

שליטה בעיתוי פריחה על ידי ביטוי מושרה של מיקרו-רנ"א 172

Control of flowering time by conditional expression of microRNA172

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

צמחי נוי, מינהל המחקר החקלאי	צחי ארזי
צמחי נוי, מינהל המחקר החקלאי	סתו רן
מכון רוברט סמית למדעי הצמח וגנטיקה בחקלאות, הפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה האוניברסיטה העברית בירושלים	ויינשטיין אלכסנדר
ממ"ר גידולים חדשים ואינטרודוקציה, שה"מ, משרד החקלאות	איתן שלמה

Arazi Tzahi, Ornamental Horticulture, ARO, P.O.B. 6 Bet-Dagan 50250. E-mail: tarazi@agri.gov.il

Stav Ran, Ornamental Horticulture, ARO, P.O.B. 6 Bet-Dagan 50250. E-mail: stavred15@yahoo.com

Vainstein Alexander, The Robert H. Smith Institute of Plant Sciences and Genetics in Agriculture. E-mail: vain@agri.huji.ac.il

Eitan Shlomo, Dep. of Floriculture, Extension Service, Ministry of Agriculture, P.O.B. 6, Bet Dagan. Email: sheitan@shaham.moag.gov.il

יולי 2009

תמוז-תשס"ט

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

חתימת החוקר

*

רשימת פרסומים

תקציר

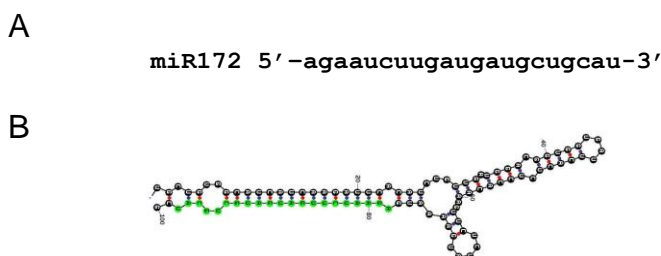
מיקרו-רנ"א (miRNA), הינן מולקולות רנ"א לא מקודד קטנות באורך 21-24 נוקליאוטידים המשמשות כבקרים שליליים של ביטוי גנים בצמחים. בארבידופסיס ובצמחים נוספים נמצא ש-miR172 משמש בקר מרכזי של המעבר מצמיחה וגטטיבית לפריחה ללא תלות באורך היום. **הצגת הבעיה:** הגיפסנית מוגדר כצמח יום ארוך הכרחי לצורך פריחה. בישראל מפריחים את הגיפסנית בחורף בעזרת תאורה מלאכותית המייקרת מאוד את הגידול. **על מנת לשפר מצב זה המטרות הספציפיות של המחקר היו:** (1) ללמוד את הקשר בין מירנ"א-172 לפריחה בגיפסנית. (2) להנדס צמחי גיפסנית כך שיוכלו לבטא את מירנ"א-172 באופן רציף ואו בתגובה למשרן חיצוני. (3) לברור ולאפיין צמחי גיפסנית מהנדסים בהם מוקדמת הפריחה כתוצאה מביטוי מושרה או רציף של מירנ"א-172. **שיטות העבודה:** בוצעה אנליזת northern של ביטוי miR172 בגיפסנית לאורך ההתפתחות עד לפריחה. בוצעה טרנספורמציה של גיפסנית לביטוי רציף ומושרה של miR172. בוצעה אנליזה של הקווים הטרנסגנים וקביעת מועד הפריחה בקווים השונים במטרה לזהות קו המקדים פריחה. **תוצאות עיקריות:** מצאנו ש-miR172 שמור במספר זני גיפסנית מסחריים ואיפיינו את דגם הביטוי שלו בקודקוד לאורך הצימוח מיחור ועד פריחה. כמו כן הינדסנו בהצלחה קונסטרוקטים המבטאים את miR172 באופן רציף ומושרה והוכחנו את פעילותם בצמחים. החדרנו את הקונסטרוקטים הנ"ל לגיפסנית ואיפיינו מספר קוים טרנסגנים לביטוי רציף ומושרה של miR172. אנליזה של רמת ביטוי miR172 מציעה שלמרות שהקווים טרנסגנים, אף אחד מהקווים אינו מבטא את miR172 בצורה גבוהה משמעותית יותר מזן הביקורת. בהתאמה איפיון מועד הפריחה בקווים השונים לעומת קוי הביקורת לא זיהה קו טרנסגני המקדים את הפריחה. **מסקנות והמלצות:** miR172 הינו miRNA האחראי על המעבר מהשלב הווגטיבי לפרודוקטיבי קרי פריחה בצמחים שונים. miRNA זה שמור בגיפסנית ומבטא לאורך כל התפתחותה בקודקוד הצמיחה. ביטוי miR172 בגיפסנית טרנסגנית על ידי שימוש בפרוקסור מארבידופסיס לא הצליח לגרום להצטברות ה-miRNA ולהקדמת פריחה. המלצות לחקלאי: אין.

מבוא

שליטה בעיתוי הפריחה הינה משאת נפשו של כל מגדל הפרחים. שליטה כזו תאפשר כוונן מדויק של מועד הפריחה כך שיתאים למועד השיווק האופטימאלי לגידול המסוים. כך תגדל יכולת התחרות בשווקים זרים ויתקבל הערך הגבוה ביותר עבור המוצר. אחת הדרכים לאפשר מניפולציה של עיתוי פריחה היא על ידי ניצול המנגנונים המולקולריים המעורבים בתהליך זה והנדסתם בדרך שתביא את התוצאות הרצויות.

במהלך השנים האחרונות, נחשפה עובדת הימצאותם של מיקרו-רנ"א (miRNA) בצמחים (Bartel and Dugas and Bartel, 2004; Bartel, 2003). תגלית זו עוררה מהפכה בעולם הצמחים מכיוון שנתגלו בקרים חדשים המעורבים באספקטים רבים של התפתחות הצמח שלא היו ידועים. מירנ"א, הינן מולקולות רנ"א לא מקודד קצרות באורך 21-22 נוקליאוטידים השמורות בדרך כלל באבולוציה. המירנ"א משתעתק מגנים ספציפיים, תחילה לפרוקסור באורך שבין 70 ל-300 נוקליאוטידים (pre-miRNA), המתקפל לצורת ראש סיכה (hairpin), כאשר המירנ"א נמצא בחלק ה-3' או ה-5'. בהמשך, נחתך ה-pre-miRNA על-ידי אנזים הנקרא DICER-LIKE (DCL) ליצירת המירנ"א הבוגר, שלאחר מכן נשלח לציטופלסמה ומשתלב בקומפלקס חלבוני הקרוי RISC ומנחה אותו ל-mRNA המטרה שאותו הוא חותך או מעכב את תירגומו (Bartel, 2004). בצמחים קיימת הומוולוגיה גבוהה בין המירנ"א ל-

mRNA המטרה, דבר המקל על חיזויו באופן ממוחשב (Bartel and Bartel, 2003). אנליזות ביואינפורמטית וניסויית של מירנ"א צמחיים מצביעות על כך שרוב mRNA המטרה המבוקרים על ידם מקודדים לחלבונים רגולטורים שונים ובעיקר פקטורי שעתוק המעורבים בהתפתחות או התמיינות הצמח והפרח ומכאן חשיבותם (Dugas and Bartel, 2004). אחד המירנ"א שאופיינו נכון להיום הוא miR172 (איור 1). miR172 שמור באבולוציה ונכון להיום שובט מצמחים שונים כולל דו-פסיגיים כארבידופסיס וסויה וחד-פסיגיים (המרוחקים אבולוציונית מארבידופסיס) כסורגום, תירס ואורז (<http://microrna.sanger.ac.uk/cgi-bin/sequences/search.pl?all=on&search=miR172>). נמצא שאתר קישור ל miR172 מצוי במRNAs המקודדים לחלבונים מסוג APETALA2 (AP2) כגון *TOE1*, *TOE2*, *TOE3* בארבידופסיס ובצמחים רבים אחרים כגון סויה, אורז חיטה, עגבנייה ואפונה (Aukerman and Sakai, 2003). כצפוי תוצרי חיתוך ע"י miR172 של ה-mRNAs המקודדים ל- *TOE1* ו- *TOE2*, שובטו ורוצפו מארבידופסיס (Aukerman and Sakai, 2003) ולחלבונים מסוג APETALA2 מתירס (Chuck *et al.*, 2007). מכאן ש miR172 משמש כנראה כבקר שלילי של חלבונים רגולטורים אלו.



איור 1. מיקרו-רנ"א 172 מארבידופסיס. A – הרצף של miR172 כפי שזוהה בארבידופסיס. B – הפרקורסור של miR172 מארבידופסיס (pre-miR172). מוצג המבנה השניוני של הפרקורסור כפי שנחזה על ידי תוכנית MFOLD (Zuker, 2003). בירוק מודגש הרצף של miR172.

ידוע כי צמחי ארבידופסיס בעלי מוטאציית החסר *toe-1* מקדימים לפרוח ואילו צמחים החסרים את *toe-1* ו-*toe-2* מקדימים מאוד לפרוח. תוצאות אלו הובילו למסקנה ש- *TOE1* ו-*TOE2*, מתפקדים כמעכבים של המעבר מצמיחה וגטטיבית לפריחה (Aukerman and Sakai, 2003). בהתאמה, ביטוי יתר של *TOE1* מעכב את הפריחה (Aukerman and Sakai, 2003) וביטוי רציף של miR172 תחת הבקרה של הפרומוטר 35S מקדים את הפריחה בארבידופסיס באופן משמעותי גם בתנאי יום ארוך וגם בתנאי יום קצר (Aukerman and Sakai, 2003). נמצא שרמתו של miR172 עולה מרגע הנביטה ומגיעה לשיאה לפני הפריחה בקורלציה ישירה לתפקידו כבקר שלילי של מעכבי הפריחה *TOE1* ו-*TOE2*, שסילוקם מהתא חיוני לאינדוקציה של פריחה (Aukerman and Sakai, 2003; Chen, 2004). לאחרונה התבררו פרטים נוספים על מנגנון הפעילות של miR172 (Jung *et al.*, 2007). התברר שרמתו של miR172 מווסתת על ידי הגן *GIGANTEA*, האחראי לבקרת הפריחה בהתאם לאורך היום, ומגדירה מסלול חדש לבקרה על פריחה על ידי השריית ביטוי של הגן FT (זאת על ידי הורדת הביטוי של מעכבי הפריחה מסוג TOE) במסלול שאינו תלוי ב-CONSTANTS. בנוסף נמצא שביטוי ביתר של miR172 ב-*N. benthamiana* גורם לשינויי מופע בפרחים ומקדים את הפריחה (Mlotshwa *et al.*, 2006). כמו כן באחרונה התברר שבתירס נוכחותו של *gl15*, גן דמוי *APETALA2*, שומרת את הפאזה היובנלית. עוד נמצא ש- miR172 הינו בקר שלילי של *gl15* ונוכחותו מורידה את רמתו של *gl15* ובכך מעודדת מעבר מהפאזה היובנלית לפאזה הרפרודוקטיבית

(Lauter *et al.*, 2005). יחד הנתונים הנ"ל מצביעים על כך שתפקידו של miR172 שמור באבולוציה ושביטוי ביתר מקדים את המעבר מהפאזה הוגטיבית לפאזה הרפרודוקטיבית קרי פריחה בצמחים נושאי זרעים. פרח הקטיף מהסוג גיפסנית (*Gypsophila*) הינו צמח יום ארוך המשתייך למשפחת הציפורניים (*Caryophyllaceae*). הסוג כולל כ- 125 מינים חד ורב שנתיים שמוצאם מאסיה ואירופה. המין גיפסנית מכבדית *Gypsophila paniculata*, הידוע גם בכינוי baby's breath, הינו מין רב שנתי (Shillo, 1985). זהו המין העיקרי שזניו משמשים כפרחי-קטיף, וזאת בשל מבנה הצמח והתפרחת. ענפי הצמח ארוכים, התפרחת מכילה פרחים רבים ומלאים והפרח הקטוף משמש כמילוי בסידורי פרחים (Shillo, 1985). בישראל, גידול הגיפסנית משתרע 2200 דונם בישראל, נחשב לגידול השני בחשיבותו כפרח קטיף בישראל (134 מיליון פרח בשנת 2004 – נתוני מועצת הפרחים) ומקום 13 בעולם בשנת 2004 בפדיון (נתוני הבורסות ההולנדיות VBN לשנת 2004). הצמחים הראשונים הובאו לישראל בשנות ה-60, ובשנות ה-70 החלו לבצע ניסויים שמטרתם בקרת הפריחה על מנת להתאים את הגיפסנית לתנאי הארץ. הגיפסנית מוגדר כצמח יום ארוך הכרחי לצורך פריחה (Shlomo *et al.*, 1985). בשנים האחרונות ניסו לטפח זני גיפסנית שאין להם דרישה ליום ארוך אך ללא הצלחה, בעיקר בשל מספר הזנים המוגבל של הגיפסנית התרבותית ועקרותם הכמעט מוחלטת (Shillo, 1985). בישראל מפריחים את הגיפסנית בחורף בעזרת תאורה מלאכותית היוצרת יום ארוך (שלמה, 1984; שלמה *et al.*, 1996) וטיפולי ג'יברלין (Shlomo *et al.*, 1985). לעיתים הגירוי של יום ארוך בחורף לא נקלט ע"י הצמח ולכן מתעכבת הפריחה במיוחד על רקע של טמפרטורות נמוכות (Shillo and Halevy, 1982).

לאור זאת המטרות הספציפיות של המחקר היו:

1. ללמוד את הקשר בין מירנ"א-172 לפריחה בגיפסנית.
2. להנדס צמחי גיפסנית כך שיוכלו לבטא את מירנ"א-172 באופן רציף ואו בתגובה למשרן חיצוני.
3. לברור ולאפיין צמחי גיפסנית מהונדסים בהם מוקדמת הפריחה כתוצאה מביטוי מושרה או רציף של מירנ"א-172.

פירוט עיקרי הניסויים:

1.0 הקשר בין miR172 לפריחה בגיפסנית:

1.1 בחינת הביטוי של miR172 לאורך התפתחות הגיפסנית עד לפריחה:

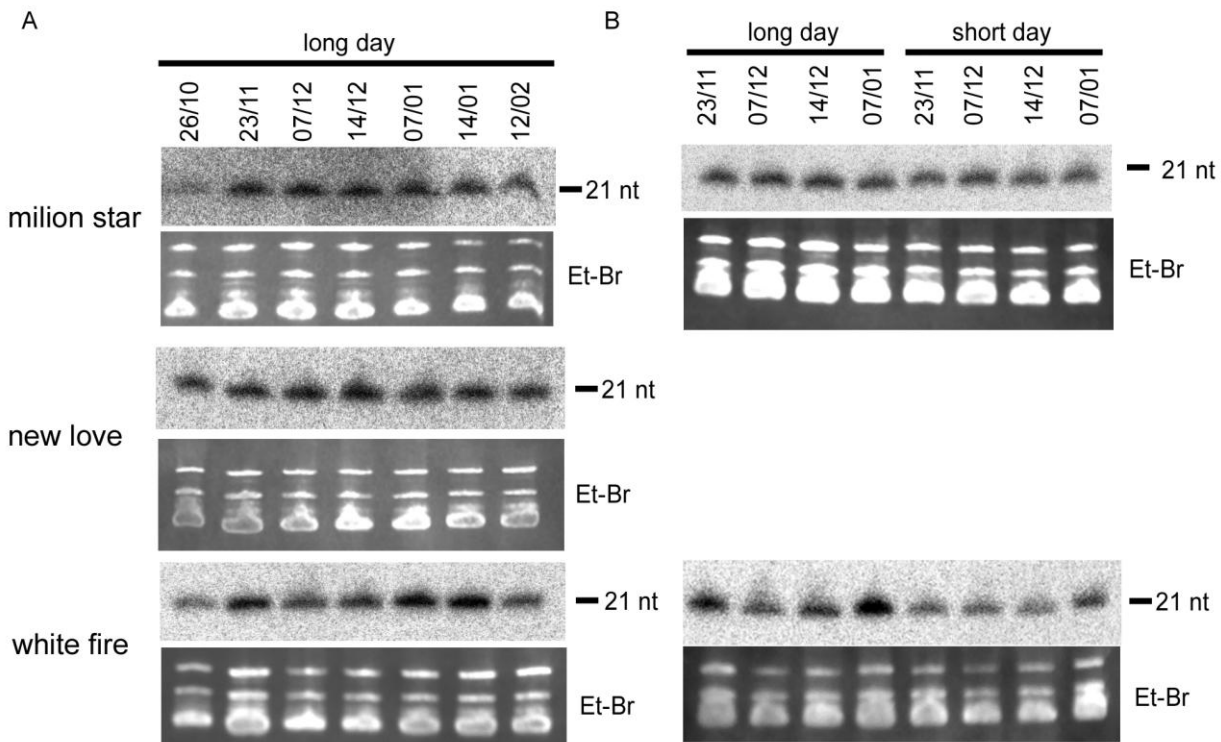
אנליזה של ביטוי מראה שבארבידופסיס הגדל בתנאי יום ארוך, קיימת התאמה מלאה בין ריכוזי miR172 ובין מועד הפריחה כך שככל שמתקרב מועד הפריחה רמתו של miR172 בצמח הולכת ועולה בהתאמה עד לסף ביטוי מסוים שמעבר לו מתרחשת פריחה (Aukerman and Sakai, 2003). על מנת לאפיין את רמות הביטוי של miR172 בגיפסנית, צמחי גיפסנית משלושה זנים מסחריים new love, white fire ו-1 million star גודלו בתנאי יום ארוך (16 שעות אור) ויום טבעי בחורף (יום קצר) בחממה משלב הייחור ועד לפריחה. הצמחים נשתלו ב- 26.10 (איור 2) ובתאריך

07.01 בצמחים שגודלו ביום ארוך ניתן היה להבחין בניצני פרחים. בצמחים שגודלו ביום קצר כמעט ולא היתה התארכות פרקים ולא נראו ניצני פרחים.



איור 2. צמחוני גיפסנית לפני שתילה. התמונה נילקחה ב- 26.10.

על מנת לבחון את נוכחותו של miR172 בגיפסנית ורמתו לאורך ההתפתחות עד לפריחה, מוצו כל מספר שבועות רנ"א קטנים מקודקודי הצמיחה של שלושה צמחי גיפסנית בלתי תלויים ורמתו היחסית של miR172 בכל דוגמת רנ"א ניקבעה בעזרת אנליזת northern של כמויות זהות של רנ"א תוך שימוש בגלאי מסומן רדיואקטיבי שהינו בעל רצף משלים ל- miR172 מארבידופסיס. באיור 3 ניתן לראות כי miR172 מארבידופסיס שמור בגיפסנית ומתבטא בקודקוד הצמיחה של שלושת זני הגיפסנית שניבדקו בגודל הצפוי (21 בסיסים). רמת הביטוי של miR172 בזן Million Star ו-New Love אינה משתנה לאורך התפתחות הצמח ובזן Million Star גם ללא הבדל משמעותי בשני תנאי התאורה. לעומת זאת בזן white fire נצפו רמות גבוהות יותר של miR172 בצמחים שגדלו ביום ארוך וכן נצפתה עלייה הדרגתית ברמות miR172 ככל שהצמחים שגדלו ביום ארוך התקרבו לפריחה (7-14/01). גם ביום קצר נצפתה עלייה אך בעוצמה פחותה מכיוון שהצמחים עדיין לא התקרבו לפריחה, כך שנראה שבזן זה קיים קשר בין הצטברות miR172 לפריחה.



איור 3. miR172 מתבטא בגיפסנית ועולה לקראת פריחה רק בזן White Fire. אנליזה Northern של miR172 בזן הגיפסנית המצויין שנשתל ב- 26.10 וגודל בתנאי יום ארוך (long day) או יום טבעי קצר (short day). יש לציין כי בתאריך ה-07.01 נראו כבר ניצנים בצמחים שגדלו ביום ארוך. השוואה בין יום ארוך ליום קצר מוצגת ב-B. רנ"א כללי ($20 \mu\text{g}$), הופק מקודקוד הצמיחה בתאריך המצויין והופרד בג'ל דנטורטיבי, הועבר למברנה ועבר היברידיזציה עם גלאי רדיואקטיבי בעל רצף משלים ל-miR172 מארבידופסיס. כבקורת לכמות רנ"א בכל מסלול שימשו 5s-rRNA ו-tRNA כפי שניראו לאחר צביעה באסידיום ברומיד (EtBr).

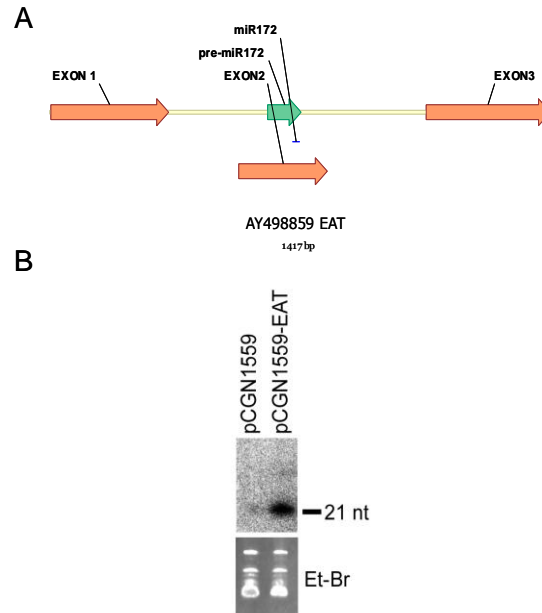
1.2 השפעת אתנול על צמחי גיפסנית כצעד מקדים לביטוי מושרה אתנול של miR172 בגיפסנית

מכיוון שפרט לביטוי רציף (תחת CaMV-35S) התכוונו להשרות ביטוי של miR172 על ידי אתנול, בחנו את עמידותה של הגיפסנית לריכוזים הולכים ועולים של אתנול, שנמצאו בעבר כאפקטיביים להשריית ביטוי במערכת ה-alc, על מנת לשלול פיתוטוקסיות (Salter *et al.*, 1998). על מנת ללמוד את השפעת האתנול על גיפסנית בחנו ויזואלית והתפתחותית את האפקט של אתנול בריכוזים 0.5%, 1.0% ו-2.0% בנוכחות משטח BB5 שרוסס חד-פעמית על שתילים בני חודשיים ושבוע מהזן white fire שגדלו בתנאי יום ארוך וקצר. כבקורת שימשה קבוצת שתילים שרוססה במשטח בלבד. ריסוס זה לא גרם לצריבות כל שהן על העלים אולם להפתעתנו נגרם עיכוב צמיחה משמעותי בצמחי יום ארוך (לא מוצג) ואפקט הפוך של צימוח בצמחים שגדלו ביום קצר (לא מוצג) בכל הריכוזים. אפקט זה חזר גם בשנה השנייה ומכאן נראה כי אתנול משפיע על הגיפסנית ולכן אינו מתאים לשמש כמשרן אינטרטי. עכב כך החלטנו להשתמש במערכת המושרית על ידי המשרן estradiol, המקובלת בצמחים, כמערכת השריה לביטוי miR172.

1.3 הנדסת ווקטורים לביטוי רציף ומושרה של miR172 בגיפסנית

על מנת לבטא את miR172 באופן רציף שיבטנו את אקסון 2 של הגן EAT מארבידופסיס המקודד ל-pre-miR172 (איור 4A) תחת הפרומטר CaMV-35S והטרמינור CaMV-OCS והחדרנו את הקסיטה לפלסמיד הבינארי pCGN1559. כדי לבחון האם הקונסטרוקט הנ"ל אכן מסוגל להשרות ביטוי של miR172 בוגר הזרקנו אגרובקטריום שהוחדר לו הפלסמיד הנ"ל ופלסמיד דומה ללא EAT לעלי בנטמיאנה ובחנו את הביטוי החולף של miR172 בעלים

המוזרקים לאחר 48 שעות בעזרת אנליזה Northern. כפי שניתן לראות באיור 4B, רמת miR172 בעלים שהוזרקו ב-pCGN1559-EAT גבוהה בהרבה מאשר בעלי הביקורת ומכאן שהקונסרקט שהינדסנו תקין וניתן לשימוש בצמחים. על מנת לבטא את miR172 באופן מושרה שיבטנו את אותה קסיטה לפלסמיד pER10 המבוסס על מערכת המשרה ביטוי לאחר ריסוס ב- estradiol (Zuo *et al.*, 2000). הפלסמידים הנ"ל הוחדרו לאגרובקטיריום מזן AGL0 על מנת לבצע טרנספורמציה לגיפסנית.

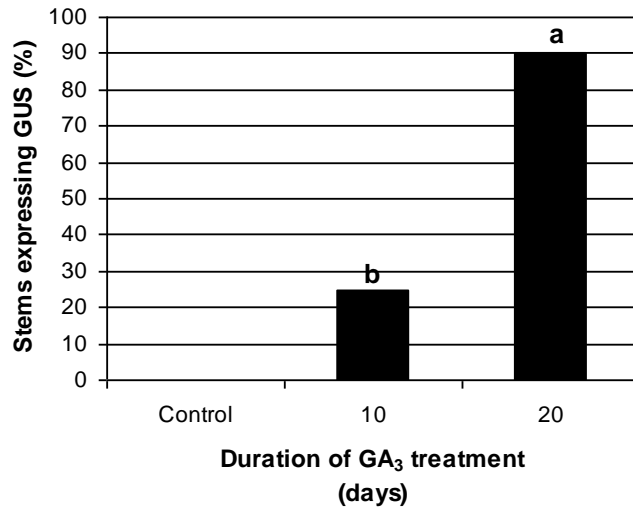


איור 4. EAT מתבטא באופן חולף בעלי בנטמיאנה ומעובד ל- miR172 בוגר. (A) ציור סכמטי של הגן EAT מארבידופסיס. בכתום ובירוק מצוינים האקסונים והפרקורסור של miR172 (pre-miR172), בהתאמה. (B) אנליזה Northern של miR172 בעלי בנטמיאנה 48 שעות לאחר שעברו אינפילטרציה עם אגרובקטיריום, שעבר טרנספורמציה עם הפלסמיד הבינארי pCGN1559 או עם פלסמיד זהה המכיל את אקסון 2 של EAT תחת הפרומוטור CaMV-35S (pCGN1559-EAT). רנ"א כללי (20 µg), הופק מהעלה המוזרק והופרד בג'ל דנטורטיבי, הועבר למברנה ועבר היברידיזציה עם גלאי רדיואקטיבי בעל רצף משלים ל- miR172. בתור בקורת לכמות הרנ"א בכל מסלול שימשו tRNA ו-5s-rRNA כפי שניראו לאחר צביעה באטידיום ברומיד (EtBr).

2.0 התמרת צמחי גיפסנית על מנת לבטא את miR172 באופן רציף ואו בתגובה למשרן חיצוני.

2.1 חומר צמחי:

לניסויי ההתמרה נבחרו שני קווי גיפסנית שונים (קו 2 ו-קו 7) אשר גדלו בחממה תחת תנאי תאורה טבעיים. ייחורי גבעול בעלי 6 או 8 עלים מפותחים לחלוטין נקצרו מצמחי החממה ושימשו להכנת האקספלנטים. הייחורים שנקטפו לשם טרנספורמציה נשמרו לא יותר משבועיים ב- 4°C. עשרים יום לפני קצירת הייחורים רוססו צמחי האם פעם אחת עם 1mM gibberelic acid (GA₃). הטיפול של צמחי האם ב GA₃ מאפשר תדירות טרנספורמציה גבוהה (75-90%) אקספלנטים שמבטאים GUS מסך כל האקספלנטים שעברו אילוח עם החיידק (איור 5). הייחורים עברו חיטוי באמצעות טבילה ב-70% אתנול, לאחר מכן השריה למשך שמונה דקות ב-1.25% סודיום היפוכלוריד, ולבסוף שלוש שטיפות, עשר דקות כל אחת, במים מעוקרים.



איור 5: השפעת טיפול ב GA₃ של צמחי אם על יעילות הטרנספורמציה. צמחי האם רוססו פעם אחת עם 1mM GA₃, 10 או 20 יום לפני קצירת הייחורים. צמחי הביקורת טופלו עם מים. יעילות הטרנספורמציה מוצגת כאחוז האקספלנטים המבטא GUS מסך כל האקספלנטים שעברו אילוח.

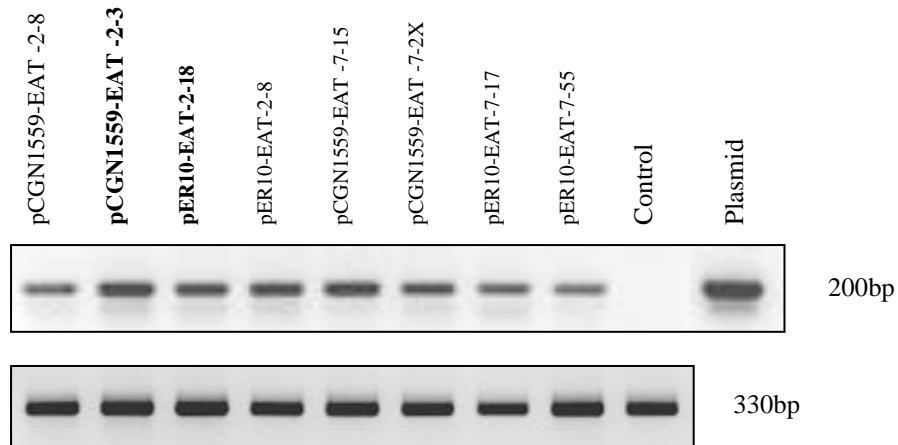
2.2 התמרה ורגנרציה של גיפסנית טרנסגנית

האקספלנטים שהוכנו מהייחורים עברו אילוח עם תמיסה המכילה את החיידק מגזע AGLO שהכיל את הפלסמיד לביטוי רציף של miR172 (pCGN1559-EAT) או את הפלסמיד לביטוי מושרה (pER10-EAT). כל הנצרונים שניתן היה להבחין בהם הוסרו ממקטע הגבעול לפני האילוח עם החיידק. לאחר 5 ימים של קו-אינקובציה נחתכו מקטעים באורך של 3 מ"מ והועברו למצע רגנרציה וסלקציה ראשונית על גבי קנמיצין. לאחר 10 ימים האקספלנטים נוקו מנצרונים, נחצו לשני חצאים, והועברו למצע טרי. לאחר כשבועיים נוספים, מקבצים של נצרונים אדוונטיביים רגנרטיביים נחתכו מהאקספלנט הראשוני. עלים מכל הנצרונים של כל מקבץ עצמאי נחתכו והונחו על מצע רגנרציה וסלקציה שנייה על גבי קנמיצין. התהליך כולל שני שלבים של סלקציה על מנת להגביר את תדירות ההתמרה. לאחר 10-12 יום, נצרונים אדוונטיביים חדשים התפתחו משטח פני העלה. נצרונים אלו הועברו למצע המאפשר התארכות ולאחר מכן למצע השרשה בצנצנות זכוכית. לאחר כ-35 יום נוקו שורשי הצמחונים משאריות של אגר והם הועברו למיכלים עם אדמה. לאחר שבוע ב fogger הועברו הצמחים לחממה שם המשיכו להתפתח באופן נורמלי.

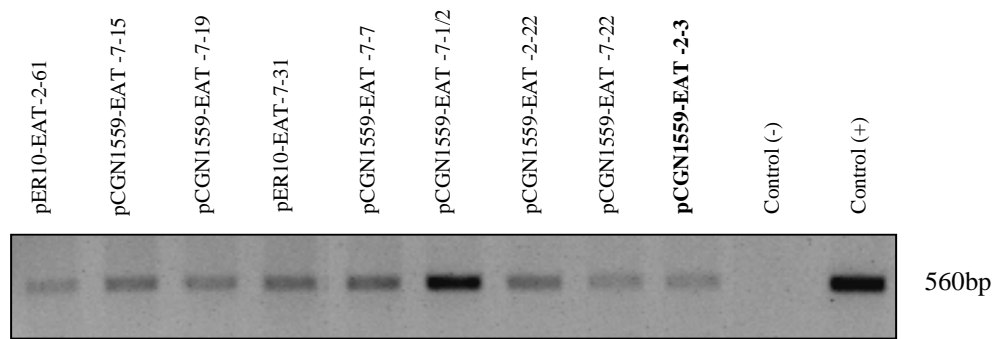
2.3 אנליזת דנ"א גנומי לצמחי הגיפסנית הטרנסגנים

על מנת לאשר כי בידנו גפסנית טרנסגנית בוצעו אנליזות PCR לזיהוי הטרנסגן וגן העמידות *nptII* לקווי גיפסנית שונים שנוצרו מהתמרת ייחורים באמצעות אגרובקטריום שהכיל את pCGN1559-EAT או את pER10-EAT. הפקת הדנ"א הגנומי מעלים של צמחי גיפסנית חשודים כטרנספורמנטים שגדלו בחממה לצורך PCR נעשתה כפי שתואר ע"י Tzfira et al. (1997) (Tzfira et al., 1997). הפריימרים ששימשו לניסויי ה PCR היו 5'- ACTCGATCTCTTGTGCGTGCCTG-3' ו- 5'-GCCGTCGATTGTTGATGCAGCAT-3' עבור *miR172*, 5'-GATGATGC-3' ו- 5'-GATGATGC-3' ו- 5'-GTTTGTGCTGGG עבור *nptII*, 5'-AGGAAGCGGTCAGCCATT-3' ו- 5'-GAA-3' TCCGGTGCCCTGAAT עבור *actin* כגן ביקורת ליעילופ PCR על

הדנ"א הגנומי. אנליזת ה PCR נעשתה למספר קווי גיפסנית אשר הותמרו עם *miR172* תחת שני הפרוטוקולים. בקווים המוצגים באיור התקבלו תוצרים בגודל המצופה, הן באנליזת ה PCR לגן *miR172* והן באנליזה לגן *nptII*. ניתן לראות שתוצרים אלו לא התקבלו בדוגמאות הביקורת (איורים 6 ו-7).



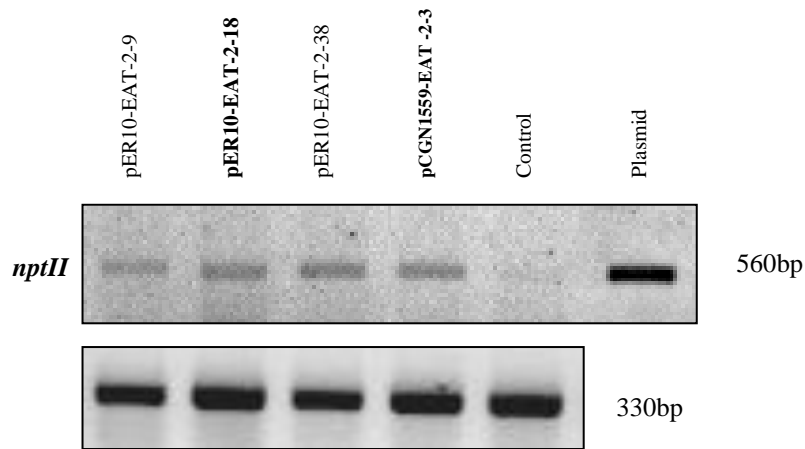
איור 6: אנליזת PCR עבור *miR172* ו-actin (פנל תחתון) של קווי גיפסנית העמידים לקנמיצין, של קו טרנסגני לגן אחר (Control) וכביקורת לקחנו את pCGN1559-EAT (Plasmid). הקיום המודגשים היו חיוביים ביותר מאנליזה אחת.



איור 7: אנליזת PCR עבור *nptII* של קווי גיפסנית העמידים לקנמיצין, של קו טרנסגני לגן אחר כביקורת חיובית (Control+) וכביקורת שלילית (Control-) שימש צמח שלא עבר התמרה. הקיום המודגשים היו חיוביים ביותר מאנליזה אחת.

2.4 אנליזת רנ"א לצמחי הגיפסנית הטרנסגנים

בנוסף לאנליזה של הדנ"א הגנומי רצינו לבחון האם הגן לעמידות *nptII* מתבטא ברנ"א. רנ"א הופק מעלים של צמחי גיפסנית שגדלו בחממה לצורך RT-PCR כפי שתואר ע"י (Guterman et al., 2006) (Guterman et al., 2006). יצירת cDNA נעשתה על ידי שימוש בפריימר oligo(dT)15 ובאנזים M-MLV reverse transcriptase. הפריימרים ששימשו לניסויי ה- RT-PCR היו 5'-TCCGGT GCCCTGAATGAA-3' ו- 5'-AGGAAGCGGTCAGCCCATT-3' עבור *nptII*. בכל ארבעת הקווים שנבדקו התקבל מקטע בגודל המצופה אשר לא מופיע בדוגמת הביקורת (איור 7). הקווים הטרנסגנים ריבוי והעברה לחממה לשם אנליזת עיתוי פריחה.

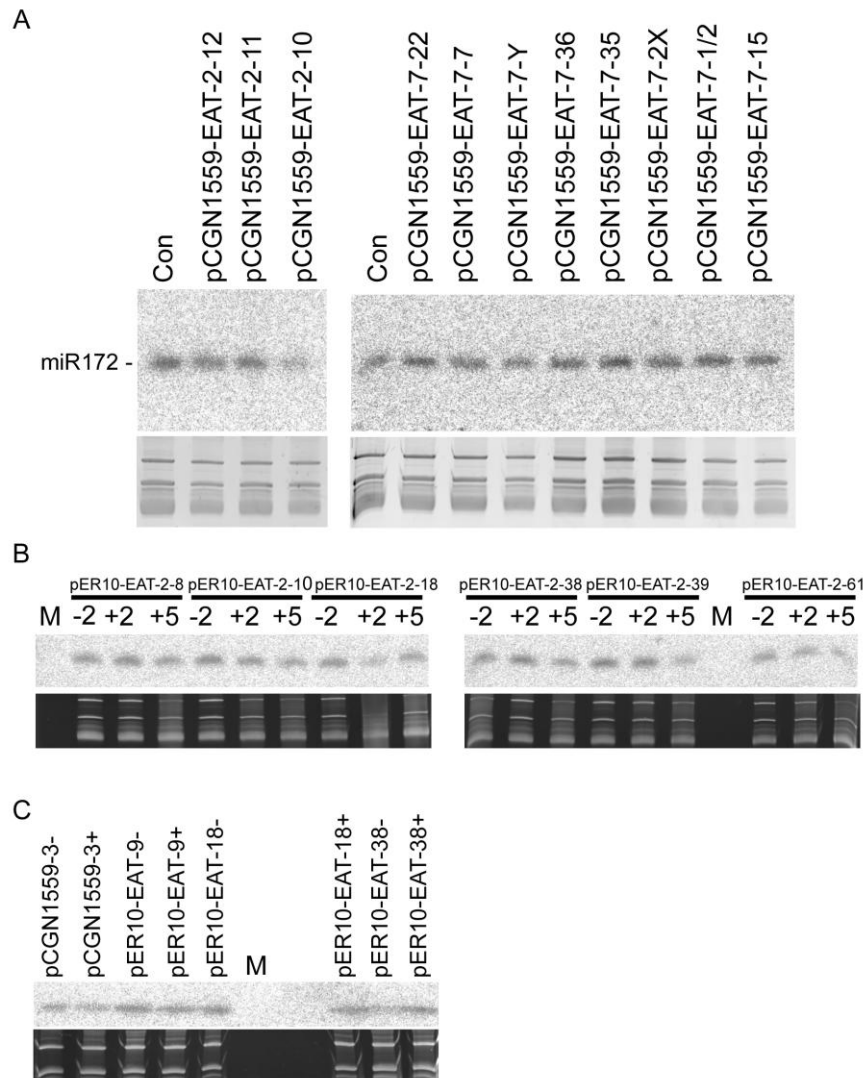


איור 8: אנליזת RT-PCR עבור *nptII* ו-*actin* (פנל תחתון) של קווי גיפסנית העמידים לקנמיצין, של קו שלא עבר התמרה (Control). הפלסמיד pCGN1559-EAT שימש כסמן לגודל התוצר המצופה. הקיום המודגשים היו חיוביים ביותר מאנליזה אחת.

3.0 איפיון זמן פריחה בצמחי הגיפסנית המותמרים.

3.1 אנליזת ביטוי miR172 בקווים המותמרים השונים

לאחר שוידאנו שבידנו צמחי גיפסנית טרנסגנים נגשנו לבחון האם הקווים המותמרים השונים אכן מבטאים את miR172 באופן רציף או מושרה ברמה הגבוהה מרמת זן הבר הלא מותמר. על מנת לבחון את רמתו של miR172 בקווים הטרנסגנים שהותמרו עם pCGN1559-EAT מוצו כל מספר שבועות רנ"א קטנים מקודקודי הצמיחה של שלושה צמחי גיפסנית מכל קו ורמתו היחסית של miR172 בכל דוגמת רנ"א יחסית לזן הבר ניקבעה בעזרת אנליזת northern של כמויות זהות של רנ"א תוך שימוש בגלאי מסומן רדיואקטיבי שהינו בעל רצף משלים ל- miR172 מארבידופסיס. אנליזה דומה נעשתה גם לקווים שהותמרו עם pER-10-EAT. מכיוון שקווים אלו אמורים לבטא את miR172 רק לאחר אינדוקציה עם β -estradiol, נלקח החומר הצמחי לאנליזה כ- 2 או 5 ימים לאחר ריסוס או הגמעה בריכוז של $100 \mu\text{M}$ β -estradiol. האנליזה שבוצעה מוכיחה שלמרות שהקווים שנבדקו הכילו את הטרנסגן לא התקבל בקווי pCGN1559-EAT לביטוי רציף שנבדקו כל ביטוי יתר של miR172 או שביטוי היתר שהתקבל קטן מכדי לזהותו בשיטה זו (איור 9A). בקווים המבטאים את miR172 לאחר אינדוקציה נראה שהקו pER-10-2-38 מראה אינדוקציה קלה גם לאחר ריסוס העלים (איור 9B) והגמעה ב- β -estradiol (איור 9C). בקווים האחרים האינדוקציה לא היתה משמעותית.



איור 9. אנליזת ביטוי של miR172 בקווי גיפסנית טרנסגנים לעומת גיפסנית מזן הבר (con). רנ"א כללי (10 μ g), הופק מ-3 קודקודי צמיחה לכל קו והופרד בג'ל דנטורטיבי, הועבר לממברנה ועבר היברידיזציה עם גלאי רדיואקטיבי בעל רצף משלים ל-miR172 מארבידופסיס. כבקורת לכמות רנ"א בכל מסלול שימשו tRNA ו-5s-rRNA כפי שניראו לאחר צביעה באסידיום ברומיד (EtBr). קווי גיפסנית טרנסגנים לביטוי רציף. (B) קוי גיפסנית טרנסגנים לביטוי מושרה. האינדוקציה בוצעה על ידי חשיפה של שלושה צמחים מכל קו למשך (+) או ל- DMSO (-) כביקורת שלילית על ידי ריסוס העלווה. ודוגמאות הרנ"א נלקחו כ- יומיים או חמישה ימים לאחר האינדוקציה. (C) כמו ב-B רק שהחשיפה למשך נעשתה על ידי הגמעה למשך 48 שעות ודוגמאות הרנ"א נלקחו מיד לאחר מכן. הקו לבטוי רציף pCGN1559-3 שימש כבקורת שלילית. (M) סמן גודל 21 נוקליאוטידים.

3.2 אנליזת עיתוי פריחה לקווי הגיפסנית הטרנסגנים:

למרות שרמת הביטוי של miR172 בקווי הטרנסגנים השונים לא היתה גבוהה מזן הבר בוצעה אנליזת עיתוי פריחה לקוים השונים על מנת לבחון את תגובתם. הצמחים טרנסגניים נשתלו בתאריך 16 ליוני 2008 בדליים של 10 ליטר עם מצע גידול. הצמחים לא נקטמו כדי ללמוד על אופי הצמיחה. הצמחים הושקו ודושנו כמקובל בשטחים מסחריים. 2 צמחים מכל זן טרנסגני נשתלו בדלי סה"כ כ-10 צמחים לזן. בניסוי זה נבחנה התגובה הפיזיולוגית של הצמחים הטרנסגניים לפריחה ולכן בדקנו רק את מועד הפריחה לעומת קווי האב ששימשו לטרנספורמציה. בסה"כ לא התקבלה הקדמת פריחה באף קו לעומת קווי הביקורת (תוצאות אינן מובאות).

המטרה ארוכת הטווח שלנו הינה לשלוט בזמן פריחה של גידולי נוי נבחרים. miR172 התגלה באחרונה כבקר פריחה מולקולרי בצמח יום ארוך ארבידופסיס (Aukerman and Sakai, 2003). מטרת המחקר הנוכחי הינה לבחון האם ביטוי יתר של miR172 בפרח הקטיפי גיפסנית, שהינו צמח יום ארוך, משרה פריחה. זאת על מנת ולנסות לקצר את זמן הפריחה בחורף ובכך לחסוך עלויות הארה יקרות.

במחקר הנוכחי הצלחנו להראות ש-miR172 שמור גם בגיפסנית ומתבטא בקודקוד הצמיחה לאורך כל התפתחות הצמח עד לפריחה גם בתנאי יום ארוך וגם בתנאי יום קצר. האם קיים מתאם בין רמות miR172 לבין פריחה בגיפסנית? מהתוצאות שבידנו קשה להגיד בוודאות. כאשר בודקים את רמות miR172 בקודקוד הצמיחה לא נמצא מתאם חזק, אם כי בזן white fire נראה ש-miR172 מצטבר יותר בתנאי יום ארוך המעודדים פריחה לעומת יום קצר וככל שמתקרבים למועד הפריחה ממצא המזכיר את התוצאות שנראו בארבידופסיס (Aukerman and Sakai, 2003). יש לציין שבארבידופסיס נלקח לאנליזה הצמח השלם ולא רק קודקוד הצמיחה. אנו בחנו את קודקוד הצמיחה בגלל גודלו של צמח הגיפסנית, ייתכן והיינו צריכים לבחון את הצטברות miR172 בצמח השלם לאורך התפתחותו על מנת להוכיח טוב יותר את הקשר בין miR172 לפריחה בגיפסנית.

בשלב השני של המחקר הינדסנו בהצלחה קונסטרקט המבטא את miR172 באופן רציף ומושרה והוכחנו את יעילותו בצמחים. הצלחה זו איפשרה לנו לגשת לטרנספורמציה של גיפסנית על מנת לענות על השאלה המרכזית של המחקר: האם ביטוי יתר של miR172 יגרום להקדמת פריחה? טרנספורמציה לגיפסנית הינו תהליך ארוך מורכב שרק מעט מעבדות בעולם עוסקות בו. אף על פי כן, האנליזות שבוצעו מוכיחות כי בידנו מספר צמחים טרנסגנים לביטוי רציף (pCGN1559-EAT) ומספר קווים לביטוי מושרה (pER10-EAT).

בשלב השלישי של המחקר בחנו האם הקווים הטרנסגנים שבידנו אכן מבטאים את miR172 בעודף או לאחר אינדוקציה. לאכזבתנו הרבה מתברר שלא הצלחנו לייצר קו טרנסגני המסוגל לבטא כמות משמעותית של miR172 מעל זו של זן הבר וזאת גם לאחר אינדוקציה. ניתן לעלות מספר השערות לגבי הסיבות לכך. (1) בכל אוכלוסיה טרנסגנית קיימים קווים המבטאים את הטרנסגן ברמות שונות מרמה נמוכה או כלל לא (מושתקים) ועד לרמה גבוהה. ייתכן שבגלל שטרנספורמציה של גיפסנית הינה מורכבת לא היו בידנו מספיק קווים על מנת שנוכל לברור את המבטאים חזק. ייתכן גם שעצם ביטוי miR172 באופן רציף הינו בעייתי לתהליך הטרנספורמציה והפעיל סלקציה שלילית לביטוי בטרנסגנים. כמובן שסלקציה זו אינה רלוונטית לביטוי בקווים המושרים. (2) ייתכן והפרקורסור שבו השתמשנו (אקסון 2 של EAT) מארבידופסיס אינו עובר עיבוד יעיל בגיפסנית וזאת למרות שבבנטאמינה העיבוד תקין. (3) ייתכן וההשרייה על ידי β -estradiol אינה יעילה בגיפסנית ולכן לא חשפנו את פוטנציאל הביטוי האמיתי של קווי pER10-EAT. לצערנו לא הייתה בידנו ביקורת חיובית ליעילות הריסוס או ההגמעה.

לסיכום, הצלחנו להשיג את שתי המטרות הראשונות של המחקר אך לא את המטרה הכוללת שהיא זיהוי קו טרנסגני המקדים את פריחתו ללא תלות באורך היום.

1. **Aukerman, M.J. and Sakai, H.** (2003) Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell*, **15**, 2730-2741.
2. **Bartel, B. and Bartel, D.P.** (2003) MicroRNAs: At the Root of Plant Development? *Plant Physiology*, **132**, 709-717.
3. **Bartel, D.P.** (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116**, 281-297.
4. **Chen, X.** (2004) A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science*, **303**, 2022-2025.
5. **Chuck, G., Meeley, R., Irish, E., Sakai, H. and Hake, S.** (2007) The maize tasselseed4 microRNA controls sex determination and meristem cell fate by targeting Tasselseed6/indeterminate spikelet1. *Nature genetics*, **39**, 1517-1521.
6. **Dugas, D.V. and Bartel, B** (2004) .MicroRNA regulation of gene expression in plants. *Curr Opin Plant Biol*, **7**, 512-520.
7. **Guterman, I., Masci, T., Chen, X., Negre, F., Pichersky, E., Dudareva, N., Weiss, D. and Vainstein, A.** (2006) Generation of phenylpropanoid pathway-derived volatiles in transgenic plants: rose alcohol acetyltransferase produces phenylethyl acetate and benzyl acetate in petunia flowers. *Plant molecular biology*, **60**, 555-563.
8. **Jung, J.H., Seo, Y.H., Seo, P.J., Reyes, J.L., Yun, J., Chua, N.H. and Park, C.M.** (2007) The GIGANTEA-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of CONSTANS in Arabidopsis. *The Plant cell*, **19**, 2736-2748.
9. **Lauter, N., Kampani, A., Carlson, S., Goebel, M. and Moose, S.P.** (2005) microRNA172 down-regulates glossy15 to promote vegetative phase change in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 9412-9417.
10. **Mlotshwa, S., Yang, Z., Kim, Y. and Chen, X.** (2006) Floral patterning defects induced by Arabidopsis APETALA2 and microRNA 172 expression in Nicotiana benthamiana. *Plant molecular biology*, **61**, 781-793.
11. **Salter, M.G., Paine, J.A., Riddell, K.V., Jepson, I., Greenland, a.J., Caddick, M.X. and Tomsett, A.B.** (1998) Characterisation of the ethanol-inducible alc gene expression system for transgenic plants. *The Plant Journal*, **16**, 127-132.
12. **Shillo, R. and Halevy, A.H.** (1982) Interaction of photoperiod and temperature in flowering control of *Gypsophila paniculata* L. *Scientia. Hortic.*, **15**, 187-196.
13. **Shillo, R.** (1985) *Gypsophila paniculata*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc.
14. **Shlomo, E., Shillo, R. and Halevy, A.H.** (1985) Gibberellin substitution for the high night
15. temperatures required for long-day promotion of flowering in *Gypsophila paniculata* L. *Scientia Horticulturae*, **26**, 69-76.
16. **Tzfira, T., Jensen, C.S., Wangxia, W., Zuker, A., Altman, A. and Vainstein, A.** (1997) Transgenic Populus: a step-by-step protocol for its Agrobacterium-mediated transformation. *Plant Molecular Biology Reporter*, **15**, 219-235.

17. **Zuker, M.** (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3406-3415.
18. **Zuo, J., Niu, Q.W. and Chua, N.H.** (2000) Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J*, **24**, 265-273.
19. שלמה, א. (1984) בקרת פריחה בגיבפסנית מכבדית, רחובות: הפקולטה לחקלאות של האוניברסיטה העיברית בירושלים. מוסמך.
20. שחורי, ד. (1996) איקלום פרחי קטיף חדשים. דפי מידע, 4, 57 and שלמה, א., כהן, ב.

סיכום עם שאלות מנחות

נא לענות על כל השאלות, בקצרה ולעניין, ב 3 עד 4 שורות מכסימום 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 לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
1) ללמוד את הקשר בין מירנ"א-172 לפריחה בגיפסנית. 2) להנדס צמחי גיפסנית כך שיוכלו לבטא את מירנ"א-172 באופן רציף ואו בתגובה למשרן חיצוני. 3) לברור ולאפיין צמחי גיפסנית מהונדסים בהם מוקדמת הפריחה כתוצאה מביטוי מושרה או רציף של מירנ"א-172.
עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.
מצאנו ש-miR172 שמור במספר זני גיפסנית מסחריים ואיפיינו את דגם הביטוי שלו בקודקוד לאורך הצימוח מיחור ועד פריחה. כמו כן הינדסנו בהצלחה קונסטרוקטים המבטאים את miR172 באופן רציף ומושרה והוכחנו את פעילותם בצמחים. החדרנו את הקונסטרוקטים הנ"ל לגיפסנית ואיפיינו מספר קוים טרנסגנים לביטוי רציף ומושרה של miR172. אנליזה של רמת ביטוי miR172 מציעה שלמרות שהקוים טרנסגנים, אף אחד מהקוים אינו מבטא את miR172 בצורה גבוהה משמעותית יותר מזן הביקורת. בהתאמה איפיון מועד הפריחה בקוים השונים לעומת קוי הביקורת לא זיהה קו טרנסגני המקדים את הפריחה.
המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח. miR712 הינו miRNA האחראי על המעבר מהשלב הווגטיבי לפרודוקטיבי קרי פריחה בצמחים שונים. miRNA זה שמור בגיפסנית ומתבטא לאורך כל התפתחותה בקודקוד הצמיחה. ביטוי miR172 בגיפסנית טרנסגנית על ידי שימוש בפרוקסור מארבידופסיס לא הצליח לגרום להצטברות ה-miRNA ולהקדמת פריחה. השגנו את שתי המטרות הראשונות אך המטרה השלישית לא הושגה.
הבעיות שנתרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתרה לביצוע תוכנית המחקר. הבעיה העיקרית הינה יעילות הטרנספורמציה בגיפסנית שלא מאפשרת קבלת מספיק קוים על מנת לברור מתוכם את הקוים הטרנסגנים הרצויים.
האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - יש לפרט : פרסומים – כמקובל בביבליוגרפיה, פטנטים - יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך.
עדיין לא הוחל בהפצת הידע הפרסומים בהכנה
פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)
← ללא הגבלה
←
←
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן* - לא -