

דוח לתכנית מחקר מספר 132-1265-07

עמידות טרנסגנית לעלקת בעגבנייה: שימוש ברצף המשתיק גן חיוני של הטפיל

Silencing key metabolic genes in *Orobanche* as means for its control

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

ראדי עלי, דני יואל פוטופתולוגיה וחקר עשבים, מינהל המחקר החקלאי, נוה יער
 בני שטיינץ, אהרון זלצר ודויד גדעוני גנטיקה, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני
 דוד קניגסבוך איחסון, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני

Radi Aly and Daniel M. Joel, Weed Research, ARO, Newe Ya'ar Research Center,
 P.O.B. 1021 Ramat Yishay 30095. E-mail: radil@volcani.agri.gov.il

Benjamin Steinitz, Aaron Zelcer and David Gidoni, Genetics, ARO, Volcani Center,
 P.O.B. 75 Bet-dagan 50250.

David Kenigsbuch, Dept. of Postharvest Science, ARO, Volcani Center, P.O.B. 75 Bet-
 dagan 50250.

יולי 2009

תמוז תשס"ט

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים לא מהווים המלצות לחקלאים

*



חתימת החוקר

תקציר

מטרת המחקר : לפתח עמידות לעלקת באמצעות השתקת גן מפתח M6PR (Mannose 6-Phosphate Reductase) של הטפיל.

מהלך ושיטות עבודה : הכנת קונסטרקט המכיל את הקטע להשתקה בצורת inverted repeat וטרנספורמציה לצמחי עגבנייה על ידי אגרובקטריום תחת בקרת הפרומוטר 35S. להוכחת האינטגרציה של הקטע הספציפי 268bp וביטוי בצמחים הטרנסגניים נעשתה אנליזת RT-PCR, Southern blot ו-PCR. בדיקת רמת ה-mRNA של גן המטרה בטפיל נעשתה ע"י Real Time PCR. הפגיעה ברמת הפעילות של האנזים M6PR נבדקה ע"י מדידת רמת המניטול (תוצר המווסת ע"י גן המטרה M6PR) בטפילים שגדלו על צמחים לא טרנסגניים - wt באמצעות HPLC. בדיקת עמידותם של הצמחים הטרנסגניים המבטאים את גן המטרה כנגד הטפיל עלקת מצרית נעשתה בשיטת השקיות (PE). תוצאות עיקריות : לצורך השתקת גן M6PR, בודד הרצף השלם (1133 bp) של גן M6PR מעלקת מצרית *Orobanche aegyptiaca* שלא היה ידוע עד כה. לאחר מכן בודד קטע ספציפי של גן M6PR מעלקת מצרית בגודל של 268 bp שלא הייתה לו הומוולוגיה עם רצפים מצמחי גידול כמו עגבנייה ואחרים. הוכח שצמחי העגבנייה הטרנסגניים מכילים את קטע הגן של ההשתקה (286 bp). הוכח שרמת ה-M6PR mRNA בעלקות שגדלו על צמח טרנסגני, ירדה ב- 60-80% לעומת רמתו בצמחי הביקורת. נמצא שמספר קווים טרנסגניים מייצרים siRNA בגודל של 21. נרשמה ירידה משמעותית בתכולת המניטול בפקעיות הפרזיט שגדלו על הקווים הטרנסגניים (2,6,7) בהשוואה לתכולתו בפקעיות שגדלו על צמחי הביקורת. נרשמה עליה משמעותית בתמותת פקעיות הפרזיט שגדלו על הקווים הטרנסגניים (Lines: 2 and 6) בהשוואה לרמת התמותה בפקעיות שגדלו על צמחי הביקורת.

מסקנות והמלצות : התוצאות תומכות בהיפותיזת העבודה שניתן להשתיק את גן המטרה M6PR של עלקת מצרית. לא נראו הבדלים במופע החיצוני (הפינוטיפי) בין צמחי העגבנייה זן הבר WT לבין קווי העגבנייה הטרנסגניים. כמו כן הוכח שהצמח הפונדקאי מייצר siRNA של הגן האחראי על פעולת ההשתקה אך בשלב זה לא הוכח שגורם ההשתקה siRNA נוכח גם בטפיל. למרות שהושגו מטרות המחקר, יש צורך בהמשך המחקר לקבלת צמחים טרנסגניים הומוזיגוטיים וכמו כן יש צורך באפיון מעבר siRNA מהצמח הפונדקאי לצמח הטפיל.

מבוא

מיני עלקת שונים (*Orobanchae* spp.) (Parker and Riches, 1993) מהווים פגעים קשים בגידולי שדה וירקות רבים בארץ ובעולם. הם גורמים נזק בגידולים מרכזיים, המתבטא בהקטנת היבול ובהורדת איכותו, ובמקרים חמורים אף לאובדן היבול. בשנים האחרונות פותחה טכנולוגיה ליצירת צמחים טרנסגנים נושאי רצפים משתיקים לגנים ספציפיים. טכנולוגיה זו שימשה כבר להגנה מפני וירוסים, חיידקים ונמטודות. אותות ההשתקה נעים באופן סיסטמי במערכת ההובלה (שיפה) של הצמח (למשל מכנה לרוכב, או מעלה מקור לעלה מבלע). על בסיס התפתחות זו, ועל בסיס הידיעה כי מערכות ההובלה של הטפיל מחוברות ישירות לאלה של הפונדקאי ונמצא כי וירוס מוזאיקת המלפפון (CMV) מסוגל לעבור דרכן מהפונדקאי לעלקת, אנחנו מניחים שאות טרנסגני המיוצר בפונדקאי יעבור דרך מערכת ההובלה מהפונדקאי לטפיל, ויוכל להוביל להשתקת גן המטרה החיוני להתפתחותו של הטפיל. בכוונתנו להשתמש בטכנולוגיה זו ליצירת קוי עגבניה עמידים לבדיקת היתכנות הטכנולוגיה, ובהמשך כמקור בטיפוח קונבנציונאלי.

מטרות

מטרת העבודה הכללית היא השתקת גן מפתח *M6PR* (Delavault et al., 2002) בצמח הטפיל עלקת ע"י יצירת dsRNA של הגן בצמח הפונדקאי וזאת על מנת ליצור קו עגבנייה עמיד לטפיל. מטרת ספציפיות:

- א. בידוד ואפיון הגן *M6PR* מעלקת מצרית. זיהוי, אפיון ושיבוט קטע הגן *M6PR* שהינו ספציפי לטפיל עלקת והמיועד להשתקתה. זה יעשה ע"י שימוש בפריימרים ספציפיים וע"י PCR RT-Total RNA שיופק מעלקת מצרית. לאחר מכן שיבוטו בצורת Inverted repeat בווקטור בינארי ביחד עם גן מדווח GFP ובלי גן מדווח תחת בקרתו של הפרומוטור 35S.
- ב. השתקה in-vitro של הטפיל בשיטת השקיות (PE) ע"י הזרקה של dsRNA של הגן *M6PR* שהוכן במעבדה לפקעיות של הטפיל שגדלו על צמח עגבנייה WT.
- ג. טרנספורמציה של הקונסטראקטים הנ"ל לעגבנייה וטבק, זיהוי, כימות ובדיקת האנטגרציה של הגן בצמח בשיטות מולקולאריות שונות.
- ד. אנליזת siRNA בצמח הפונדקאי ובדיקת ביטוי mRNA בעלקת שגדלה על צמחי עגבנייה טרנסגניים בהשוואה לבקורת ע"י Real-Time PCR ו-Northern blot.
- ה. בדיקת העמידות של הצמחים הטרנסגנים המבטאים את קטע ההשתקה לאילוח בטפיל עלקת.

עיקרי הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו

בידוד ואפיון הגן *M6PR* (Mannose 6-phosphate reductase) בעלקת מצרית

לצורך קבלת קטע הגן להשתקה וקבלת הרצף השלם של הגן *M6PR* מעלאת מצרית *Orobanche aegyptiaca* שלא היה ידוע עד כה, נבחר הרצף של גן ידוע מעלאת ענפה (*Orobanche ramosa*). על סמך רצף הגן הידוע ונתוני ה- GeneBank ([AF055910](#)) סונתזו שני פריימרים forward ו- reverse. הופק total RNA מעלאת מצרית ועליו סונתזו cDNA ע"י שימוש בפריימרים ספציפיים מעלאת ענפה וראקצית RT-PCR. קטע הגן שהתקבל בראקצית ה-RT-PCR שובט לווקטור pGEM-T. נבחר מספר מושבות חיוביות, שנבדקו ע"י PCR וראקצית חיתוך. הפלסמיד שהכיל את הגן *M6PR* נשלח לריצוף. לפי התוצאות התקבל לראשונה קטע DNA בגודל של 1133bp שמייצג את רצף הגן *M6PR* בעלאת מצרית. בכדי לבחור את קטע הגן המיועד להשתקה על רצף הגן *M6PR* בע. מצרית, נעשתה השוואה ברצף הגן ב- 2 עלקות ממינים שונים (ע. מצרית, וע. ענפה). לפי תוצאות ההשוואה ב- BLAST התקבלה הומולוגיה של 98% ברצף הגן *M6PR* בשני המינים (תמונה 1). על מנת לבחור קטע השתקה ספציפי (ללא הומולוגיה לאותו הגן בגידולים שונים) נעשתה השוואה בין רצף הגן *M6PR* מע. מצרית לבין כל הגנים הידועים של צמחי גידול במאגר הגנים (Data base). לאחר בדיקת הנתונים בודד קטע ספציפי של הגן *M6PR* מעלאת מצרית בגודל של 268bp באמצעות פריימרים ספציפיים וראקצית PCR על DNA גנומי מעלאת מצרית (תמונה 1, מסומן באפור).

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90
Or .Aeg ATGGTGATTACACTCAACCAATGGCTTCAAAATGCCATTATTGGTCTTGGGGTTGGAGGACAGAAAGAAAGGATCTCAAGAACCTCATC
Or .Ram ATGGTGATTACACTCAACCAATGGCTTCAAAATGCCATTATTGGTCTTGGGGTTGGAGGACAGAAAGAAAGGATCTCAAGAACCTCATC

100     110     120     130     140     150     160     170     180
Or .Aeg ATCAACGCCATCAAGATTGGCTATCGCCACTTCGATTGTGCTGCTGACTACAAGAAATGAAGCAGAAAGCTCGAGAGGCATGGAAAGAAACA
Or .Ram ATCAACGCCATCAAGATTGGCTATCGCCACTTCGATTGTGCTGCTGACTACAAGAAATGAAGCAGAAAGCTCGAGAGGCATGGAAAGAAACA

190     200     210     220     230     240     250     260     270
Or .Aeg TTGCAAACTGGTCTTGTGAAGAGGGAGGATCTTTTATTACTCAAAAGCTTTGGAATTCGATCATGGTCAATGTTGTGAGGCTGTACA
Or .Ram TTGCAAACTGGTCTTGTGAAGAGGGAGGATCTTTTATTACTCAAAAGCTTTGGAATTCGATCATGGTCAATGTTGTGAGGCTGTACA

280     290     300     310     320     330     340     350     360
Or .Aeg GACAGTTTAAAGAAAGCTGCGCTCGAGTATCTAGATCTATACCTTGTGCACTTCCCTGTAGCGCAAAACATACTGGAGTTGGCAAACT
Or .Ram GACAGTTTAAAGAAAGCTGCGCTCGAGTATCTAGATCTATACCTTGTGCACTTCCCTGTAGCGCAAAACATACTGGAGTTGGCAAACT

370     380     390     400     410     420     430     440     450
Or .Aeg GATAGCGCCCTGGGGATGACGGTATCTTGGACATAGATACAACAATATCTCTGGAGCCACTTGGCATGCGATGGAAGATCTGGTTCA
Or .Ram GATAGCGCCCTGGGGATGACGGTATCTTGGACATAGATACAACAATATCTCTGGAGCCACTTGGCATGCGATGGAAGATCTGGTTCA

460     470     480     490     500     510     520     530     540
Or .Aeg TTGGGTTAGCTCGCAGTATTGGTATCAGCAACTATGATATATTCCTTACAAGAGATTGCTTGGCCTATTCAAAAATCAAGCTGCTGTG
Or .Ram TTGGGTTAGCTCGCAGTATTGGTATCAGCAACTATGATATATTCCTTACAAGAGATTGCTTGGCCTATTCAAAAATCAAGCTGCTGTG

550     560     570     580     590     600     610     620     630
Or .Aeg AATCAGATTGAAACACATCCATACTCCAGCGCAATCTCTTGTGAAATCTGTGAGAAAGCATGGGATCTGTGTGACTGCCATACCCCT
Or .Ram AATCAGATTGAAACACATCCATACTCCAGCGCAATCTCTTGTGAAATCTGTGAGAAAGCATGGGATCTGTGTGACTGCCATACCCCT

640     650     660     670     680     690     700     710     720
Or .Aeg CTTGGAGGTCCTTGGCTAAACAAGAAATGGTTCGGTACAGTGTCTTGTGTTGGATGATCCCGTCATTAAGGGTTGACCGAATAATAGG
Or .Ram CTTGGAGGTCCTTGGCTAAACAAGAAATGGTTCGGTACAGTGTCTTGTGTTGGATGATCCCGTCATTAAGGGTTGACCGAATAATAGG

730     740     750     760     770     780     790     800     810
Or .Aeg AAGAAGACGGTAGCTCAGATTGCTCTGCGTTGGGGCATCCAGCGAAACAGGGTTGTGATTCCCAAGACATCAAAAACAGGACAGATTGATC
Or .Ram AAGAAGACGGTAGCTCAGATTGCTCTGCGTTGGGGCATCCAGCGAAACAGGGTTGTGATTCCCAAGACATCAAAAACAGGACAGATTGATC

820     830     840     850     860     870     880     890     900
Or .Aeg GAGAAATTTCAAGTTTTTGACTTCGAGCTTCCAAATGAGGATATGGAATGTTGAAAGCATATGGAGCGGAAATAAGAACTAACTAACT
Or .Ram GAGAAATTTCAAGTTTTTGACTTCGAGCTTCCAAATGAGGATATGGAATGTTGAAAGCATATGGAGCGGAAATAAGAACTAACTAACT

910     920     930     940     950     960     970     980     990
Or .Aeg GCCAAGTCTGGGGTATCGATCTTTTCGATAAGTTTCTCCATGTTAGGGATTTTCATTATGATGATGCAACACAAAGGAGAGAG
Or .Ram GCCAAGTCTGGGGTATCGATCTTTTCGATAAGTTTCTCCATGTTAGGGATTTTCATTATGATGATGCAACACAAAGGAGAGAG

1000    1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080
Or .Aeg GAGAGAGACGAAAGGACTCTGCCATTTATGGTAAATAGCTTTTATATTGCACTGGGGCAAAAATCTCGCAATATTTCACTACTTA
Or .Ram GAGAGAGACGAAAGGACTCTGCCATTTATGGTAAATAGCTTTTATATTGCACTGGGGCAAAAATCTCGCAATATTTCACTACTTA

1090    1100    1110    1120    1130
Or .Aeg AGAACTTAACTAAAATGTAATGTTCTCTTCCAACTCTCAGGCGCTGTCA
Or .Ram AGAACTTAACTAAAATGTAATGTTCTCTTCCAACTCAAAAAAAAAA

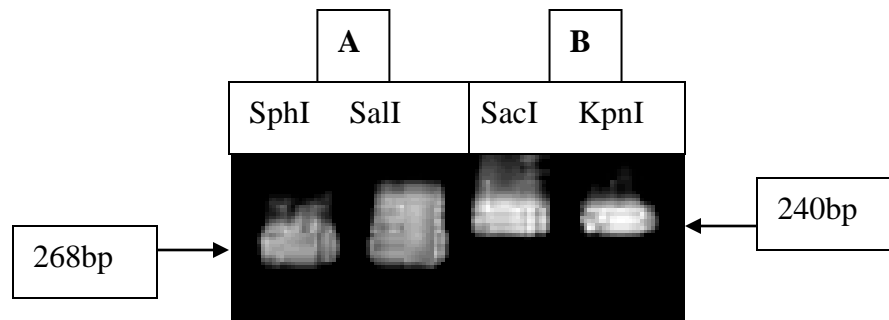
```

תמונה 1: השוואה בין הרצפים של הגן M6PR בעלוקת מצרית (Or.Aeg) וע. ענפה (Or. Ram) ברמת הנוקלאוטידים.

Or.Aeg – רצף מלא של M6PR מעלוקת מצרית (1133bp) (Aly et al., 2009).
Or.Ram – רצף מלא של M6PR מעלוקת ענפה (1127bp) (Delavault et al., 2002)

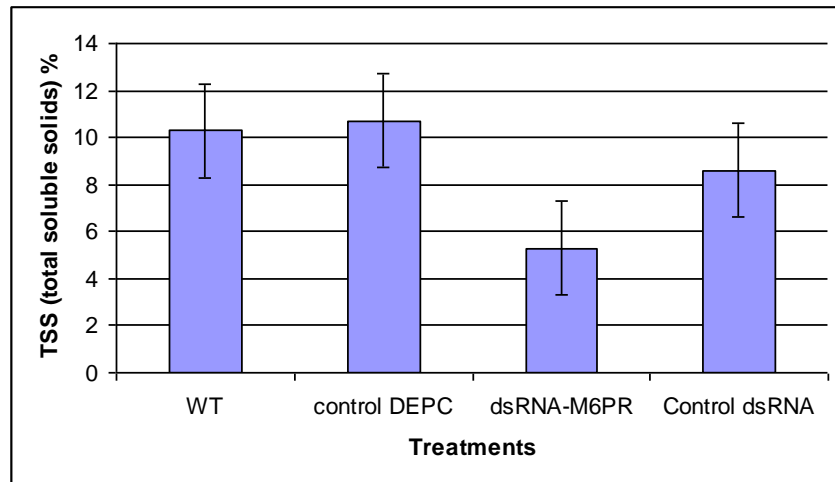
האפשרות להשתקת גן המטרה בעלוקת מצרית *in vitro*

טרם הנדסת צמחי טבק ועגבנייה בקטע ה-DNA המיועד להשתקה, נבדקה האפשרות לערוך השתקה *in vitro* ע"י קטע הגן של M6PR שבודד מעלוקת מצרית, ע"י הזרקת M6PR - dsRNA ישירות לפקעיות של הטפיל. לאחר הכנת ה-ssRNA בריכוז של $1.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (תמונה 2) חוברו שני הגדילים ליצירת ה-dsRNA שהוזרק לכל פקעית בריכוז של $1.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ובנפח ההזרקה של $10 \mu\text{l}$.



תמונה 2: הפרדת תוצרי ריאקציה השעתוק *in vitro* ssRNA על גל אגרוז 1%
A: תוצרי השעתוק של ssRNA של הגן M6PR. B: תוצרי השעתוק של ssRNA של גן הביקורת
(Non Coding Region 3') NCR שמקורו בוירוס ZYMV (Zucchini yellow mosaic)
(potyvirus). החצים מסמנים את גודל התוצר ששועתק *in-vitro*.

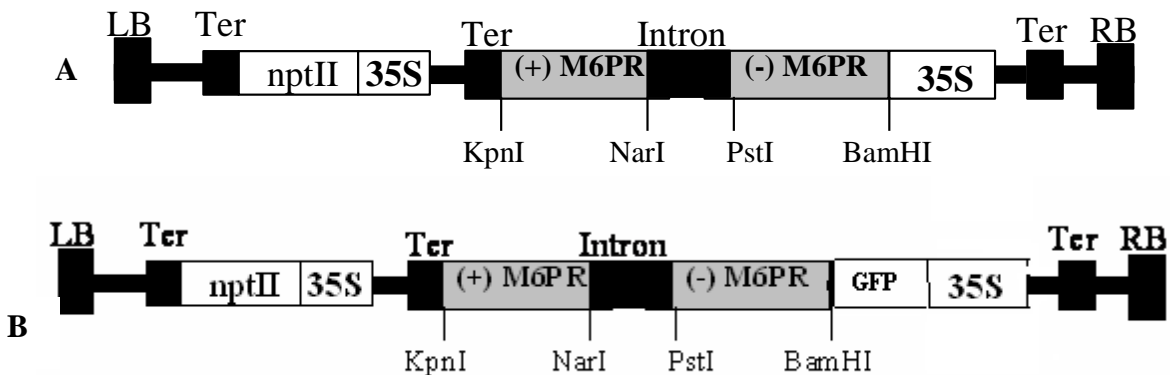
צמחי עגבנייה (WT) הודבקו בעלוקת מצרית. לאחר חודש מההדבקה התקבלו פקעיות עלוקת שלב III: אחד השלבים של התפתחות הטפיל על שורשי הצמח הפונדקאי שבו רמת המניטול המיוצרת בעלוקת מגיעה לרמה מקסימלית (Delavault et al., 2002). לפקעיות הוזרקו הטיפולים השונים ב-5 חזרות. 3 ימים מיום ההזרקה נאספו הפקעיות ונכתשו לקבלת תמיסה עבור מדידת ה-TSS (תכולה כללית של המומסים ברקמה, בעיקר סוכרים) ע"י רפרקטומטר. התוצאה: טיפול M6PR - dsRNA גרם להפחתה משמעותית ברמת הסוכרים הכללית, בהשוואה לביקורות WT ו-DEPC (תמונה 3).



תמונה 3 : בדיקת תכולת הסוכרים הכללית בפקעיות של ע. מצרית מטיפולים שונים. פקעיות ללא טיפול - WT , DEPC - הזרקת מים DEPC כביקורת שלילית, dsRNA-M6PR - הזרקת dsRNA של קטע הגן להשתקה *M6PR*, control dsRNA - הזרקת dsRNA של הגן הזר *NCR* (Non Coding Region 3').

הכנת צמחים טרנסגניים המכילים את הגן *M6PR*

להכנת צמחים טרנסגניים המכילים את קטע הגן להשתקה, הקונסטראקט pBIN19::35S::*M6PR* (תמונה 4, A) עבר טרנספורמציה תחילה לחיידקי אגרובקטריום ולאחר מכן לצמחי טבק ועגבנייה.

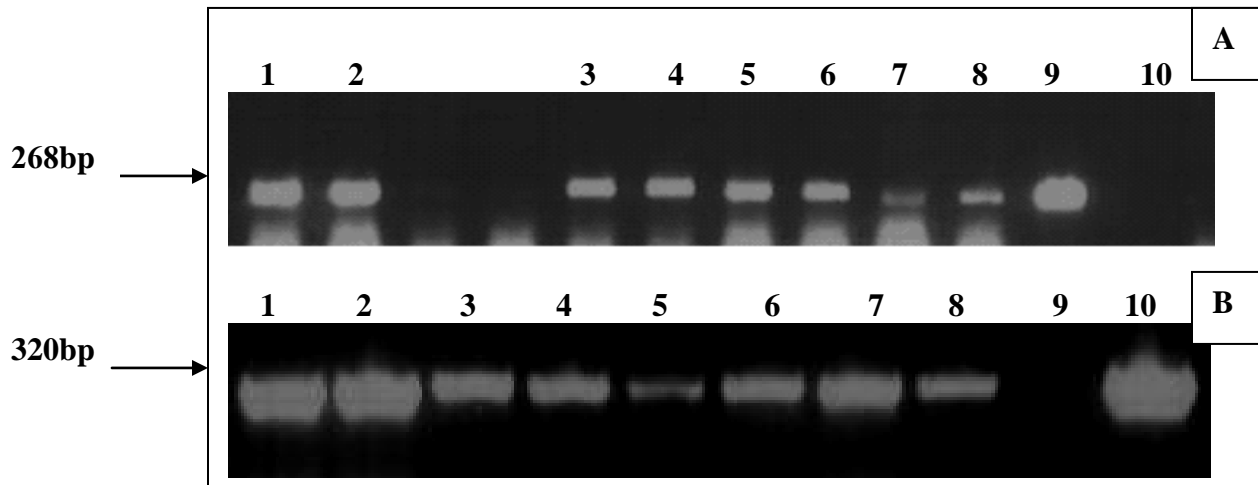


תמונה 4 : תאור סכמטי של הויקטור הבינארי המכיל את קטע הגן להשתקה *M6PR* תחת בקרתו של הפרומוטר 35S. A - הקונסטראקט שמכיל את הגן *M6PR*, B - הקונסטראקט שמכיל את הגן GFP. LB ו-RB : קצוות ימין ושמאל של T-DNA של הפלסמיד Ti מ-*Agrobacterium tumefaciens* בהתאמה; nptII : גן המקדד לעמידות לקנאמאיצין; 35S : פרומוטר קונסטטוטיבי; Ter : רצף הטרמינציה של הגן nopaline synthase מ-*Agrobacterium tumefaciens*; (+) *M6PR* : קטע הגן

להשתקה באורינטציה 5' ← 3' ; Intron : קטע מהגן האנדוגני של האנזים הצמחי catalase
 (AF234316) בגודל 200bp ; M6PR (-) : קטע הגן להשתקה באורינטציה 3' ← 5' .

אנליזות מולקולאריות לקווי עגבנייה טרנסגניים

לאחר הטרנספורמציה של הקונסטראקט המכיל את קטע הגן להשתקה לצמחי עגבנייה, נבדקו 40 ארועי טרנספורמציה שונים. מתוכם 14 היו טרנסגניים. בדור T1 התפתחו 8 קווים טרנסגניים, שנבדקו עם פריימרים של הגן *M6PR* ופריימרים של 35S (Forward=fwd) ו (Reverse=rev) *M6PR*.



תמונה 5: בדיקת האינטגרציה של הגן *M6PR* והפרוטוטר 35S בצמחי עגבנייה טרנסגניים בדור T1 ע"י PCR.

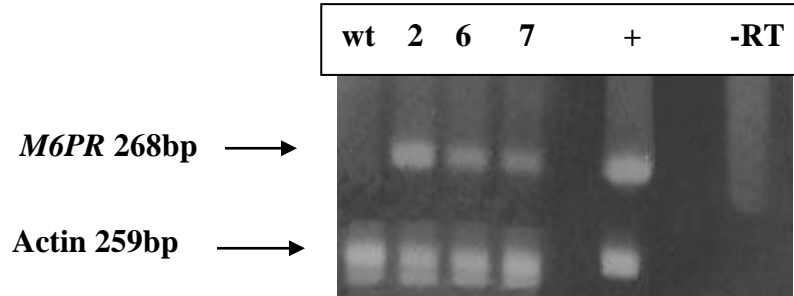
A : סריקת ה-DNA הגנומי נעשתה ע"י שימוש בפריימרים ספציפיים לגן *M6PR*. תוצאות תוצרי ה-PCR מ-DNA גנומי של צמחי עגבנייה טרנסגניים ערוצים (1-8), הפלסמיד (pBIN19::35S::M6PR) ערוץ 9 וזן הבר wt ערוץ 10.

B : סריקת ה-DNA הגנומי נעשתה ע"י שימוש בפריימרים : 35S (Forward=fwd) ו *M6PR* (Reverse=rev). תוצאות תוצרי ה-PCR מ-DNA גנומי של צמחי עגבנייה טרנסגניים ערוצים (1-8), הפלסמיד (pBIN19::35S::M6PR) ערוץ 10 וזן הבר wt ערוץ 9.
 לפי התוצאות התקבל מקטע DNA בגודל של 268 bp (תמונה 5, A) ומקטע בגודל 320 bp (תמונה 5, B). מקטעים מסומנים בחץ בהתאם לגודל הצפוי.

לבדיקת ביטוי הגן *M6PR*, מסי העותקים ובדיקת סנתיזת מולקולות siRNA בצמחי עגבנייה טרנסגניים נבחרו 3 קווים טרנסגניים (2, 6, 7).

M6PR הגן ביטוי הגן

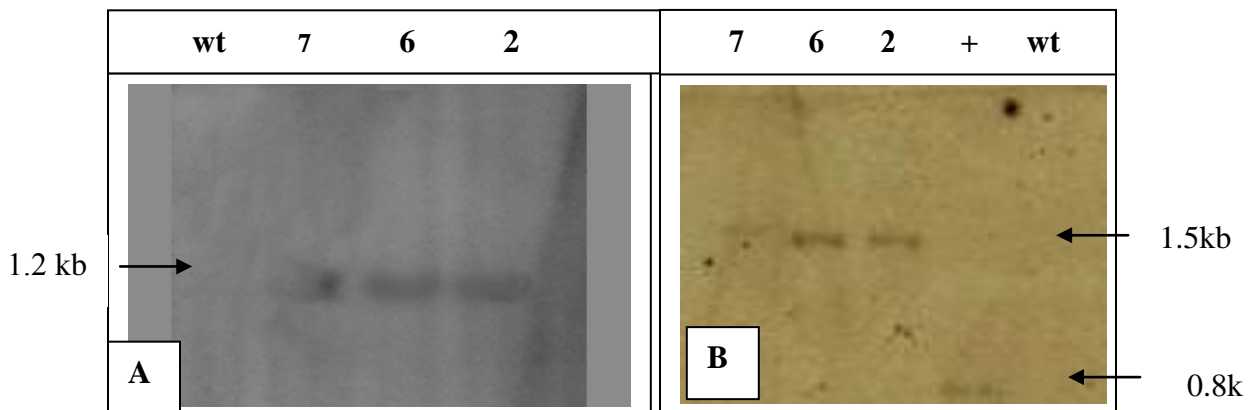
בדיקת ביטוי ה-mRNA של הגן *M6PR* תחת בקרת הפרומוטור 35S, בהשוואה עם רמת הביטוי של הגן האנדוגני Actin בקווי העגבנייה הטרנסגניים נערכה בשיטת ה-RT-PCR (תמונה 6).

תמונה 6: בדיקת ביטוי הגן M6PR בצמחי עגבנייה טרנסגניים

ערוצים 2, 6, 7: Total RNA מעלי עגבנייה טרנסגנית קווים 2, 6, ו-7 בהתאמה. ערוץ wt: Total RNA מצמח עגבנייה לא טרנסגני שימש כביקורת. ערוץ (+) בדיקה של ביטוי הגן *M6PR* - בפלסמיד המכיל את הגן *M6PR* שימש כתבנית לביקורת חיובית. ערוץ -RT: ריאקציה של RT-PCR ללא אנזים AMV שימשה כתבנית לביקורת שלילית. החלק התחתון של התמונה מייצג בדיקת ביטוי הגן Actin באותם קווים טרנסגניים. לפי תוצאות ה-RT-PCR, התקבל ביטוי לקטע הגן *M6PR* (תמונה 6, חלק עליון) והגן Actin (תמונה 6, חלק תחתון) בגדלים הצפויים. החצים מצביעים על תוצרי הריאקציה שהתקבלו.

אנליזת Southern blot לצמחי עגבנייה טרנסגניים

לבדיקת האינטגרציה של הגן *M6PR* בגנום של צמח העגבנייה ועל מנת לבדוק את מספר העותקים שלו בגנום, נערכה אנליזת Southern blot ל-DNA גנומי שהופק מהקווים הטרנסגניים של עגבנייה (2), (6, 7). לצורך האנליזה הוכנו שני מקטעי DNA מסומנים רדיואקטיבית: סמן לגן *M6PR* וסמן לגן *nptII* ובאמצעותם נעשתה היברידיזציה ל-DNA גנומי שנחתך קודם לכן ע"י האנזים XbaI שחותך רק פעם אחת בגן *M6PR*.

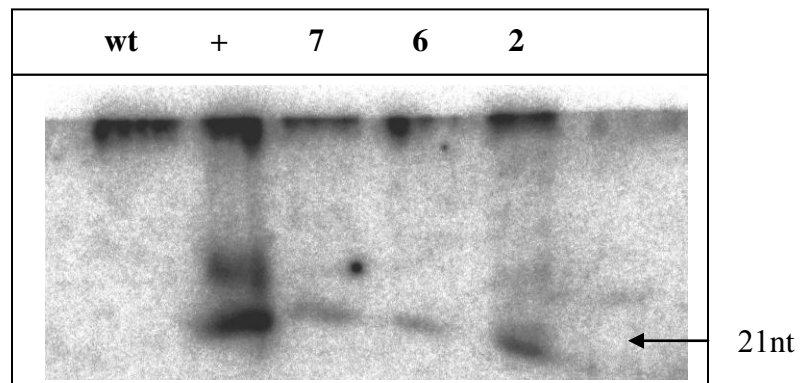


תמונה 7: בדיקת האינטגרציה ומספר העותקים של הגנים *M6PR* ו-*nptII* ע"י Southern blot. A: היברידיזציה עם סמן ספציפי לגן *M6PR*, B: היברידיזציה עם סמן ספציפי לגן *nptII*. ערוצים: 2, 6 ו-7 מייצגים את שלושת קווי העגבנייה הטרונסגנית (2, 6, 7) בהתאמה. הערוץ (+): מייצג DNA שמקורו מעגבנייה שמכילה את הגן *nptII* כביקורת חיובית. wt: DNA גנומי שהופק מצמח עגבנייה לא טרונסגנית כביקורת שלילית. לפי התוצאות התקבלו מקטעי DNA שעברו היברידיזציה עם סמן ספציפי לגן *M6PR* (תמונה 7 A) בגודל של 1.2kb, מסומנים בחץ. לעומת זאת נתקבלו מקטעי DNA שעברו היברידיזציה עם סמן ספציפי לגן *nptII* בגודל של 1.5kb, מסומנים בחץ. מקטע ה-DNA ששימש כביקורת חיובית לגן *nptII* בגודל 0.8kb, מסומן ע"י החץ (תמונה 7 B).

אנליזת siRNA בצמחי עגבנייה טרונסגניים

א. סינתזה של *M6PR*- siRNA בצמחי טבק *Nicotiana benthamiana* ע"י Agro-infiltration. ניסוי זה נעשה על מנת לייצר *M6PR*- siRNA *in-vitro* בצמחי טבק כבקורת. לצורך זה הוזרק החיידק אגרובקטריום המכיל את הגן *M6PR* לעלים של צמחי טבק בשיטת ה-Agro-infiltration. 72 שעות לאחר ההזרקה נאספו הכתמים שהראו הצהבה (איזור ההזרקה) ומהם הופק Total RNA שעבר הפרדה על 13% polyacrylamide TBE-7M Urea gel ביחד עם שאר הטיפולים.

ב. אנליזה של siRNA מצמחי עגבנייה טרונסגניים מדור T1 קווים: 2, 6, 7 על מנת לבדוק אם קווי העגבנייה שנבחרו לעבודה יש ביכולתם לייצר מולקולות siRNA שנוצרים כתוצאה מחיתוך של *M6PR*- dsRNA ע"י האנזים Dicer, נעשתה אנליזה ל- Total RNA מעלי העגבנייה לבדיקת נוכחות ה-siRNA לפי פרוטוקול שעבר מודפקציה במעבדתנו. Total RNA שהופק מהקווים הנ"ל נמדד במכשיר nanodrop ונמהל לריכוז המתאים כך שמכל דוגמא מה-RNA הוטענו 30 µg על 13% polyacrylamide TBE-7M Urea gel. ביחד עם הבקורות השונות הוטען גם סמן גודל (פריימר של הגן *M6PR*) בגודל של 21 בסיסים. לאחר ההרצה הועבר ה-RNA לממברנה ועבר היברידיזציה עם סמן רדיואקטיבי מתאים: (³²P labeled transcript of the *M6PR*-silencing fragment).



תמונה 8 : בדיקת נוכחות siRNA בקווי עגבנייה טרנסגניים 2, 6, 7.

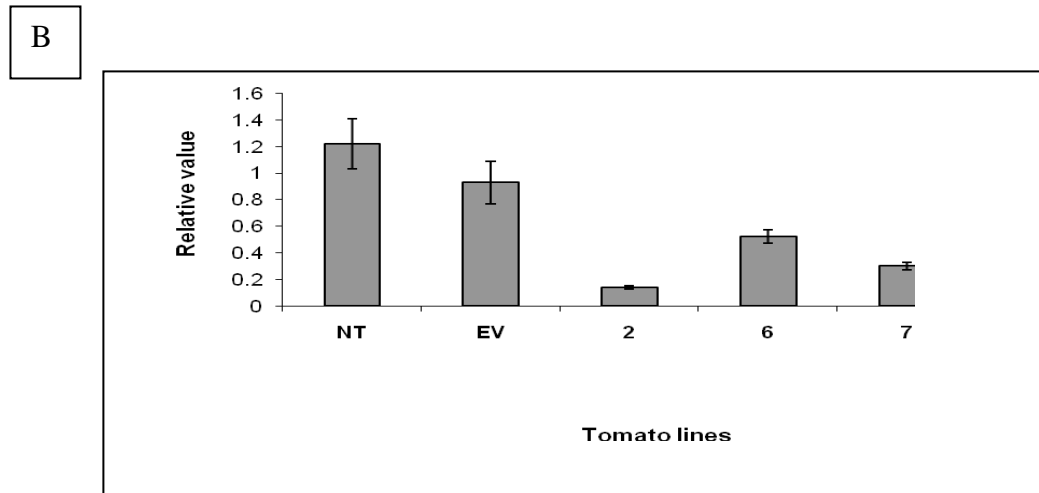
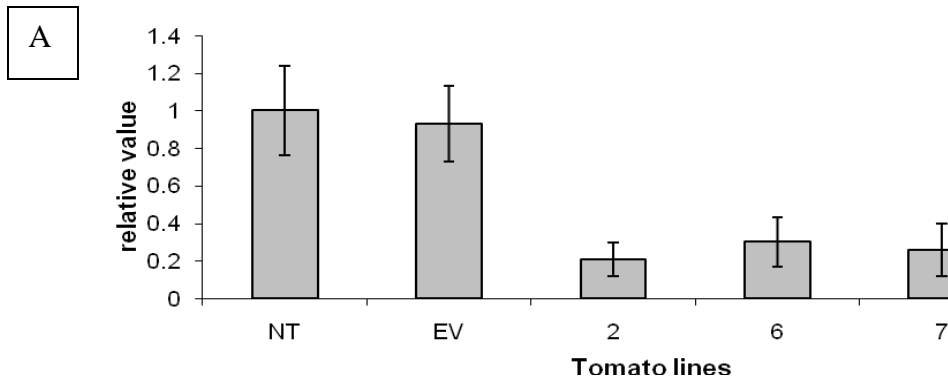
Total RNA : (wt) מצמח עגבנייה זן הבר שימש כביקורת שלילית. (+) Total RNA מצמח טבק
Nicotiana benthamiana שימש כביקורת חיובית. 2, 6, 7 Total RNA : מקווי עגבנייה
 טרנסגניים.

לפי תוצאות החשיפה של הממברנה ב- PhosphorImager, התקבלו תוצרים בגודל של 21 בסיסים אשר הגיבו עם הסמן הספציפי רק בקוויים הטרנסגניים ובביקורת החיובית מצמח הטבק, אינדקציה לנוכחות מולקולות siRNA בגודל של 21 נוקלאוטידים בצמחים אלו מסומן בחץ (תמונה 8). תוצר כזה לא התקבל מצמח העגבנייה זן הבר (wt).

רמת הביטוי של M6PR- mRNA בעלוקת מצרית ע"י Real-Time PCR

לאחר כיוול מערכת ה- Real-Time PCR ע"י גנים של Actin ו- Cyclophilin מעלוקת מצרית, נבדקה רמת הביטוי של גן המטרה (המיועד להשתקה) בגבעולים (תמונה 9 A) ובפקעיות (תמונה 9 B) של עלוקת מצרית שגדלו על צמחי עגבנייה טרנסגניים בהשוואה לרמת הגן בגבעולים ופקעיות של עלוקת מצרית שגדלו על זן הבר (NT) או על הקו הטרנסגני המבטא את הפלסמיד ללא מקטע ההשתקה (EV). נלקחו דגימות של 100 mg הן מגבעולים והן מפקעיות, מהם הופק Total RNA ומכל דוגמא נלקחו 100 ng של ה-RNA ל- Real-Time PCR.

Real-Time PCR נעשה לדוגמאות מרקמות עלוקת מצרית שגדלו על צמחי עגבנייה טרנסגניים משלשת הקוויים (2, 6, 7, דור T1). מכל קוו נבדקו 4 צמחים ומכל צמח נלקחו שלוש חזרות וכל חזרה נבדקה פעמיים. ערך ביטוי הגן *M6PR* בגבעול או בפקעית העלוקת כוייל ביחס לגן האנדוגני Cyclophilin. תוצאות הניסוי מסוכמות בתמונה- 9. אנליזה של תוצאות ה- Real-Time PCR הראתה ירידה משמעותית (60-80%) ברמת ה- mRNA של הגן *M6PR* הן בגבעולים והן בפקעיות שגדלו על הקוויים הטרנסגניים (2,6,7) בהשוואה לרמתו בגבעולים או בפקעיות שגדלו על צמחים לא טרנסגניים- NT או על צמחי הבקורת (EV (Empty Vector), הפלסמיד ללא מקטע הגן *M6PR*.



תמונה 9: רמת ביטוי הגן *M6PR* בגבעולים A או בפקעיות B של עלקת מצרית שגדלו על קווי עגבנייה טרנסגנים 2,6,7 ועל צמחי הבקורת (NT, EV).
 A : (2,6,7) גבעולים שגדלו על קווי עגבנייה טרנסגנים. B : (2,6,7) פקעיות שגדלו על קווי עגבנייה טרנסגנים. גבעולים ופקעיות שגדלו על צמחים לא טרנסגנים - NT או על צמחי הבקורת EV (Empty Vector), הפלסמיד ללא מקטע הגן *M6PR*.
 התוצאות נותרו בהתאם ל-

JMP[®] software (version4.0.3, SAS Institute Inc.). Student's *t*-test.

אפיון והשוואת צמחים טרנסגניים לעומת לא-טרנסגניים (wt)

צמחי עגבנייה שהוכח שהם טרנסגניים ע"י סלקציה על מצע שמכיל קנמיצין ובאמצעות PCR נשתלו בעציצים המכילים קרקע כבדה "נווה יער" ודשן אוסמוקוט (Scotts) בבית רשת עם השקיה אוטומטית. נעשה מעכב שבועי למשך חודשיים עד קבלת הפירות.



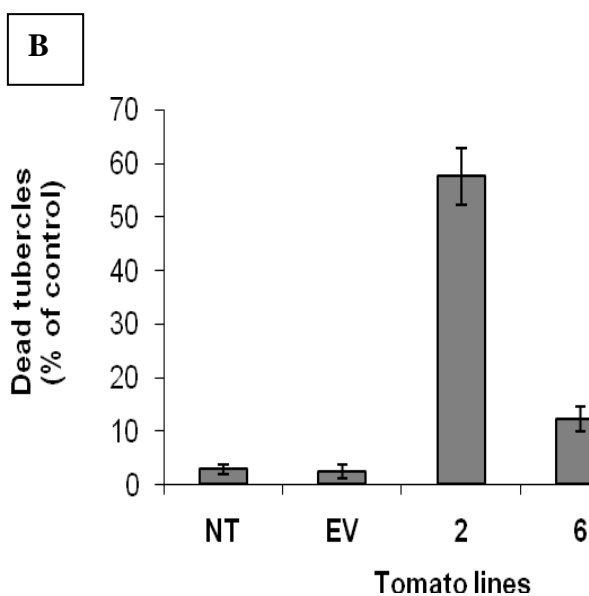
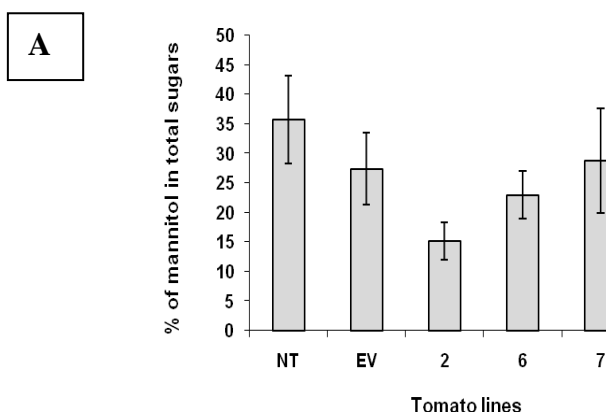
תמונה 10: השוואה בין צמח עגבנייה טרנסגני המבטא את הגן M6PR לעומת צמח עגבנייה לא

טרנסגני wt. A : קו עגבנייה טרנסגני, B: צמח עגבנייה מזן הבר (wt).

לפי התוצאות לא נראו הבדלים בפינוטיפ של צמחים טרנסגנים המבטאים את גן ההשתקה M6PR (תמונה 10, A), לעומת צמחים לא טרנסגניים wt (תמונה 10, B). התפתחות הצמחים הייתה נורמאלית לחלוטין – התקבלה חנטה והניבו פירות בדומה לצמחים לא טרנסגניים. למרות זאת נצפתה תופעת אי-חנטה באחוז קטן של צמחים טרנסגניים ולכן צמחים אלו נפסלו והושמדו.

התפתחות הטפיל עלקת מצרית על צמחים טרנסגניים

הפגיעה ברמת הפעילות של האנזים M6PR המתבטאת ברמת המניטול (תוצר המווסת ע"י גן המטרה M6PR) בטפילים שגדלו על צמחים טרנסגניים בהשוואה לטפילים שגדלו על צמחים לא טרנסגניים wt (תמונה 11), נבחנה בשתי דרכים: א. נבדקה רמת המניטול כ- (%) מכלל הסוכרים שהופקו מפקעיות עלקת אשר גדלו על צמחים טרנסגניים ולא טרנסגניים באמצעות ה-HPLC (תמונה 11 - A). ב. נספרו פקעיות נקרוטיות ומתות בטיפולים השונים (תמונה 11 - B) כמדד לעמידות צמחים טרנסגניים לטפיל בהשוואה לצמחים לא טרנסגניים.



תמונה 11: בדיקת רמת המניטול בטפיל והתפתחותו על צמחים טרנסגנים המבטאים את קטע

ההשתקה של הגן *M6PR*

A: רמת המניטול (%) בפקעיות שגדלו על קווי עגבנייה טרנסגנים (2,6,7). רמת המניטול (%) בפקעיות שגדלו על צמחים לא טרנסגנים-NT או על צמחי הבקורת EV (Empty Vector), הפלסמיד ללא מקטע הגן *M6PR*.

B: התפתחות פקעיות נקרוטיות ומתות של הטפיל על צמחים טרנסגנים (2,6) ועל צמחים לא טרנסגנים-NT או על צמחי הבקורת EV (Empty Vector).

דיון ומסקנות

עבודת מחקר זו התמקדה בהקניית עמידות לעגבנייה כנגד העשב הטפיל עלקת מצרית ע"י שימוש בטכנולוגיית השתקת גנים. הדברתה של העלקת בגידולים חקלאיים הינה משימה קשה במיוחד עקב התפתחותה התת-קרקעית והימצאותה על שורשי הפונדקאים וכן, בגלל תפוצתה הרבה ואורך החיים של זרעיה (Joel et al., 2006). האמצעים הקיימים למלחמה בטפיל הם מוגבלים, כאשר הנפוצים והיעילים ביותר מביניהם הם הדברה כימית בקוטלי עשבים מסוימים וחיטוי קרקע עם מתיל ברומיד, אך שיטות אלה אינן מתאימות לשימוש לטווח ארוך ואסורות לשימוש בגלל פגיעה באיכות הסביבה. שימוש נרחב ורציף בקוטלי עשבים כימיים להדברת עלקת עשוי לגרום לפיתוח אוכלוסיות עלקת עמידות עקב בנק הזרעים הגדול של העלקת (Gressel et al., 1996).

גידולים עמידים לעלקת מציעים אסטרטגיה יעילה לטווח ארוך להדברת הטפיל (Ejeta et al., 1991). לגישה זו יתרון כלכלי וסביבתי על פני השיטות הקיימות למלחמה בטפיל, כי נחסך השימוש באמצעים היקרים ובכימיקלים מזיקים לסביבה. קיימות שתי גישות ליישום השיטה: 1. טיפוח גידולים עמידים באמצעות הכלאות קונבנציונאליות. 2. יצור צמחים טרנסגניים בעלי עמידות מלאכותית.

(Aly, 2007; Amsellem et al., 2002). עבור רוב הגידולים, לא קיימים מקורות טבעיים לעמידות. ואילו, עמידותם של הזנים, שהתקבלו כתוצאה מהכלאות קונבנציונאליות, נשברה לאחר מספר עונות של גידול (Antonova, 1994). אם כן, האפשרות היעילה ביותר לפיתוח גידולים עמידים כנגד עלקת היא יצירת עמידות מלאכותית, אשר ניתנת ליישום במגוון גידולים באמצעות הנדסה גנטית. בעבודה שלנו נבחנו לראשונה טכניקת ההשתקה כאמצעי להדברת צמחים טפילים. בעבודה שלנו בודד הגן *M6PR* מעלקת מצרית, אופיין הרצף ובהשוואת רצף הגן מעלקת מצרית עם רצף הגן של עלקת ענפה, נמצאה הומולוגיה של 98% בין שני הרצפים (תמונה 1). לממצא זה חשיבות מרובה כי יצירת עמידות של עגבנייה למין מסוים של עלקת מאפשרת עמידות גם למינים אחרים של הטפיל.

על מנת להבטיח שקטע הגן המיועד להשתקת הטפיל לא יפגע בצמח הפונדקאי, נעשתה סריקה ב-database לגן המקודד לאנזים *M6PR* בצמחי עגבנייה וצמחי גידול אחרים ולפי תוצאות הסריקה לא נמצאה הומולוגיה לגן של הטפיל עם גנים של הפונדקאים השונים. עדות לכך, צמחי עגבנייה טרנסגניים לא נפגעו והתפתחותם הייתה נורמאלית לחלוטין (תמונה 10) למרות שהם מבטאים גן של הטפיל. טרם הנדסת צמחי טבק ועגבנייה בקטע ה-DNA המיועד להשתקה, נבדקה השפעתו הישירה של הקטע *in vitro* על עלקת מצרית, ע"י הזרקת dsRNA ישירות לפקעיות של הטפיל. מהתוצאות מסתבר שהזרקה ישירה של dsRNA-*M6PR* לפקעיות הטפיל גרם להפחתה משמעותית (60 – 80%) ברמת הסוכרים הכללית בפקעיות בהשוואה לביקורות WT ו-DEPC (תמונה 3). מכאן אנו לומדים שקטע הגן שתוכנן ויועד להשתקת הגן של הטפיל הינו מתאים ויעיל לתהליך ההשתקה. בעבודה דומה Huang et al., 2006 אך במערכת טפיל – פונדקאי שונה (נמטודה – ארבידופסיס) הראו החוקרים שההשתקה היעילה ביותר לגן 16D10 של הנמטודה התקבלה בעקבות הזרקה של *in-vitro* dsRNA

לנמטודה. על מנת ליצור dsRNA של הגן *M6PR* ברקמת הצמח, שובט הקונסטראקט pBIN19::35S::M6PR (תמונה 4) המכיל את קטע הגן להשתקה תחת בקרתו של הפרומוטור 35S תחילה לחיידקי אגרובקטריום ולאחר מכן לצמחי טבק ועגבנייה. נוצרו 8 קווי עגבנייה טרנסגניים בלתי תלויים בדור T1, שהפנוטיפ שלהם היה נורמאלי בהשוואה לזן הבר wt (תמונה 10). להמשך העבודה התמקדנו בשלושה קווים טרנסגניים של עגבנייה (6, 2, ו-7) שהראו תגובה בריאקציה PCR ו-RT-PCR (תמונות 5 ו-6). לפי תוצאות Southern blot, הגן *M6PR* עבר אינטגרציה לגנום בעותק אחד (תמונה 7).

אנליזת siRNA בצמחי עגבנייה טרנסגניים אשרה נוכחות מולקולות של siRNA (21nt) של הגן *M6PR* (תמונה 8). לא נמצאו siRNAs בצמח עגבנייה wt. מכאן ניתן להסיק שמולקולות siRNA מקורן מ-dsRNA של הגן *M6PR* המוחדר לגנום העגבנייה. כנראה הצמח הטרנסגני בגלל המבנה המיוחד IR הצליח ליצור dsRNA שנחתך לאחר מכן ע"י אנזים מסוג Dicer-RNase III למולקולות קצרות siRNA. לאחר שהטפיל עלקת נצמד אל הפונדקאי שלו, הוא מפתח איבר שנקרא מצף (haustorium), שהוא איבר רב תאי, החודר לרקמות הפונדקאי ומקשר את המערכת הוסקולרית של הטפיל לרקמות השיפה והעצה של הפונדקאי. תאי המצף של העלקת חולקים חיבורים פלסמודזמיים עם אלמנטי הכברה (sieve elements) של שיפת הפונדקאי (Dör, 1995). לכן אנחנו מניחים שלאחר ההתקשרות בין הטפיל לפונדקאי יש מעבר של מוליקולות ה-siRNA מהפונדקאי אל הטפיל. בנוסף לעובדה שהטפיל יוצר מבלע חזק (שואב מים, סוכרים, מינרלים ומאקרומווליקולות שונות מהפונדקאי) לכן רוב הסיכויים שה-siRNAs של הגן *M6PR* יגיעו לן המטרה בטפיל. לאחרונה צוות המדענים Roney et al., 2007 הוכיחו שישנו מעבר של mRNA אנדוגני מצמח הפונדקאי עגבנייה (*Lycopersicon esculentum* Mill) אל הצמח הטפיל כשות (*Cuscuta pentagona* Engelm) דרך צינורות הפלואם.

בהנחה שקיים מעבר של מוליקולות של siRNA של הגן *M6PR* מהצמח הפונדקאי עגבנייה לצמח הטפיל עלקת, רצינו לבדוק את השפעתן של מולקולות אלו על רמת ה-mRNA של גן המטרה הן בפקעיות והן בגבעולים של הטפיל בשלב מוקדם של התפתחותו על שורשי הצמח הפונדקאי. לצורך אנליזה של רמת ה-mRNA של הגן *M6PR* בפקעיות של עלקת מצרית אשר גדלו על צמחים טרנסגניים לעומת צמחי ה-wt באמצעות Real-Time PCR, ניסינו לאתר גנים של ביקורת בטפיל שלא היו ידועים עד כה. התמקדנו בשני הגנים Cyclophilin ו-Actin. לפי התוצאות (תמונה 9), התקבלה ירידה משמעותית ברמת ה-mRNA של הגן *M6PR* הן בפקעיות והן בגבעולים של הטפיל במספר צמחים של הקווים הטרנסגניים 2,6 ו-7 (60-80%) בהשוואה לאלו שגדלו על זן הבר NT או EV. עיכוב משמעותי בהתפתחות העלקות על שורשי הקווים הטרנסגניים בשלבים מוקדמים הינו קריטי. זה הוכח גם בעבודתם של Hamamouch et al. (2005), Aly et al. (2006).

ככל שרמת ה-siRNA בצמח הטרנסגני הייתה גבוהה יותר, התקבלה ירידה משמעותית ברמת ה-mRNA של הגן *M6PR* בפקעיות או בגבעולים של עלקת מצרית אשר גדלו על צמחים טרנסגנים (תמונה 9). ממצאים כאלה נתקבלו גם בעבודתם של (Tomilov et al., 2008). בעבודה שלנו, למרות שהוכחנו שגורם ההשתקה siRNA מיוצר ברמה גבוהה בצמח הטרנסגני לא הצלחנו לאבחן ב-siRNA בצמח הטפיל המחובר לצמח הטרנסגני. אי ההצלחה יכולה לנבוע משתי סיבות: יתכן שהריכוז של siRNA ברקמת הטפיל היה נמוך מאד מתחת לסף האבחון או יתכן שגורם ההשתקה עובר מהפונדקאי לטפיל בצורת dsRNA. במחקרים קודמים (Brosnan et al., 2007; Tomilov et al., 2008; Voinnet, 2005) נתקלו באותה תופעה. למרות הכל, הצלחנו לאחרונה לאבחן ב-siRNA – CMV (Cucumber Mosaic Virus) בפקעיות של עלקת שגדלו על צמח טבק המודבק בוירוס – CMV. בעבודה זו הצלחנו להוכיח שהייתה פגיעה ברמת הפעילות של האנזים M6PR המתבטאת בירידה ברמת המניטול בטפילים שגדלו על צמחים טרנסגנים בהשוואה לטפילים שגדלו על צמחים לא טרנסגנים (תמונה 11-A). נמצא שרמת המניטול (%) מכלל הסוכרים שהופקו מפקעיות עלקת אשר גדלו על צמחים טרנסגנים ירדה באופן משמעותי בהשוואה לרמת המניטול בביקורות השונות. כמו כן הצלחנו להוכיח שמספר העלקות המתות (תמונה 11-B) שנמצאו על קווים טרנסגנים היה גבוה משמעותית בהשוואה לאלו שנמצאו על צמחי הביקורת, אינדיקציה לכך שצמחי עגבנייה טרנסגנים היו עמידים יותר לטפיל מאשר זן הבר.

לסיכום

התועלת הצפויה מבצוע המחקר:

- א. בניית גישה גנטית חדשה כחלופה להדברה הכימית המקובלת, שתאפשר הגנה על גידולים מרכזיים בפני מינים שונים של עלקת וללא פגיעה באיכות הסביבה.
- ב. הקטנת הנזק הישיר והעקיף (הפחתת מאגר הזרעים של הטפיל בקרקע) שהטפיל גורם לגידולים כעגבניות, תפ"א, קטניות, חמניות, וגזר.
- ג. אפשרות לגדל עגבניות בשטחים מאולחים בעלקת.

המשך המחקר בעתיד:

- א. בכדי להשלים את המחקר הנ"ל צריך: לבצע הכלאות עצמיות של הקווים הטרנסגנים עד לקבלת צמחים הומוזיגוטיים בכדי להגביר את תהליך ההשתקה של גן המטרה.
- ב. לאפיין מעבר ונוכחות של siRNA גם בצמח הטפיל עלקת.
- ג. יש לבחון את עמידותם של הצמחים הטרנסגנים המבטאים את גן המטרה כנגד צמחים טפילים אחרים, כגון עלקות ממינים שונים וכשות.

References

- Aly, R., Plakhin, D. and Achdari, G. (2006) Expression of sarcotoxin IA gene via a root-specific tob promoter enhanced host resistance against parasitic weeds in tomato plants. *Plant Cell Rep.* **25**:297-303.
- Aly, R. (2007) Conventional and biotechnological approaches for control of parasitic weeds. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* **43**:304 - 317.
- Aly, R., Cholakh H, Joel DM Leibman D, Steinitz B, Zelcer A, Naglis A, Yarden O and Gal-On A (2009). Gene silencing of mannose 6-phosphate reductase in the parasitic weed *Orobanche aegyptiaca* through the production of homologous dsRNA sequences in the host plant. *Plant Biotechnology Journal* 7: pp, 00-00 (in press).
- Amsellem, Z., Cohen, B.A. and Gressel, J. (2002) Engineering hypervirulence in a mycoherbicide fungus for efficient weed control. *Nat. Biotechnol.* **20**:1035-1039.
- Antonova, T.S. 1994. Biochemical aspects of the development of new virulent forms in the Moldavian population (race C) of *Orobanche cumana* Wallr. Against the background of resistant sunflower cultivars. *in: Pieterse A.H., Verkleij J.A.C. and ter Borg, S.J., (eds.) Proceedings of the 3rd International Workshop on Orobanche and Related Striga Research, Amsterdam, The Netherlands, 1993. Royal Tropical Institute, Amsterdam. pp. 290-292.*
- Brosnan, C.A., Mitter, N., Christie, M., Smith, N.A., Waterhouse, P.M. and Carroll, B.J. (2007) Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:14741-14746.
- Delavault, P., Simier, P., Thoiron, S., Veronesi, C., Fer, A. and Thalouarn, P. (2002) Isolation of mannose 6-phosphate reductase cDNA, changes in enzyme activity and mannitol content in broomrape (*Orobanche ramosa*) parasitic on tomato roots. *Physiol. Plant* **115**:48-55.
- Dörr, J. and Kollemann, R. (1995) Symplasmic sieve element continuity between *Orobanche* and its host. *Bot. Acta* **108**:47-55.
- Hamamouch, N., Westwood, J., Banner, I., Cramer, C., Gepstein, S. and Aly, R. (2005) A peptide from insects protects transgenic tobacco from a parasitic weed. *Transgenic Res.* **14**:227-236.
- Huang, G., Allen, R., Davis, E.L., Baum, T.J., Hussey, R.S. 2006. Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 14302-14306.
- Joel, D.M., Hershenhorn, Y., Eizenberg, H., Aly, R., Ejeta, G., Rich, P.J., Ransom, J.K., Sauerborn, J. and Rubiales, D. (2006) Biology and Management of Weedy Root Parasites, in *Horticultural Reviews* (Janick J ed) pp 267-349: John Wiley & Sons.
- Parker, C. and Riches, C.R. (1993) *Parasitic Weeds of the World: Biol. Control, CAB International, Wallingford, U.K.* 332pp.
- Roney, J., Khatibi, P. and Westwood, J. (2007) Cross-species translocation of mRNA from host plants into the parasitic plant dodder. *Plant Physiol.* **143**:1037-1043.
- Tomilov, A.A., Tomilova, N.B., Wroblewski, T., Michelmore, R. and Yoder, J.I. (2008) Trans-specific gene silencing between host and parasitic plants. *Plant J.* **56**:389-397.
- Voinnet, O. (2005) Non-cell autonomous RNA silencing. *FEBS Lett.* **579**:5858-5871.

סיכום עם שאלות מנחות

| |
|---|
| מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה. |
| מטרת העבודה הכללית היא השתקת גן מפתח <i>M6PR</i> בצמח הטפיל עלקת ע"י יצירת dsRNA של הגן בצמח הפונדקאי וזאת על מנת ליצור קו עגבנייה עמיד לטפיל. זה ייעשה ע"י הכנת צמחי עגבנייה טרנסגניים המבטאים את גן המטרה המיועד להשתקה בצורת Inverted Repeat, בדיקת האינטגרציה של הגן <i>M6PR</i> בצמחי העגבנייה טרנסגניים בשיטות מוליקולריות שונות, בדיקת השפעת ה-siRNA שנוצר בצמח הטרנסגני על רמת ה-mRNA <i>M6PR</i> , רמת המניטול ועמידות הצמחים הטרנסגניים לטפיל. |
| עיקרי הניסויים והתוצאות |
| בבדיקת האינטגרציה של הגן <i>M6PR</i> בצמחי העגבנייה טרנסגניים בשיטות מוליקולריות שונות, נמצא שהגן עבר אינטגרציה לגנום בעותק יחיד והצמחים הטרנסגניים הצליחו לייצר siRNA. בבדיקת השפעת ה-siRNA שנוצר בצמח הטרנסגני על רמת ה-mRNA <i>M6PR</i> בעלוקת מצרית ע"י Real-Time PCR, התקבלה ירידה משמעותית (60-80%) ברמת ה-mRNA של הגן <i>M6PR</i> בגבעולים ובפקעיות של עלקת מצרית במספר קוים טרנסגניים, התקבלה ירידה משמעותית ברמת המניטול בפקעיות של עלקת שגדלו על קוים טרנסגניים והתקבלה עליה משמעותית במספר הפקעיות המתות שהתפתחו על קוים טרנסגניים בהשוואה לעלקות שגדלו על צמחים לא טרנסגניים. |
| מסקנות מדעיות והשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח? |
| התוצאות תומכות בהיפותיזת העבודה שניתן להשתיק M6PR בעלקת. הוכנה התשתית הדרושה להמשך המחקר להשתקת גנים נוספים. הושגו מטרות המחקר כפי שהתחייבו בתוכנית המחקר. |
| בעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתורה לביצוע תוכנית המחקר? |
| לבצע הכלאות עצמיות של הקוים הטרנסגניים עד לקבלת צמחים הומוזיגוטיים בכדי להגביר את תהליך ההשתקה של גן המטרה. לאפיין מעבר ונוכחות של siRNA גם בצמח הטפיל עלקת. יש לבחון את עמידותם של הצמחים הטרנסגניים המבטאים את גן המטרה כנגד צמחים טפילים אחרים, כגון עלקות ממינים שונים וכשות |
| הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטוט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פטנטים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי. |
| EU Cooperation (COST) 849 Oeiras-Lisbon, Portugal, 2006. Bi-national Japan-Israel workshop, Jerusalem 2007. The 9 th World Congress on Parasitic Plants (2007). Charlottesville, VA – USA. The 5 th International Science Congress, Vancouver- Canada, 2008. |
| Aly, R. Cholakh H, Joel DM Leibman D, Steinitz B, Zelcer A, Naglis A, Yarden O and Gal-On A (2009) silencing of mannose 6-phosphate reductase in the parasitic weed Orobanche aegyptiaca through the pro of homologous dsRNA sequences in the host plant. <i>Plant Biotechnology Journal</i> 7: pp. 00-00 (in press). |
| פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות) |
| ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט): כן, ממליץ לפרסם את הדוח! |
| האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן* - לא - |

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