארבידופסיס בדומה לבחינה שנערכה ודווחה בספרות עבור VFL, VvFT ו- $VvTFL1A$. לפיכך נבחן היבט זה במהלך העבודה הנוכחית. נבנה קונסטרוקט המכיל מסגרת הקריאה השלמה של VvAP1 בתוך הווקטור הבינרי pK7WG2D תחת בקרת פרומוטור 35S ונערכה טרנספורמציה לארבידופסיס. זרעים הונבטו על מצע סלקטיבי ואחר כך הועברו לעציצים. צמחים נבחנו בעזרת PCR לבחינת ביטוי VAP1 שמקורו בגפן בעלי הארבידופסיס. לאחר פריחה נאספו זרעים והונבט דור F2 על מצע סלקטיבי. לבחינת פנוטיפ נבדקו 14 צמחים טרנסגנים מדור F1 ו F2 ו 20 צמחי WT. כמו כן נבדק פנוטיפ פרחים תחת בינוקולר. הצמחים הטרנסגנים פרחו מהר יותר מצמחי זן הבר באופן מובהק. התפרחות התפתחו לאחר 7.8 עלי שושנה ווגטיבים ואילו בצמחים מזן הבר תפרחות התפתחו לאחר 11.2 עלים בממוצע. הבדלים אלו מחזקים את ההשערה כי VAP1 הומולוגי ל AP1 מארבידופסיס. מאידך לא נמצא הבדל במספר תפרחות המשנה וזאת בשונה מהפנוטיפ המתקבל בביטוי ביתר של הגן AP1 האנדוגני בארבידופסיס. בנוסף, בבחינת מופע הפרחים נמצאו פרחים בעלי פנוטיפ שונה בו חל עיכוב בהתפתחות פרחי הגביע וזאת בדומה לנמצא בביטוי ביתר של AP1 בארבידופסיס. (תמונה 3).

בחינת פרופיל הביטוי של VAP1 בפקעים פוריים ופקעים לא פוריים

בבחינת ביטוי הגן VAP1 בפקעים עליונים ופקעים פוריים ותחתונים לא פוריים הגן נמוך מאוד לאורך 8 השבועות הראשונים וכמעט אפסי (תמונה 2). עליה בביטוי הגן חלה בפקעים הפוריים בשבוע 9 ועליה זו ניתן לייחס להתמיינות תפוחת. לשם השוואה ביטוי הגן VAP1 בפקעים רדומים לקראת התעוררות גבוה פי 50 מביטוי הגן בפקעים צעירים.

בחינת פרופיל הביטוי של VvFT בפקעים פוריים ופקעים לא פוריים

על סמך רצף הנוקליאוטידים של הגן VvFT (שהובאה תמיכה בספרות להיותו הומולוג פונקציונאלי של FT באמצעות ביטוי בארבידופסיס) הורכבו פריימרים ספציפיים ל Real Time PCR ונבחן ביטוי הגן מדגימות שנדגמו בשלושת השנים כמתואר מעל (תמונה 4).

בבחינת ביטוי הגן VvFT בפקעים נראה כי בשבוע הראשון ביטוי הגן גבוה בפקעים פוריים אך לאחר מכן ביטוי הגן יורד. בפקעים התחתונים הלא פוריים ביטוי הגן יורד ב 4 שבועות הראשונים אך קפיצה משמעותית בביטוי הגן חלה בשבוע החמישי וירידה בביטוי לאחר מכן. יש לציין כי ביטוי הגן בפקעים נמוך פי 40 בממוצע מביטוי הגן בעלים הנמצאים בעמדות מקבילות לפקעים. בספרות פורסם כי ביטוי ותרגום מהגן FT מארבידופסיס (הידוע כמשרה ביטוי של הגנים LEAFY ו AP1) חל בעיקר בעלים והתוצר החלבוני עובר לקודקוד הצימוח (שבו רמת הטרנסקריפט כמעט ואינה ניתנת לגילוי), שם הוא משרה פריחה. על בסיס זה רמתו הנמוכה של הטרנסקריפט בפקעים הצעירים אינה מפליאה ונוצר הצורך לבחון הבדלים אפשריים ברמת הטרנסקריפט בעלים שנאספו מעמדות פוריות ועמדות לא פוריות שעשויים להיות אחראיים לשונות ברמת התוצר החלבוני העובר לפקעים שבסמיכות להם.

בחינת פרופיל הביטוי של VvFT בעלים שנדגמו מעמדות פוריות ועמדות לא פוריות

בחינת ביטוי הטרנסקריפט המקודד ע"י הגן VvFT בעלים שנדגמו מעמדות פוריות ועמדות לא פוריות הצביעה על הבדל מובהק ברמת הביטוי בתלות במיקום הפקע (תמונה 4). רמת הביטוי של VvFT גבוהה בפקעים תחתונים באופן מובהק מזו שבפקעים עליונים עד למועד סיום הפריחה ומפתה לתאר מצב שבו בפקעים התחתונים ביטוי מוגבר של VvFT עד הפריחה מוביל לעלייה ברמתו של התוצר החלבוני בפקע (לא נבחן) ומשרה עלייה בביטוי של VFL (תמונה 2), תסריט דומה לזה שתואר במהלך ההתפתחות הרפרודוקטיבית של ארבידופסיס.

מכלל התוצאות שהובאו עד כה (כולל תוצאות פרלימינאריות שהוצגו בתכנית המחקר) עולה כי בעמדות פוריות יש ביטוי מוגבר של רגולטור שלילי של התפתחות פרחים (VvTFL1A) ואילו בעמדות לא פוריות, בהם יש התפתחות קנוקנות ואין התפתחות אשכולות, יש ביטוי מוגבר של בקרים חיוביים המעודדים התמיינות פרחים.

תוצאות אלו תומכות בהיפותזה לפיה בעמדות לא פוריות מתקיימים חלק מהתנאים המתאימים להתמיינות פרימורדיות פרח ועוצרים את ההסתעפות. עצירת ההסתעפות גורמת לסיום התפתחות המריסטמה הרפרודוקטיבית במצב של ציר תפוח לא מסועף שהוא הקנוקנת. לשם יצירת תפוח, לעומת זאת, נדרשים תנאים שיעכבו התמיינות לפרח בקצות הסעיפים, ויאפשרו המשך הסתעפות עד לשלב ההתפתחות מאוחר יותר שבו פרימורדיית התפוח מסועפת. על פי הרציונל המוצע, גיברלין, VFL, VvFT ו-VAP1 מהווים שילוב שיוצר סיגנל חזק להתפתחות פרח בשלב מוקדם של סיעוף ומונעים המשך הסתעפות הנחוצה להתפתחות תפוח.

השוואה של פרופיל הביטוי של רגולטורים של התפתחות פרח בין פקעים מתעוררים לקנוקנות

לאחר היציאה מתרדמה מתמיינות מריסטמות פרח על גבי סעיפי התפוח. אם אכן מתפתחת בקצה הקנוקנת פרימורדית פרח הרי שניתן להקביל התפתחותית בין התפוחות בשלבי סיום התפתחותה בפקע המתעורר ובין קצוות הקנוקנת. על בסיס רציונל זה הושוה פרופיל הביטוי של הגנים שהוזכרו מעל בין קנוקנת מתפתחת ופקע מתעורר בזן סולטנינה כאשר ההנחה היא שדגם ביטוי דומה עשוי לרמוז על התפתחות פנולוגית דומה למרות שהקנוקנת אינה נושאת פרחים בפועל ומשמשת כאיבר אחיזה (תמונה 5).

לצורך זה נדגמו פקעים לאורך הרצף ההתפתחותי משלב תרדמה, דרך שלב פריצת השריג מהפקע, ועד לשלב היפרדות התפוחות מקודקוד הצימוח (ראה תמונות בתחתית תמונה להדגמת מופע פנולוגי). במקביל נאספו קנוקנות מתפתחות לאורך השריג בארבע קבוצות המייצגות שלבי התפתחות שונים של הקנוקנת (מבוסס על תוצאות פקרימינריות שהובאו בתכנית המחקר): קנוקנות המרוחקות 1 – 2 פרקים מקודקוד, קנוקנות המרוחקות 3 – 4 פרקים מקודקוד, קנוקנות המרוחקות 5 – 6 פרקים מקודקוד ו קנוקנות המרוחקות 7 – 10 פרקים מקודקוד.

ההשוואה מציגה דמיון מפתיע של פרופיל הביטוי של כל אחד מארבעת הגנים הנבחנים לאורך התפתחות הקנוקנת ובמהלך השלמת התמיינות הפרחים במהלך הפריצה מהפקע ותומכת בכך בהיפותזה שהועלתה.

ביטוי הגן SOC1 בפקעים מעמדות פוריות ולא פוריות

בנוסף לגנים API ו LEAFY נמצא בארבידופסיס כי הגן FT משרה עליה בביטוי הגן SOC1 בקודקוד הצימוח. גן זה נמצא כמעורב במעבר לפריחה ומוטנט חסר בגן מוביל לפריחה מאוחרת, ללא תלות באורך יום. הגן SOC1 מהווה חלק מקומפלקס חלבוני המקדם ביטוי הגן LEAFY אך במקביל נמצא כמעכב ביטוי הגן SEP3 השייך לגנים מסוג E היוצרים קומפלקס חלבוני עם גנים מסוג A, B ו C בבקרת התמיינות אברי הפרח.

מאידך, הגן API נמצא כמעכב ביטוי SOC1 ולכן הוצע מודל לפיו בתגובה ל- FT עולה ביטוי הגן SOC1, המשרה ביחד עם חלבונים נוספים בתא ביטוי הגן LEAFY, ועל ידי כך מקדם מעבר לפריחה והתמיינות מריסטמות פרחים בתפוחת. יחד עם זאת נמנע ביטוי הגן SEP3 כדי לאפשר גדילת מריסטמת הפרח לפני התמיינות אברי הפרח משום שהתמיינות אברים מוקדמת מידי פוגעת בפנוטיפ התקין של הפרח. עיכוב זה מוסר בהמשך על ידי הגן API. בגפן זוהה הגן האורטולוגי לגן SOC1 ונקרא VvMADS8.

מאחר שאותרה שונות בביטוי FT בעמדות פוריות ולא פוריות נבחנה שונות אפשרית גם בדגם ביטוי VvSOC1 בפקעים עליונים ותחתונים בעזרת Real time PCR. מן הנתונים (תמונה 6) נראה כי רמת תעתיק הגן גבוהה בפקעים מעמדות תחתונות ביחס לרמת תעתיק הגן בפקעים מעמדות עליונות עד לאחר התמיינות ה-UCM בשבוע ה 6. בשבוע ה 7 עולה רמת התעתיק בפקעים מעמדות עליונות ודומה לרמת תעתיק הגן בפקעים מעמדות תחתונות. בשבוע ה-8 יורדת רמת תעתיק הגן באופן משמעותי בפקעים תחתונים ומאידך יש ירידה קלה בלבד ברמת תעתיק הגן בפקעים עליונים, ולפיכך רמת התעתיק בשלב זה גבוהה יותר בעמדות עליונות ומצב זה נשמר במשך שבועיים נוספים (תמונה 6). הרמה הגבוהה של תעתיק SOC, בקר חיובי נוסף של התמיינות לפריחה, דווקא בפקעים הלא פוריים מהווה תמיכה נוספת במודל שתואר במבוא על בסיס אינטגרציה בין תוצאות קודמות למידע במערכות אחרות.

מעקב אחר ביטוי הגנים VFL, VvSOC1, VAP1 ו VvTFL1A בפקעי גפן פוריים בשריג לטרלי

בארבידופסיס המעבר מהשלב הווגטיבי לשלב הרפרודוקטיבי מתחלק ל- 4 שלבים: שלב ווגטיבי (שלב 1), שלב של התמיינות המריסטמה הקודקודית כמריסטמת תפוחת (שלב 2), שלב התמיינות מריסטמות פרח באגפי קודקוד התפוחת (שלב 3) ושלב התמיינות אברי הפרח (שלב 4). בהתאם נמצא כי במעבר משלב 1 לשלב 2 עולה ביטוי הגנים SOC1, LEAFY ו- TFL1 במריסטמת הקודקוד, במעבר משלב 2 לשלב 3 יורדת רמת ביטוי הגן LEAFY בקודקוד ועולה באגפי המריסטמה, במקביל לעליה בביטוי הגן API באגפים. מצב זה נשמר גם בשלב 4 במקביל לעליה בביטוי הגן SOC1 במריסטמת הפרח.

בהתאמה, עלה הרעיון לעקוב אחר ביטוי הגנים VFL, VvSOC1, VAP1 ו VvTFL1A בפקעי גפן בהם מתמיינת תפוחת לאורך שלבי ההתפתחות על מנת לאפיין את דגם הביטוי של גנים אלו בשלב התמיינות ה-UCM והתמיינות התפוחת. בשונה מהמערכת עם גרדיאנט הפוריות שאפיינו בשריג הראשי בסופיריור, הניסוי המוצע דרש רצף התפתחותי בפקעים שבהם מתפתחת תפוחת בוודאות. מן הספרות ידוע כי בחיק כל עלה מתמייין בנוסף לפקע הלנטני המורכב גם פקעי לטרלי, המתעורר ומתפתח לשריג לטרלי. עוד ידוע כי הפקעים הלנטנים המתמיינים על גבי שריגים לטרליים הם בעלי פוריות גבוהה **ואין גרדיאנט פוריות לאורך השריג**. לפיכך נבחר דגם ביטוי הגנים המצוינים מעל בפקעים שנדגמו לאורך שריגים לטרליים בזן סופיריור, במקביל למעקב מיקרוסקופי אחר התפתחותם. כפקעים הצעירים ביותר הוגדרו פקעים שנאספו מחיק עלים שהיו מרוחקים כ-4 פרקים מקודקוד השריג (פרק שהעלה הנישא עליו נפרד מקודקוד הצימוח ונפרש הוגדר כפרק שנפרד מקודקוד הצימוח). כפקעים בוגרים הוגדרו פקעים שנדגמו מחיק עלים שהיו מרוחקים כ- 14 פרקים מקודקוד השריג. נדגמו פקעים מעמדה 4, 6, 8, 10, 12 ו- 14 (כאשר חשוב להדגיש כי על פי ההגדרות המצויינות כאן, עמדה 4 מייצגת את הפקעים הצעירים ביותר והקרובים ביותר לקודקוד).

על פי האנליזה המיקרוסקופית, בפקעים צעירים המרוחקים כ 4 פרקים מקודקוד השריג נראה קודקוד צימוח בלבד (SAM) ואילו התמיינות UCM נראית לראשונה בפקעים המרוחקים 6 – 8 פרקים מקודקוד השריג. בפקעים בוגרים יותר, בעמדות 10 – 14, נראית מריסטמת תפוחת (IM) המתפתחת במקביל לצמיחת קודקוד הצימוח. בפקעים המרוחקים כ- 14 פרקים מקודקוד השריג התפוחת

מפותחת ושלמה (תמונה A7). באנליזה מקבילה של דגם ביטוי הגנים הנבחרים נמצא כי רמת תעתיק הגנים VvTFL1A ו-VFL עולה עם התמיינות ה-UCM בפקעים בעמדות 6 - 8. לקראת השלמת הסתעפות פרימורדית התפרחת בפקע 10 נמדדה ירידה משמעותית ברמת תעתיקי הגנים ובהמשך רמת תעתיק הגן VvTFL1A נשארת נמוכה ואילו רמת תעתיק הגן VFL עולה שוב עם המשך התפתחות התפרחת (תמונה B7, C7). בניגוד למתואר מעל, רמת תעתיק הגן VAP1 נמוכה בפקעים בשלב התמיינות ה-UCM ושלבי התפתחות התפרחת הראשונים והיא עולה בפקעים הנמצאים בעמדות 12 ו-14 בהם התפרחות נמצאות בשלבי התפתחות מאוחרים, במקביל לעליה השנייה ברמת תעתיק הגן VFL (תמונה D7). רמת תעתיק הגן VvSOC1 עולה במקצת עם התמיינות ה-UCM בפקע 8 ונשארת ללא שינוי מובהק בפקעים הבוגרים בהם מתפתחת מריסטמת התפרחת (תמונה E7).

VvTFL1A בחינת מתאם בין המהפך ממופע קנוקנת למופע תפרחת לבין שינוי בדגם הביטוי של VvTFL1A

על בסיס הממצאים שהתקבלו עד לשלב זה במחקר הועלתה ההנחה כי VvTFL1A מעורב בבקרת התמיינות התפרחת וביטוי מעכב מעבר למסלול הארועים המוביל להתמיינות פרחים המונע המשך הסתעפות ומקבע פנוטיפ לא מסועף של קנוקנת. על מנת ללמוד על קשר אפשרי בין ביטוי VvTFL1A להתמיינות תפרחת הוחלט לנצל את הפלסטיות ההתפתחותית של הקנוקנת הצעירה ולבחון מתאם בין המהפך ממופע קנוקנת למופע תפרחת לבין שינוי בדגם הביטוי של הגנים המבקרים התמיינות תפרחת בארבידופסיס. בספרות דווח שקנוקנות סולטנינה צעירות הקצרות מ-7 מ"מ (אורך הקנוקנות המרוחקות 1-2 פרקים מקודקוד) שטופלו בציטוקינין התמיינו לתפרחות ומערכת דומה הוקמה למטרה המצויינת מעל. מאחר והזן סולטנינה הינו זן ארוך זמירה בדומה לזן סופיריור ומאחר ודווח בעבר כי קנוקנות משריגים לטראליים של זן זה מגיבות לטיפול בציטוקינין נעשה הניסוי בזן סולטנינה. משריגים לטראלים נאספו קנוקנות המרוחקות 1 - 3 פרקים מקודקוד הצימוח וגודלו על גבי מצע מזון נוזלי בתוספת ציטוקינין (PBA) וללא ציטוקינין כביקורת. לאחר שבוע התרחבו קודקודי הקנוקנות המטופלות ונפרשו, בניגוד לקנוקנות הביקורת בהן קודקוד הקנוקנת נראה כראש נחש האופייני. לאחר 14 יום התפתחו על חלק מהקנוקנות המטופלות מבנים דמויי תפרחת ללא התמיינות של אברי פרח (תמונה 8). לאחר 30 יום היו כל הקנוקנות המטופלות בעלי קודקוד מורחב, בחלקן נראה הקודקוד מסועף ומפורץ ובחלק מהקנוקנות נראה מופע של תפרחת (תמונה 8).

לאחר 14 יום נדגמו קנוקנות ממצע המזון ונבחנו רמת תעתיק הגנים VvTFL1A, VFL ו-VAP1 באמצעות Real time PCR. רמת תעתיק הגן VvTFL1A בקנוקנות המטופלות בציטוקינין הייתה גבוהה פי 21 מרמת תעתיק הגן בקנוקנות הביקורת (תמונה 9A). לעומת זאת, רמת תעתיק הגן VAP1 הייתה גבוהה פי 6 בקנוקנות הביקורת ביחס לרמת תעתיק הגן בקנוקנות המטופלות (תמונה 9B). רמת תעתיק הגן VFL הייתה זהה בין הטיפולים השונים (תמונה 9C).

בדומה לממצאים שהתקבלו במעקב אחר השתנות הביטוי בפקעים לטנטים במהלך התפתחותם נמצא גם בניסוי זה מתאם בין עליה ברמת תעתיק הגן VvTFL1A להתמיינות תפרחות. ממצאים אלו תומכים בהנחה כי גן זה מעורב בבקרת על התמיינות התפרחת. יחד עם זאת, הועלתה האפשרות כי העלייה בביטוי הגן אינה מייצגת חוליית ביניים בבקרת התמיינות התפרחת על ידי ציטוקינין, והינה פועל יוצא מן העובדה שהושרתה התמיינות תפרחת על ידי ציטוקינין. במקרה כזה צפוי שביטוי הגן לא יושפע על ידי ציטוקינין.

השפעת ציטוקינין על ביטוי מהפרומוטור של VvTFL1A

על מנת לבחון את סוגיית הקשר בין ציטוקינין וביטוי VvTFL1A נעשה שימוש בתאי קאלוס טרנסגנים המכילים מקטע של 1565 חומצות גרעין במעלה הזרם לגן VvTFL1A (שהונח כי ייצגו את הפרומוטור של הגן) המצומד לשני גנים מדווחים GFP ו-GUS (pVvTFL1A::GFP::GUS). קו תאים זה שכונה TPa גודל על מצע מזון במקביל לתרבית תאי סופיריור שמייצגים את זן הבר ששימש להתמרה. קיום המחדר בתרבית המותמרת נבחן ב-PCR תוך שימוש ב-DNA גנומי (תמונה 10) ותרבית שהכילה את המחדר הועברה למצעי מזון המעודדים רגנרציה בתוספת של ציטוקינין (12µM Zeatin) ובהעדור, כבקורת. התאים נבחנו פעמיים בשבוע בבינוקולר ולאחר 3 שבועות נראה סיגנל GFP חזק בתאים שגודלו על מצע מזון המכיל ציטוקינין. בשלב זה נבחנו התאים גם במיקרוסקופ קונפוקלי (תמונה A-B10). לעומת זאת, בתאי הביקורת נצפה סיגנל GFP חלש ביחס לתאים המטופלים (תמונה C-10).

(D). יש לציין שסיגנל ה GFP היה ממודר לאזורים ספציפיים בתרבית (ירוק) ונפרד מהסיגנל הפלורוסנטי הטבעי שנראה ברוב התרבית (אדום).

בשלב זה נאספו התאים, הופקו מהם כלל החלבונים ונמדדה פעילות החלבון GUS כ nM תוצר למ"ג חלבון בדקה (nM product/mg protein in 1 min). נמצא כי פעילות החלבון GUS בתאים שגודלו על מצע מזון המכיל ציטוקינין הייתה גבוהה פי שלוש מרמת פעילות החלבון בתאי הביקורת (תמונה 11A). בהתאמה, נמצא כי רמת תעתיק הגן VvTFL1A בתאי L12 שלא עברו התמרה אולם גודלו במשך שבועיים על מצע מזון המכיל ציטוקינין הייתה גבוהה פי 21 מרמת ביטוי בתאים שגדלו על מצע הביקורת (תמונה 11B).

מדידת רמת ציטוקינינים בפקעים פוריים לאורך השריג הראשי

על בסיס המידע שהתקבל עד כה הועלתה ההשערה כי ביטוי מוגבר של VvTFL1A בפקעים פוריים חל כתוצאה מרמות ציטוקינין גבוהות יותר בפקעים אלו, בהשוואה לרמתם בפקעים לא פוריים. לבחינת הנחה זו נבדקה רמת הציטוקינינים האנדוגנים בפקעים מעמדות עליונות ותחתונות שנאספו בשנים 2003 ו 2005 לפני פריחה (שבוע 1) ובזמן פריחת התפרחות על השריגים הראשיים ולאחריה (שבוע 3 – 6), חלון הזמן בו חלה התמיינות ה-UCM בפקעים. נבדקה רמתם של פרקורסורים לציטוקינינים פעילים (cytokinin phosphates: *trans*-zeatin-, isopentenyladenine -and dihydrozeatin- riboside phosphates;) ורמת ציטוקינין פעיל (סכום של *trans*-zeatin, isopentenyladenine adenine, dihydrozeatin והריבוזידים המתאימים) (תמונה 12). גם רמתם של הפרקורסורים וגם רמת הציטוקינין הפעיל היו גבוהות בפקעים העליונים ביחס לרמתם בפקעים התחתונים בכל נקודות הזמן שנבדקו. ההבדל המשמעותי ביותר ברמתם של הפרקורסורים נראה לפני שיא פריחה (שבועות 1 – 3) כאשר רמת הפרקורסורים (בעיקר *trans*-zeatin riboside phosphate ו- isopentenyladenine riboside phosphate המייצגים כ 55% ו 35% מהפרקורסורים בזמן זה בהתאמה) הייתה גבוהה פי 7 בפקעים עליונים בשבוע 1 ופי 4 בשבוע 3 ביחס לרמתם בפקעים תחתונים. באותו זמן ציטוקינין פעיל (בעיקר *trans*-zeatin) היה גבוה פי 3 בפקעים עליונים ביחס לרמתו בפקעים תחתונים. בשיא פריחה (שבועות 4 – 5) הצטמצמו ההבדלים בין פקעים עליונים לתחתונים אך רמת ציטוקינין פעיל הייתה גבוהה לפחות פי 2 בפקעים עליונים. לאחר הפריחה (שבוע 6) ההבדלים בין פקעים עליונים לתחתונים היו קטנים. התוצאות שהתקבלו עד כה תומכות בהנחה כי לגן VvTFL1A תפקיד בבקרה על התמיינות תפרחות וכי גן זה מושפע מההורמון הצמחי ציטוקינין הידוע כמעודד התמיינות תפרחות בגפן.

בעברנמצא כי גיברלין מונע התמיינות תפרחות בגפן ועיכוב בייצור ההורמון האנדוגני או בהעברת סיגנל גיברלין הובילו להתמיינות תפרחות מה-UCM. לפיכך נבחן בהמשך קשר בין גיברלין, התמיינות תפרחות וביטוי הגנים VFL, VAP1 ו VvTFL1A.

השפעת מעכב סינטזת גיברלינים על התמיינות תפרחות ומעקב אחר רמת תעתיקי הגנים המבקרים התמיינות תפרחות

גפנים מהזן פרלט שגודלו בעציצים וגפנים מהזן סולטנינה בכרם רוססו במעכבי סינטזת גיברלינים [3.1mM Chlorocholine chloride (CCC) ו- [0.8mM paclobutrazole (PAC)] בהתאמה. הגפנים רוססו במשך 3 שבועות, אחת לשבוע, ולאחר מכן נערך מעקב אחר התפתחות השריג. לאחר כ- 4 שבועות התמיינו תפרחות במקום קנוקנות על גבי השריג הראשי בזן פרלט (תמונה 13). תוצאות דומות התקבלו עבור שריגים לטרלים בזן סולטנינה (תוצאות לא מובאות) ונראה כי שני הטיפולים מובילים לפנוטיפ זהה.

אנליזת In situ לבחינת השפעת מעכב סינטזת גיברלינים PAC על ביטוי הגן VvTFL1A בקודקוד השריג

באנליזת In Situ שנערכה לקודקודי הצימוח של צמחי סולטנינה ניתן להבחין כי בקודקודים שטופלו במעכב סינטזת גיברלינים PAC התמיינו תפרחות ואילו בקודקודי הביקורת התמיינו קנוקנות כרגיל. ביטוי חלש של הגן VvTFL1A נראה בקנוקנות וביטוי חזק נראה בתפרחות, בעיקר בקצות הסעיפים המתפצלים (תמונה 14). בשלב זה לא ניתן היה להבחין בהתמיינות אברי פרחים על גבי התפרחת.

השפעת מעכב סינטזת גיברלינים על התפתחות קנוקנות צעירות ועל רמת תעתיקי הגנים VFL, VAP1 ו- VvTFL1A

קנוקנות מנותקות שגודלו עם וללא תוספת מעכב סינטזת גיברלינים [3.1mM (500ppm)] Chlorocholine chloride (CCC) בדומה לטיפול ב-PBA, שתואר מעל, נאספו שבועיים לאחר ההכנסה לתרבית ונבדקו בבינוקולר ובמיקרוסקופ אלקטרוני (תמונה

15). בחלק מהקונקות התמיינו תפרחות, שהיו קטנות יותר בהשוואה לאלו שהתפתחו בתגובה לטיפול ב-PBA, ובמיקרוסקופ אלקטרוני סורק נראה היה שאין התמיינו תפרחות אחת אלא מספר רב של תפרחות קטנות צמודות. בנוסף נבדקה רמת תעתיקי הגנים *VvTFL1A*, *VAP1* ו-*Real time PCR* (תמונה 16). מהתוצאות עלה כי רמת תעתיק הגן *VvTFL1A* הייתה גבוהה בקונקות המטופלות ביחס לביקורת, כפי שנמצא עבור הטיפול ב-PBA, אם כי היחס בין רמות התעתיק בקונקות הטיפול והביקורת היה קטן בהרבה ועמד על פי 2.8 בלבד. בשונה מן הממצאים שדווחו מעל עבור קונקות שטופלו ב-PBA, לא נמצא הבדל ברמת תעתיק הגן *VAP1* בין הטיפול לביקורת, ולעומת זאת רמת תעתיק הגן *VFL* הייתה גבוהה פי 1.5 בקונקות המטופלות ביחס לקונקות הביקורת.

השפעת מעכב סינטזת ג'יברלינים CCC על ביטוי גנים מדווחים הנמצאים תחת בקרה של מקטע מהפרומוטור של הגן *VvTFL1A*
על מנת לבדוק האם עיכוב סינטזת ג'יברלינים מקדם ביטוי מהגן *VvTFL1A* נבדקה השפעתו של CCC על ביטוי מהגן *VvTFL1A* על ידי שימוש בתאי קאלוס המכילים את המחדר *pVvTFL1A::GFP::GUS* (תמונה 17), בדומה לניסוי שבחן את השפעתו של Zeatin. תאי קאלוס גודלו במשך 3 שבועות על מצע מזון המעודד רגנרציה ללא תוספת מעכב סינטזת ג'יברלינים, כביקורת, ובתוספת מעכב סינטזת ג'יברלינים (600 μ M CCC). ריכוז CCC נבחר על בסיס ניסיון פרלימינרי שהראה כי ריכוזים גבוהים יותר היו לטאליים. לאחר 3 שבועות נאספו תאים, נבדקה רמת פעילות החלבון GUS ולא נמצאו הבדלים ברמת הפעילות בין הטיפול לביקורת.

השפעת ג'יברלין מסוג GA_3 על התמיינו תפרחות ורמת תעתיק הגנים המבקרים התמיינו תפרחות

בסקירה שנערכה בכרם ההשבחה של מנהל המחקר החקלאי אותר קו 4056 שעל השריגים הלטרלים שלו התמיינו תפרחות ולא קונקות, בניגוד לנורמה. בשנה שלאחר מכן השריגים היו בעלי מופע רגיל אך בתגובה לטיפול יחיד במעכב סינטזת ג'יברלינים (0.8mM PAC) התמיינו תפרחות במקום קונקות בכל השריגים הלטרלים שפרצו לאחר שלושה שבועות משריגים ראשיים מטופלי PAC (תמונה 18, שריג ימני). בשלב זה נאספו קודקודי צימוח משריגים שרוססו ב-PAC ונבדקה רמת תעתיקי הגנים *VvTFL1A*, *VFL* ו-*VAP1* באמצעות *Real time PCR* (תמונה 19). לאחר איסוף הקודקודים נטבלו חלק מהשריגים הלטרלים, שטופלו בשלב הראשון ב-PAC, בג'יברלין אקסוגני (115μ M GA_3) על מנת לבחון אם טיפול זה יבטל את ההשפעה החיובית של PAC על עידוד התמיינו תפרחות ויוביל להתמיינו חוזרת של קונקות על גבי השריגים. הטבילה נעשתה פעמיים במרווח של שבועיים בין שני מועדי הטבילה. לאחר 4 שבועות מהמועד הראשון בו יושם GA_3 נראה כי על גבי שריגים לטרלים שטופלו ב- GA_3 התמינו קונקות, וזאת בניגוד לשריגים שטופלו ב-PAC בלבד (תמונה 18-שריג שמאלי).

בדומה למתואר לעיל נאספו קודקודים גם לאחר שבועיים וארבעה שבועות מיישום GA_3 משריגים מטופלים ומשריגי ביקורת שנטבלו במים בלבד (ראוי להזכיר כי כל השריגים טופלו בראשית הניסיון ב-PAC). נבחנה רמת תעתיקי הגנים *VvTFL1A*, *VAP1* ו-*VFL* באמצעות *Real time PCR*.

בקודקודי שריגים שנטבלו ב- GA_3 נמצאה לאחר שבועיים מטיפול ירידה בביטוי שלושת הגנים הנבחנו אם כי רמת תעתיק הגן *VvTFL1A* לא הייתה שונה באופן מובהק מרמת תעתיק הגן בפקעי הביקורת. לעומת זאת, בקודקודי שריגים שלא טופלו לא חל שינוי מובהק ברמת תעתיק הגנים בהשוואה לרמת התעתיקים במועד הטיפול (תמונה A19).

בקודקודים שנדגמו לאחר 4 שבועות ממועד הטיפול נמצא כי רמת התעתיק *VvTFL1A* נמוכה מרמת תעתיק הגן בביקורת, זאת מאחר ורמת תעתיק הגן *VvTFL1A* ירדה בהשוואה לרמת התעתיק בנקודות הדגימה הקודמות, אם כי לא באופן מובהק. לעומת זאת, רמת תעתיק הגן בפקעי הביקורת לא השתנתה בכל שלושת מועדי הדגימה. בשריגי הביקורת רמת תעתיקי הגנים *VFL* ו-*VAP1* לא השתנתה בין דוגמאות שנאספו בשבוע השני והרביעי (תמונה B-C19). לעומת זאת, נמצא כי רמות תעתיקי *VAP1* ו-*VFL* בשריגים המטופלים ב- GA_3 עלתה לאחר 4 שבועות באופן מובהק (פי 1.5 עבור *VFL* ופי 2 עבור *VAP1*), ביחס לרמתם בקודקודי השריגים המטופלים לאחר שבועיים, והייתה גבוהה גם מרמתם בקודקודי השריגים הלא מטופלים שנדגמו לאחר 4 שבועות.

מעקב אחר רמת תעתיקי גנים המעורבים במעבר סינגל וסינטזת ג'יברלינים בפקעים בעלי פוריות גבוהה ופקעים בעלי פוריות נמוכה במהלך התמיינו המריסטמה הרפרודוקטיבית בעונת הגידול הראשונה

מאחר ונמצא כאן ובעבר כי לגיברלינים יש השפעה שלילית על התמיינות תפרחות הועלתה ההשערה כי רמת גיברלינים ו/או רגישות הפקעים לגיברלינים תהיה שונה בין פקעים פוריים ופקעים לא פוריים בתקופת ההתמיינות הרפרודוקטיבית.

ריכוז הגיברלינים בפקעים לא נבדק בעבודה הנוכחית בהעדף אמצעים מתאימים לקביעה מדויקת אולם האנליזה הטרנסקריפטומית שנערכה כמתואר מעל העלתה הבדל מובהק ברמתו של ההומולוג מגפן לֶגן *GID1b* מארבידופסיס הידוע כקולטן של גיברלינים. ידוע כי רמתם של הקולטנים היא גורם מרכזי ביכולת חישה של גיברלינים ולפיכך נעשה אימות לממצאים בעזרת Real time PCR מפקעים שנאספו ב-2005 כפי שתואר מעל. מהתוצאות שהתקבלו נראה כי רמת תעתיק הגן הייתה גבוהה בפקעים הלא פוריים (התחתונים) ביחס לפקעים הפוריים (עליונים) לאורך כל שבועות הדגימה כאשר הבדלים של פי 2 ויותר נראו בזמן הפריחה והתמיינות מריסטמת ה-UCM בין השבועות 1 – 6 (תמונה 20).

על בסיס ההשערה כי פקעים תחתונים הם רגישים יותר לגיברלינים מפקעים עליונים, שנתמכת על ידי הרמה הגבוהה יותר של הגלאי *VGIDb*, נעשה נסיון לבחון אם תתקיים השפעה דיפרנציאלית של גיברלין אקסוגני GA_3 על ביטויים של ההומולוגים לגנים *GA20ox* ו-*GA3ox* מארבידופסיס, שנמצא כי ביטויים יורד בתגובה לתוספת גיברלינים אקסוגנים כתוצאה מהיזון חוזר. פקעי סופרירור מעמדות עליונות ותחתונות נדגמו בשיא פריחה וכשבועיים לאחר מכן. בכל אחד משני המועדים הונחו הפקעים על מצע מזון ללא תוספת הורמונים למשך 24 שעות ולאחר מכן נטבלו בגיברלין אקסוגני ($115 \mu M GA_3$) למשך 5 דקות או במים כביקורת. רמת תעתיקי הגנים *VGA20ox* ו-*VGA3ox* ההומולוגים לגנים *GA20ox* ו-*GA3ox* מארבידופסיס, נבדקה מיד לפני הטיפול ב- GA_3 ושעה לאחריו בעזרת Real time PCR. מיצוע הנתונים בשני מועדי הבדיקה הראה כי רמת תעתיק הגן *VGA20ox* הייתה גבוהה בפקעים התחתונים לאחר 24 שעות במצע המזון וכשעה לאחר יישום GA_3 ירדה פי 12. רמת תעתיק הגן בפקעים העליונים הייתה נמוכה יותר לאחר 24 שעות במצע המזון, בהשוואה לפקעים תחתונים, ולא השתנתה באופן מובהק (תמונה 21). רמת ביטוי הגן *VGA3ox* לא נבדלה באופן מובהק בין העמדות ובין מועדי הדגימה (תוצאות לא מובאות).

על בסיס הנתונים שהתקבלו במחקר הנוכחי מוצע מודל (תמונה 22) לפיו לאחר התמיינות ה-UCM ופיצול מריסטמה זו לשתי זרועות, נוכחות סיגנל חזק לפריחה, המעודד על ידי הורמונים צמחיים מקבוצת הגיברלינים ועל יד הגנים *VvFT* ו-*VFL*, יביא לעליה בביטוי הגן *VAP1* ולהתמיינות מהירה של קודקודי הסעיפים למריסטמת פרח. רכישת מאפיינים ראשוניים של פרימורדית פרח תוביל להפסקת תהליך הסיעוף ולהתמיינות מבנה של קנוקנת שאינה נושאת פרחים. לעומת זאת בתנאים המעודדים ביטוי גבוה של הגן *VvTFL1A*, כמו נוכחות רמה גבוהה של ציטוקינינים, תעוכב העליה בביטוי הגן *VAP1* בקודקודי הסעיפים, ויתאפשר המשך הסתעפות המריסטמות בקצות הסעיפים והתמיינות תפרחת.

מטרות המחקר לתקופת הדו"ח

מטרתו ארוכת הטווח של המחקר הינה לברר מה הוא המנגנון המבקר את פוריות הפקע. השערת המחקר היא כי בקרת מידת הסתעפות המריסטמה הרפרודוקטיבית (UCM) בפקעים לטנטים מעורבת בהכוונת התמיינות לקנוקנת או תפרחת ולפיכך היא עשויה להיות בעלת תפקיד מרכזי בבקרת פוריות הפקע.

עיקרי ההתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח:

(1) שימוש בגרדיאנט פוריות שעל השריג אפשר לזהות גנים שעשויים להיות מעורבים בבקרת התמיינות ה-UCM והסתעפותה, (2) תואר אופי המתאם בין רמות הביטוי של גנים אלו, וגנים שקשורים עימם בקשר תפקודי, לשלבי התפתחות רפרודוקטיבית בגפן ולדרגת פוריות הפקעים, (3) נמצא קרש בין רמות הביטוי של גנים אלו לטרנספורמציה של מופע האיבר הרפרודוקטיבי ולנוכחות גייברלינים וציטוקינינים, שהם בעלי השפעה מוכחת והפוכה על זהות האיבר המתמייין מה-UCM ועל פוריות הפקעים.

המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו: בעקבות התוצאות שהתקבלו במחקר הוצע מודל לפיו התמיינות מריסטמת ה-UCM לקנוקנת, לאחר חלוקה ראשונית לשתי זרועות, מבוקרת על ידי גנים המשרים התמיינות פרחים בקודקודי הזרועות ומונעים המשך פיצול הזרועות לתתי סעיפים. התמיינות זו היא ברירת המחדל בפקעים ובקודקוד הצימוח של השריג. עיכוב ביטוי גנים אלו בפקעים הפוריים על ידי תוצר הגן *VvTFL1A* מאפשר המשך התפצלות הזרועות לתתי סעיפים והתמיינות תפרחת. נראה כי מנגנון בקרה גנטי זה מבוקר על ידי ההורמונים הצמחיים מקבוצת הציטוקינינים והגייברלינים והיחס ביניהם המבקר ביטוי הגנים *VvTFL1A* או *VFL/VAP1*.

הבעיות שנתרו לפתרון והתייחסות המשך המחקר לגביהן.

תכנית המחקר הסתיימה והדו"ח הינו דו"ח מסכם

האם כבר הוחל בהפצת הידע? ניתנה הרצאה לחקלאים ופורסם מאמר (Crane et al., Planta 2012)

פרסום הדו"ח: מומלץ לפרסם את הדו"ח ללא הגבלה.

כותרות תמונות

תמונה 1: תאור פנולוגי של התפתחות השריג והפקע הלטנטי במהלך איסוף הדגימות הצמחיות. (A) מספר הפרקים על השריג הראשי במועד הדגימה השבועית. דגימה ראשונה נלקחה בראשית אפריל ותהליך הדגימה חזר על עצמו במשך שלוש שנים. עיגול שחור מסמן את מועד תחילת הפריחה. (B) מעקב אחר פקעים מעמדה עליונה פוריה שנדגם בשבוע 1,3,6 ו-9. SAM-מריסטמה קודקודית, UCM-מריסטמת אנלאגן שתפתח לקנוקנת או תפרחת, IA-זרוע פנימית של UCM, OA-זרוע חיצונית של UCM.

תמונה 2: השפעת עמדת הפקע על ביטוי מהגן VFL והגן VAP1 /רמת הביטוי של הגן בפקעים בסיסיים ולא פוריים (משולשים) ובפקעים עליונים ופוריים (מרובעים) נבחנה תוך שימוש ב real time PCR. הביטוי נורמל כנגד אקטין ומוצג ערך הביטוי היחסי (RE). התוצאות מייצגות ממוצע של שתי חזרות ביולוגיות ושתי חזרות טכניות לכל דגימה ביולוגית. מוצגת שגיאת התקן.

תמונה 3: השפעת ביטוי ביתר של API מגפן על מופע של צמחי ארבידופסיס

תמונה 4: השפעת עמדת הפקע (תמונה שמאל) ועמדת העלה (תמונה ימני) על ביטוי מהגן VvFT. יתר הפרטים זהים למתואר בתמונה 2.

תמונה 5: השוואת ביטוי של בקרי התפתחות רפרודוקטיבית במהלך התפתחות קנוקנת ובמהלך פריצת פקעים בוגרים מתרדמה. לפרטי אנליזה ראה תמונה 1 ולפרטים על שלבי הדגימה ראה טקסט.

תמונה 6: רמת תעתיק הגן VvSOC1 בפקעי 'סופיריור' עליונים ותחתונים במהלך התפתחותם על השריג. רמת תעתיק הגן VvSOC1 בפקעים עליונים ותחתונים שנאספו במשך 10 שבועות משבועיים לפני פריחה. משולשים מציינים פקעים מעמדות תחתונות וריבועים פקעים מעמדות עליונות פוריות. יתר הפרטים כמתואר בתמונה 2.

תמונה 7: בחינה במיקרוסקופ סורק ובחינת רמת תעתיק הגנים VAP1, VFL, VTFL1 ו VvSOC1 בפקעים המתפתחים על גבי השריג הלטרלי. A- אנליזה במיקרוסקופ אלקטרוני סורק של פקעים המתמיינים על גבי השריג הלטרלי. פקע 4 מרוחק כ 4 פרקים מקודקוד השריג ובהתאמה פקע 14 מרוחק כ 14 פרקים מקודקוד השריג ומייצג את הפקעים הבוגרים ביותר. B-E: רמת תעתיקי VAP1, VFL, VTFL1 ו- VvSOC1 בפקעים שנאספו כמצויין בסעיף A.

תמונה 8: בחינה בבינוקולר ובמיקרוסקופ אלקטרוני סורק של קנוקנות על גבי מצע מזון. קנוקנות סולטנינה המרוחקות 1 – 3 פרקים מקודקוד הצימוח נאספו משריגים לטרלים. הקנוקנות גודלו על מצע מזון נוזלי ללא (Control) ובתוספת ציטוקינין [10µM N-Benzyl-9-(2- tetrahydropyranyl)adenine (PBA)] במשך 30 יום. קנוקנות נבחנו בבינוקולר לאחר 7 ימים, 14 יום ו 30 יום ובמיקרוסקופ אלקטרוני סורק לאחר 14 יום.

תמונה 9: רמת תעתיק הגנים VAP1, VTFL1 ו VFL בקנוקנות שגודלו על מצע מזון. קנוקנות גודלו על מצע מזון ללא ציטוקינין (עמודות אפורות) ובתוספת ציטוקינין (עמודות שחורות) כמתואר בתמונה 8 ונאספו לאחר 14 יום לבחינת רמת תעתיק הגנים כפי שהתקבל באנליזת Real PCR time כמתואר בתמונה 2. A- רמת תעתיק הגן; B- VTFL1; רמת תעתיק הגן; C- VAP1; רמת תעתיק הגן VFL.

תמונה 10: ביטוי GFP בתאי L12 הנושאים את המחדר pVvTFL1A::GFP::GUS. תאי קאלוס מותמרים הנושאים את המחדר VvTFL1A::GFP::GUS קודדו במשך 3 שבועות על מצע מזון המעודד רגנרציה בתוספת ציטוקינין (12µM Zeatin) וללא כביקורת. A – תאי קאלוס שגודלו על ציטוקינין וצולמו בבינוקולר. B – תאי קאלוס שגודלו על ציטוקינין וצולמו במיקרוסקופ קונפוקלי. C – תאי קאלוס שגודלו ללא ציטוקינין וצולמו בבינוקולר. D – תאי קאלוס שגודלו ללא ציטוקינין וצולמו במיקרוסקופ קונפוקלי.

תמונה 11: רמת פעילות GUS ורמת תעתיק הגן VTFL1 בתאי קאלוס L12 מותמרים ולא מותמרים. A – רמת פעילות החלבון GUS (nM product/mg protein in 1 min) בתאי L12 מותמרים הנושאים את המחדר pVvTFL1A::GFP::GUS לאחר שלושה שבועות על מצע מזון המעודד רגנרציה. עמודה שחורה: תאים שגודלו על מצע מזון בתוספת ציטוקינין. עמודה אפורה: תאים שגודלו על מצע ביקורת כמתואר בתמונה 10. B – רמת תעתיק הגן VTFL1 בתאי L12 לא מותמרים שגודלו במשך שבועיים על מצע מזון המעודד רגנרציה. עמודה שחורה: תאים שגודלו על מצע מזון בתוספת ציטוקינין. עמודה אפורה: תאים שגודלו על מצע ביקורת.

תמונה 12: רמת ציטוקינין אנדוגני ופרקורסורים של ציטוקינין בפקעים עליונים ותחתונים בזמן התמיינות התפרחת. A – רמת פרקורסור של ציטוקינין, ציטוקינין מזורחן (*trans*-zeatin-, isopentenyladenine-, dihydrozeatin- riboside phosphates) בפקעים עליונים (סגול) ובפקעים תחתונים (ירוק). B – רמת סה"כ ציטוקינין פעיל (*trans*-zeatin, isopentenyladenine, dihydrozeatin and the corresponding ribosides) בפקעים עליונים (סגול כהה) ובפקעים תחתונים (ירוק כהה). ורמת Zeatin riboside ו Zeatin בפקעים עליונים (סגול בהיר) ובפקעים תחתונים (ירוק בהיר).

תמונה 13: השפעת מעכב סינטזת ג'יברלינים (CCC) על התמיינות קנוקנות בשריג הראשי מהזן פרלט. גפני פרלט שגודלו בעציצים רוססו במעכב ג'יברלינים [3.1mM Chlorocholine chloride (CCC)] במשך 3 שבועות, אחת לשבוע. לאחר כ 4 שבועות התמיינו תפרחות על גבי השריג בגפנים המרוססות (שני שריגים עליונים) בניגוד להתמיינות קנוקנות בגפני הביקורת (שריג תחתון).

תמונה 14: השפעת מעכב סינטזת ג'יברלינים (PAC) על ביטוי מהגן *VvTFL1A* בתפרחות שהתמיינו מקודקדי צימוח בשריגים לטרלים. אנליזת *In situ* לשריגים לטרלים מהזן סולטנינה. **B-A:** היברידיזציה של הגן השלם כולל מקטע 3'UTR באוריינטציה Antisense. **A:** ביטוי חלש של הגן *VvTFL1A* בקונקנת המתמיינת מקודקוד שריג הביקורת. **B:** ביטוי הגן *VvTFL1A* נראה בתפרחת המתמיינת מקודקוד השריג המטופל במעכב סינטזת ג'יברלינים. ביטוי הגן נראה בעיקר בקצוות הסעיפים המתפצלים.

תמונה 15: בחינה בביוקולר ובמיקרוסקופ אלקטרוני סורק של השפעת מעכב סינטזת ג'יברלינים CCC על קונקנות שגדלו במצע מזון. קונקנות סולטנינה המרוחקות 1-3 פרקים מקודקוד הצימוח נאספו משריגים לטרלים. הקונקנות גודלו על מצע מזון נוזלי ללא (Control) ובתוספת מעכב סינטזת ג'יברלינים [3.1 mM Chlorocholine chloride (CCC)] במשך 14 יום (=500 ppm). קונקנות נבחנו בביוקולר ובמיקרוסקופ אלקטרוני סורק לאחר 14 יום.

תמונה 16: השפעת מעכב סינטזת ג'יברלינים (CCC) על רמת תעתיקי הגנים *VvTFL1A*, *VAP1* ו-*VFL* בקונקנות שגודלו על מצע מזון. קונקנות גודלו על מצע מזון ללא מעכב סינטזת ג'יברלינים (CCC) (עמודות אפורות) ובתוספת מעכב סינטזת ג'יברלינים (עמודות שחורות) כמתואר בתמונה 15 ונאספו לאחר 14 יום לבחינת רמת תעתיקי הגנים באנליזת Real time PCR כמתואר באיור 6. **A:** רמת תעתיק הגן *VvTFL1A*. **B:** רמת תעתיק הגן *VAP1*. **C:** רמת תעתיק הגן *VFL*.

תמונה 17: השפעת מעכב סינטזת ג'יברלינים (CCC) על ביטוי מפרומוטור *VvTFL1A* בתאי קאלוס L12 מותמרים. רמת פעילות החלבון GUS ($\text{nm MU (mg protein}^{-1}\text{ min}^{-1})$) בתאי L12 מותמרים הנושאים את המחדר *pVvTFL1A::GFP::GUS* לאחר שלושה שבועות על מצע מזון המעודד רגנרציה. עמודה שחורה: תאים שגדלו על מצע מזון בתוספת מעכב סינטזת ג'יברלינים (600 μM CCC) עמודה אפורה: תאים שגדלו על מצע ביקורת.

תמונה 18: השפעת מעכב סינטזת ג'יברלינים (PAC) וג'יברלין (GA_3) על מופע השריגים הטרלים בזן 4056. שריג ימני - שריג לטרלי מהזן 4056 שטופל בריסוס יחיד במעכב סינטזת ג'יברלינים (0.8mM PAC) לאחר 3 שבועות ממועד הריסוס. שריג שמאלי - שריג שטופל ב-PAC ולאחר 4 שבועות בג'יברלין אקסוגני ($115\mu\text{M GA}_3$), כאשר הטבילה נעשתה פעמיים במרווח של שבועיים בין שני מועדי הטבילה.

תמונה 19: השפעת GA_3 על רמת תעתיקי הגנים *VvTFL1A*, *VAP1* ו-*VFL* בקודקדי שריגים לטרלים מהזן 4056 לאחר יישום מעכב סינטזת ג'יברלינים (PAC). קודקדי שריגים לטרלים רוסו במעכב סינטזת ג'יברלינים PAC כמתואר בתמונה 18 ולאחר מכן נטבלו בג'יברלין אקסוגני GA_3 (ריבועים) ובמים כביקורת (משולשים). נדגמו קודקודים במועד יישום GA_3 ולאחר שבועיים וארבעה שבועות ממועד זה, ובדקה רמת תעתיקי הגנים באנליזת Real time PCR כמתואר באיור 6. **A:** רמת תעתיק הגן *VvTFL1A*. **B:** רמת תעתיק הגן *VAP1*. **C:** רמת תעתיק הגן *VFL*.

תמונה 20: רמת התעתיק מהגן *VGIDb* בפקעי סופיריור עליונים ותחתונים במהלך התפתחותם על השריג. רמת תעתיק הגן *VGIDb* נבחנה בציפים המסחריים של חברת Affymetrix עבור פקעים שנדגמו בשנים 2003 ו-2004 (גרף עליון) וב- Real time PCR כמתואר באיור 6 עבור פקעים שנדגמו בשנת 2005 (גרף תחתון). משולשים מציינים פקעים מעמדות תחתונות וריבועים פקעים מעמדות עליונות פוריות.

תמונה 21: השפעת GA_3 על רמת תעתיקי הגן *VGA20ox* בפקעי סופיריור מעמדות עליונות ותחתונות. רמת תעתיק הגן *VGA20ox* בפקעים מעמדות עליונות פוריות (עמודות שחורות) ומעמדות תחתונות בעלות פוריות נמוכה (עמודות אפורות) על גבי השריג הראשי נבחנה באנליזת Real time PCR. פקעים נאספו בשיא פריחה ושבועיים לאחר מכן בכרם מהזן סופיריור. פקעים הופרדו מהשריג וגודלו על מצע מזון במשך 24 שעות. לאחר מכן נאספה דוגמא ראשונה והפקעים נטבלו בג'יברלין אקסוגני ($115\mu\text{M GA}_3$) למשך 5 דקות. לאחר שעה נאספה דוגמא נוספת. תוצאות מובאות מייצגות ממוצע משני מועדי האיסוף.

תמונה 22: מודל הבקרה על התמיינות תפרחות בגפן. על פי המודל המוצע בעבודה זו בשלב 1 מתמיינת מריסטמת ה-UCM מקודקוד הצימוח (SAM) ובשלב 2 נחלקת מריסטמה זו לשתי זרועות: זרוע חיצונית (OA) וזרוע פנימית (IA). סיגנל חזק לפריחה המבוקר על ידי ההורמון הצמחי מקבוצת הג'יברלינים והגן *VvFT* המבקר חיובית עליה ברמת תעתיקי הגנים *VFL* ו-*VAP1* יביא להתמיינות מהירה של קודקודי הסעיפים למריסטמת פרח והפיצול ייעצר. כתוצאה מכך תתמייין קונקנת שאינה נושאת פרחים. לעומת זאת, ביטוי גבוה של הגן *VvTFL1A* שביטוי מבוקר חיובית על ידי ציטוקינים יעכב עליה בביטוי גנים המקדמים התמיינות מריסטמת פרח בקודקוד הסעיפים ויאפשר המשך פיצול המריסטמה והתמיינות תפרחת. מבני ביניים דוגמת קונקנות הנושאות פרחים או תפרחות דמויות קונקנות יתקבלו בכרם כתוצאה מהשפעת תנאי סביבה וגידול על הגורמים המבקרים התמיינות קונקנות ותפרחות כפי שמצוינים באיור (קו מרוסק).

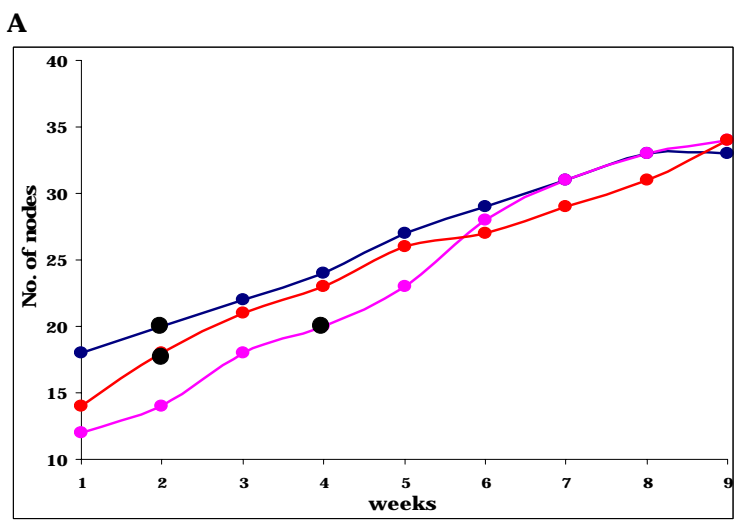


Fig.1

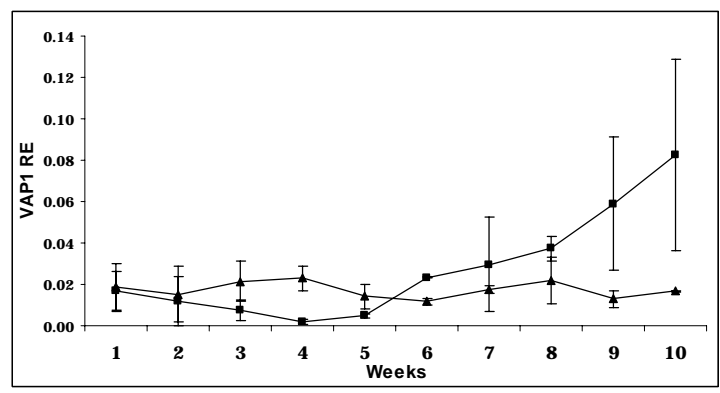
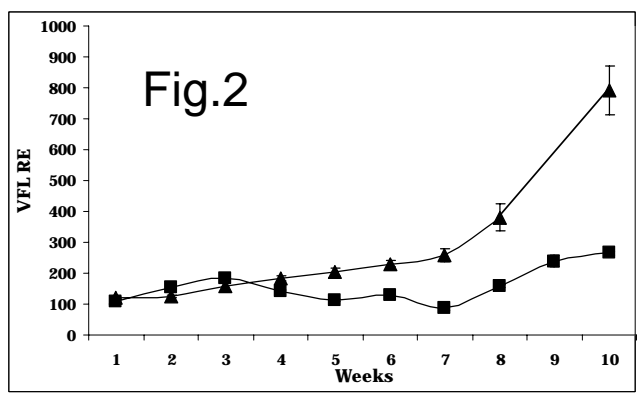
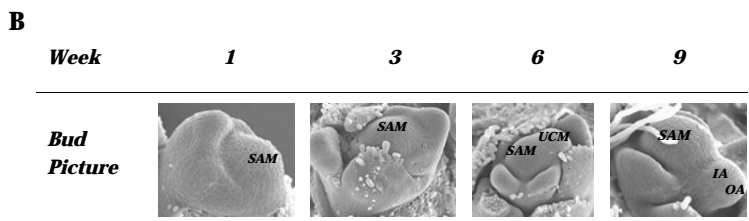
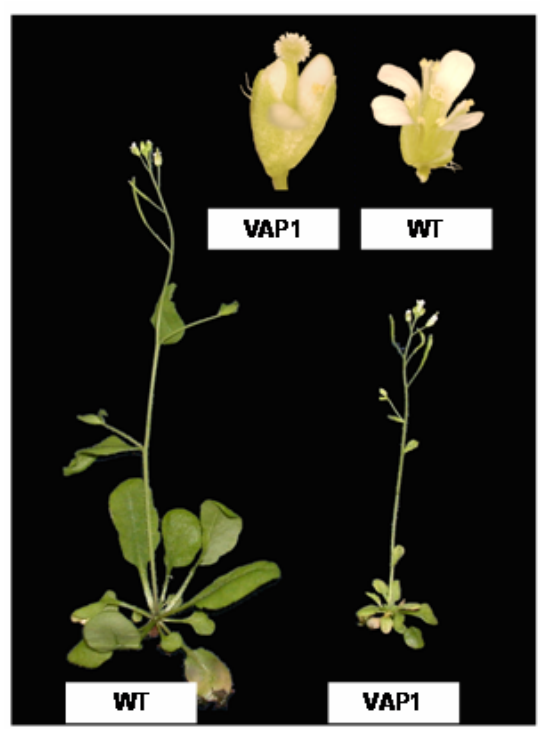
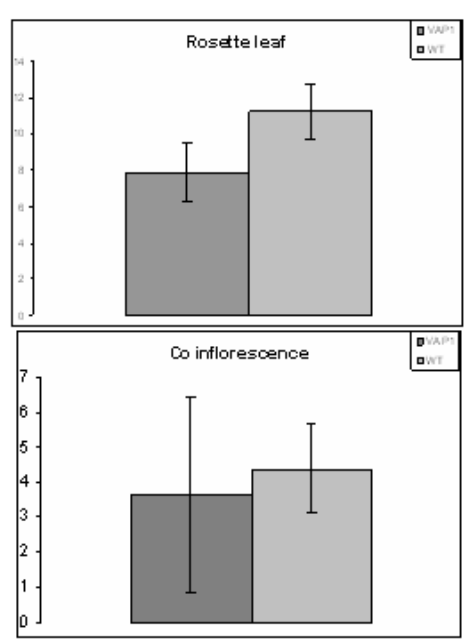
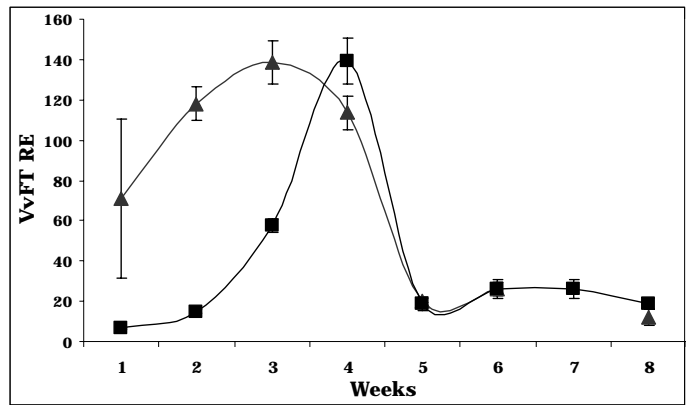
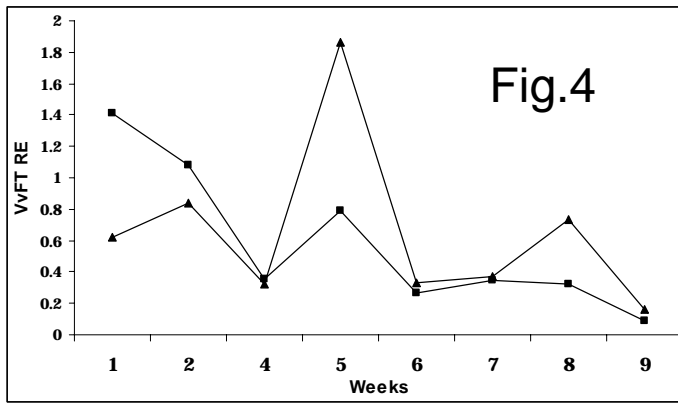
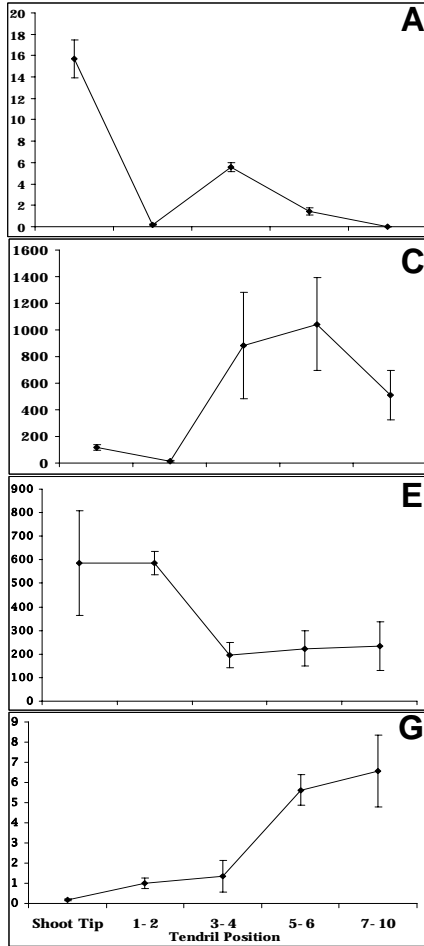


Fig.3





Expression profile during tendril development



Expression profile during bud break

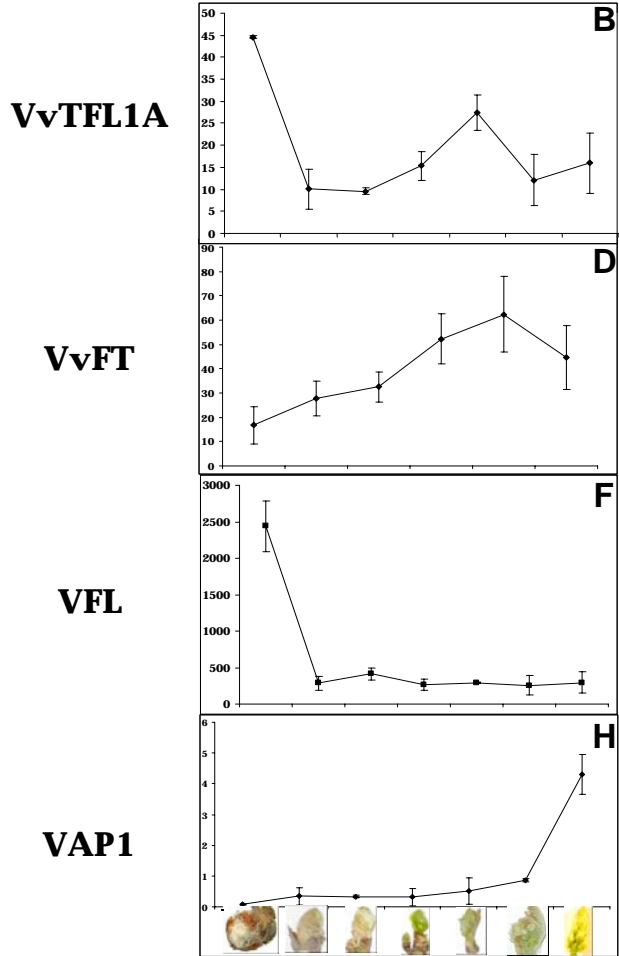


Fig.6

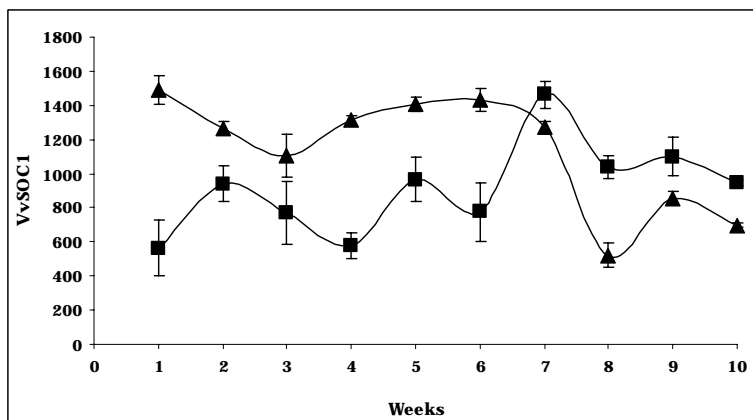


Fig.7

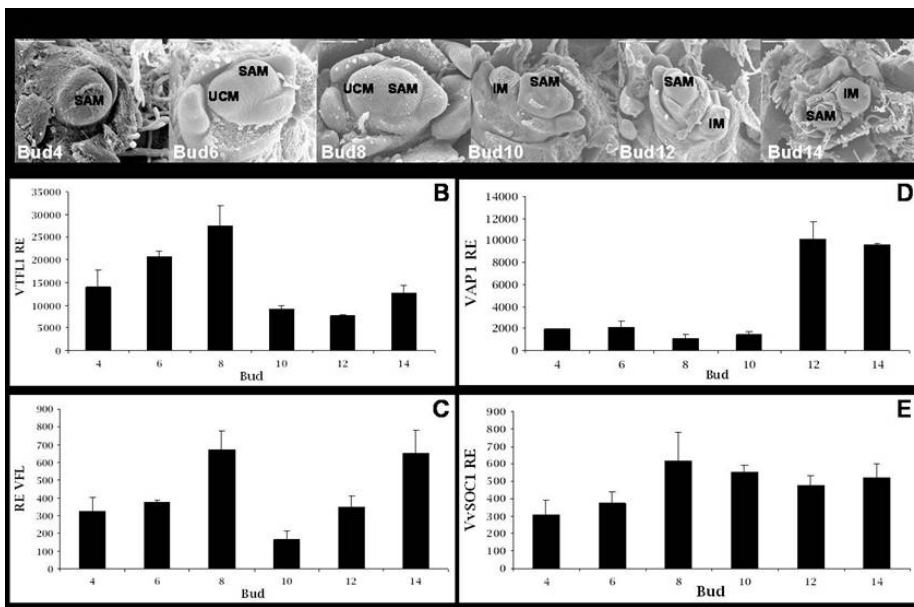


Fig.8

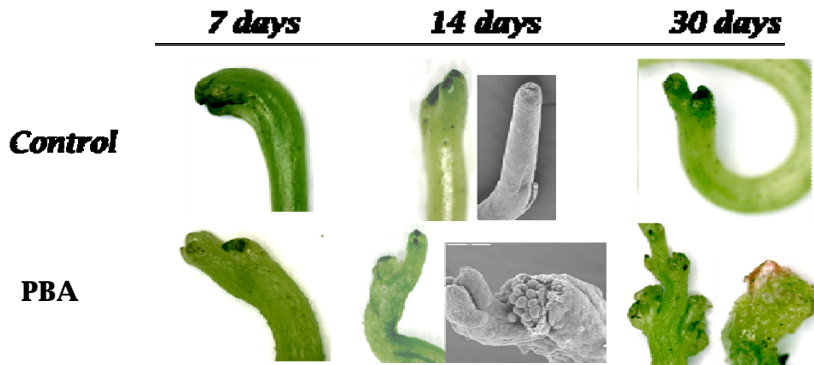


Fig.9

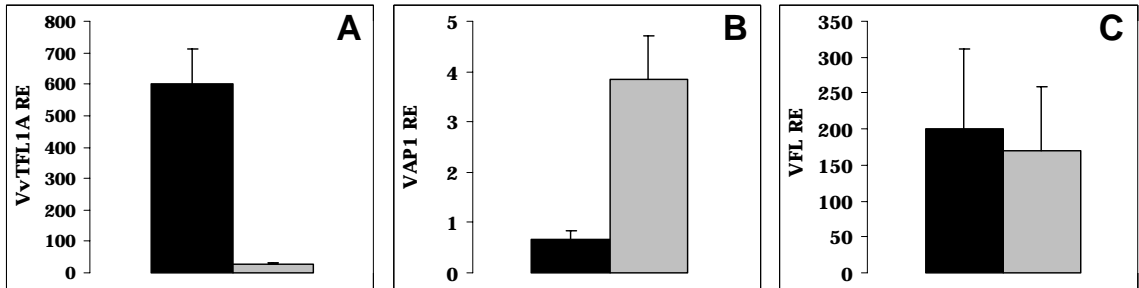


Fig.10

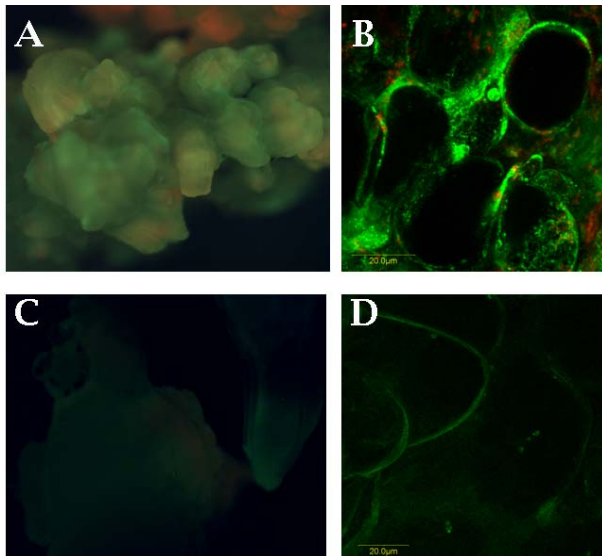


Fig.11

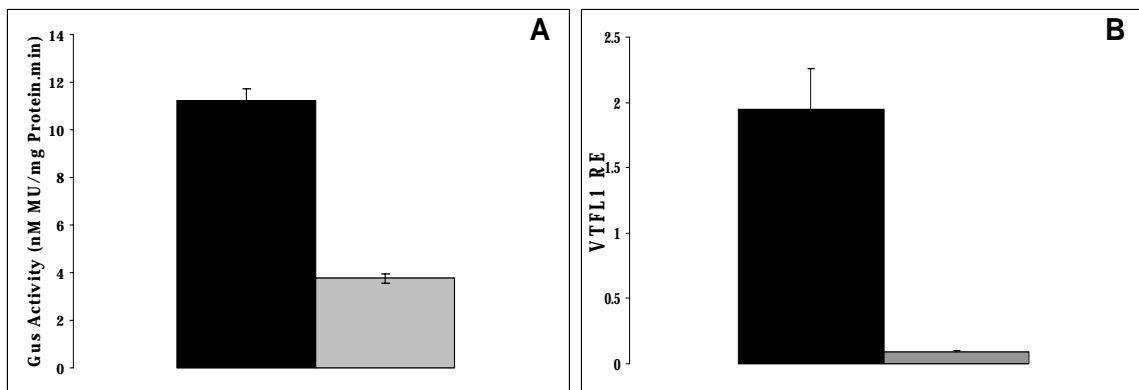


Fig.12

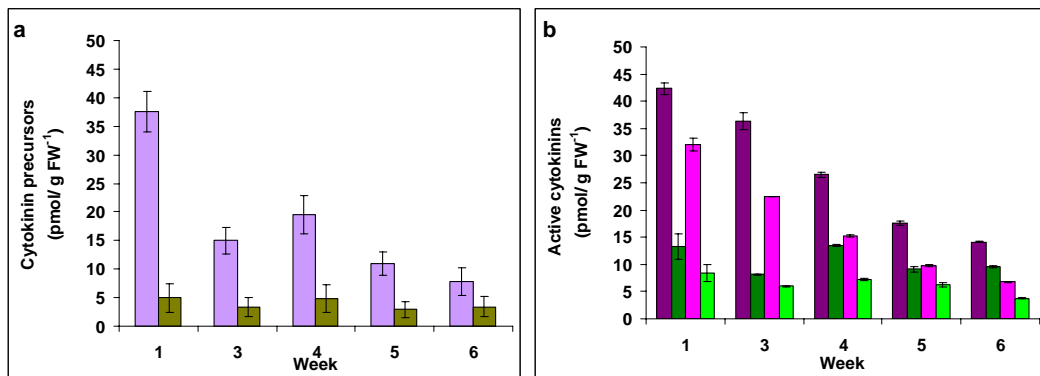


Fig.13

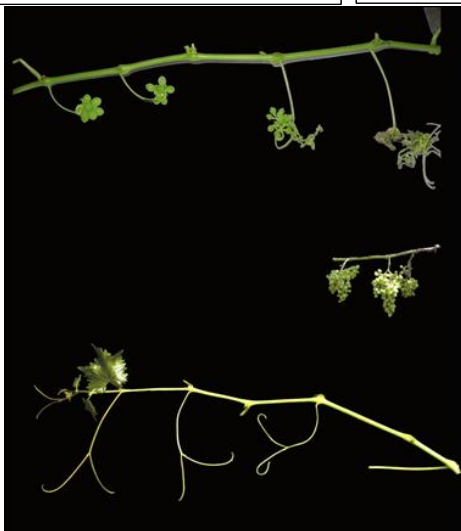


Fig.14



Fig.15

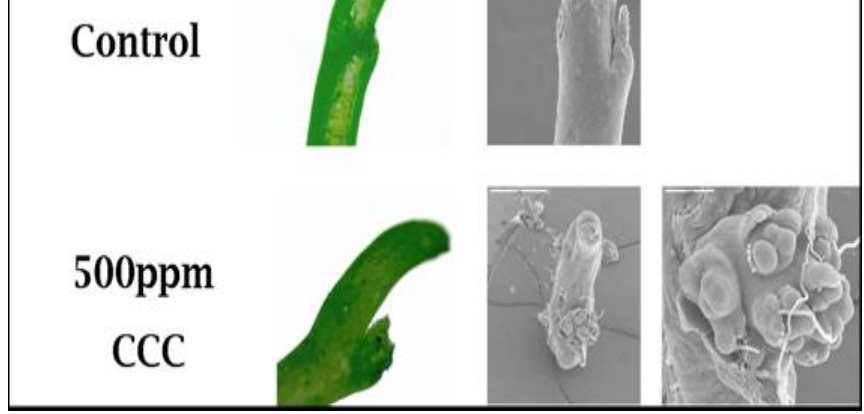


Fig.17

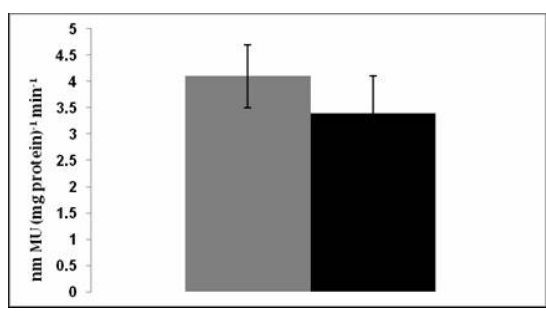


Fig.16

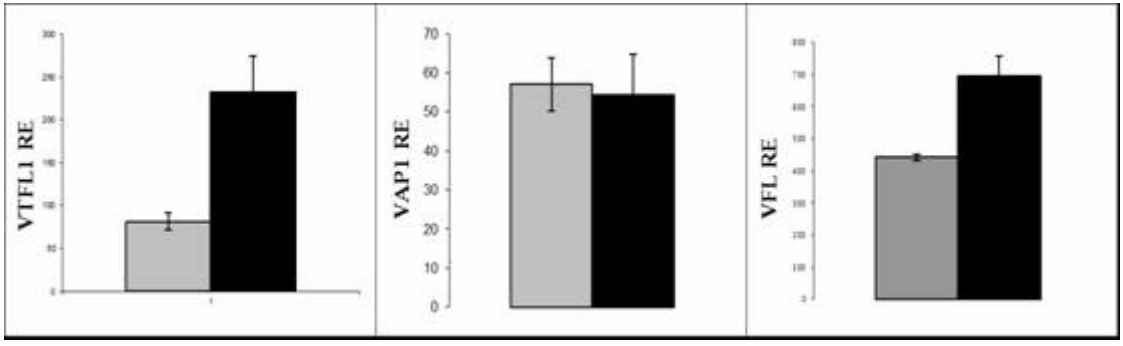


Fig.18

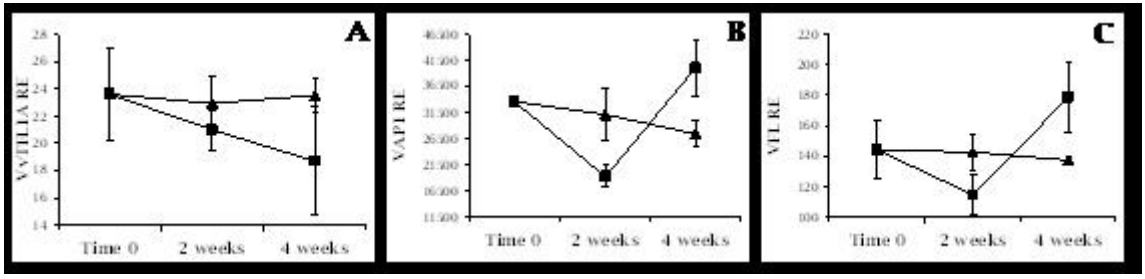


Fig.19

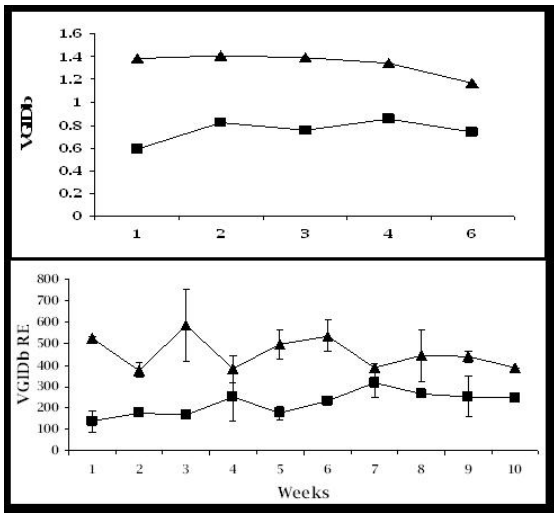


Fig.20

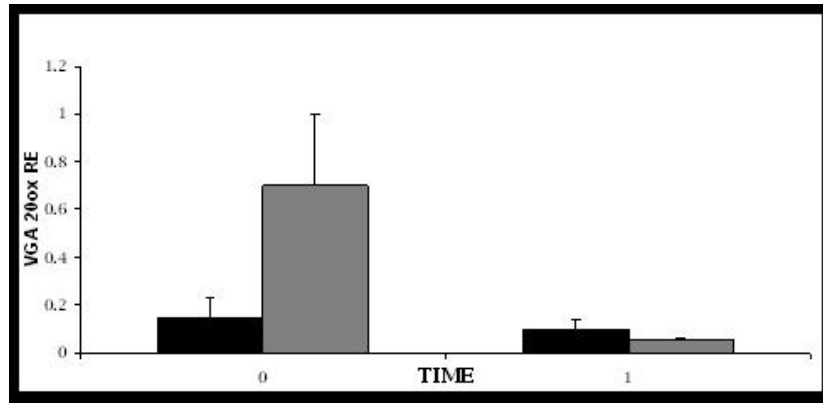


Fig.21

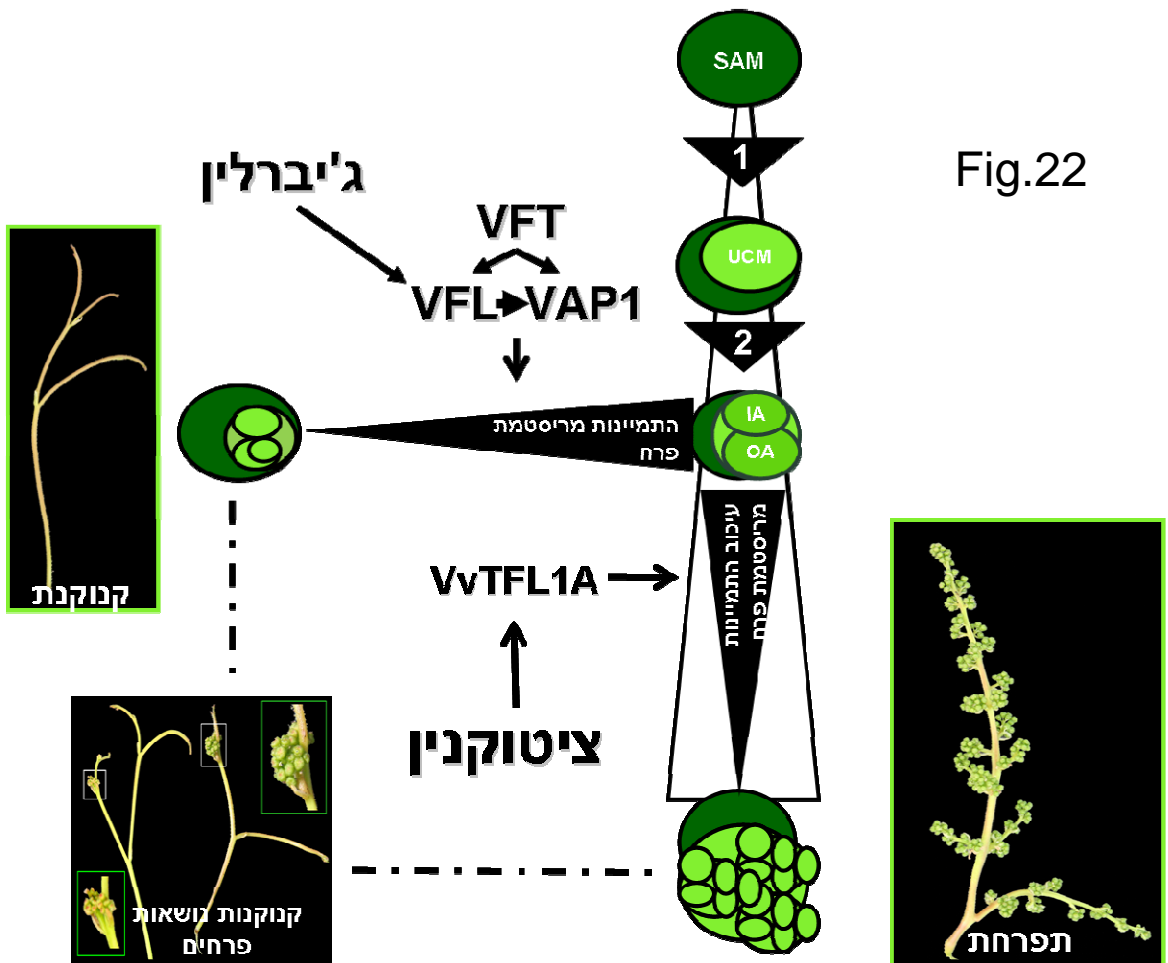


Fig.22