

דו"ח מסכם לתוכנית מחקר מספר 256-0776-10

מחקר השוואתי של ענפים בוגרים ויווילים באקליפטוס ללימוד פרמטרים מולקולאריים ותאיים העומדים
בבסיס הקשיים בהשרשת ייחורים

Comparative study of juvenile and mature Eucalyptus branches to reveal cellular and
molecular differences underlying difficulties in rooting.

מוגשת לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות
ע"י

עינת שדות, צמחי נוי, מנהל המחקר

מוחמד אבו-עביד, צמחי נוי, מנהל המחקר

סימה קגן, צמחי נוי, מנהל המחקר

Einat Sadot, Ornamental Horticulture, Bet-Dagan POBox 6 50250 vhesadot@agri.gov.il

Mohamad Abu-Abied, Ornamental Horticulture, Bet-Dagan POBox 6 50250

abuabied@agri.gov.il

Sima Kagan, Ornamental Horticulture, Bet-Dagan POBox 6 50250 simak@agri.gov.il

July 2011

תמוז תשע"א

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: כך/לא מחק את המיותר

חתימת החוקר

רשימת פרסומים: בהכנה

תקציר

1. הצגת הבעיה: אובדן כשר השתרשות בצמחים מעוצים בוגרים מהווה מכשול כלכלי משמעותי בייצור חומר ריבוי של קלונים ומיכלואים מצטיינים. התופעה קיימת בעצי יער, עצי ושיחי נוי לגינון וענפי קישוט וכנות של עצי פרי. לפיכך, נדרשת עבודת מחקר למציאת פתרונות למגבלה זו. הבנה של הבסיס התאי והמולקולרי של הבעיה היא שלב חשוב בדרך לפתרון **2. מטרות המחקר:** מטרות המחקר היו כיול תנאי ריבוי, הצערה והשרשה בתרבית רקמה של איקליפטוס ברכיפלה שהוא שיח נוי וביסוס מערכת מודל ללימוד המנגנון המולקולרי שמגביל השרשה בייחורים בוגרים באיקליפטוס גרנדיס. איקליפטוס גרנדיס נבחר כצמח מודל מכיוון שזהו המין הראשון של איקליפטוס שהגנום שלו רוצף **3. שיטות העבודה:** על מנת לרבות איקליפטוס בתרבית נקטנו בשיטה של הצערה באמצעות טיפולים הורמונליים. כדי להקים מערכת ללימוד הבסיס המולקולרי לאובדן כשר השרשה תוכננו שבבי דנ"א באמצעותם הושוו דגמי הביטוי של גנים בייחורים בוגרים וצעירים מאיקליפטוס גרנדיס **4. תוצאות עיקריות:** מבין שלבי הריבוי בתרבית של איקליפטוס ברכיפלה שכוללים א. התעוררות ניצנים צדדים, ב. ריבויים, ג. התארכות וד. השתרשותם הגענו לשלב ד. בשלב זה הוחלט שלא להמשיך בתהליך הריבוי מפאת שינויים בענף הפרחים. מניתוח התוצאות של שבבי הדנ"א עלו מספר גנים שהתבטאו יותר בייחורים הבוגרים או הצעירים. אישור לתוצאות נעשה באמצעות real time PCR והמחקר נמשך כדי לאפיין את חשיבותו של מסלול הסינטזה של ניטריק אוקסיד. נמצא שהאנזים ניטרט רודקטאז המשתתף בייצור ניטריק אוקסיד מתבטא פי 2.5 יותר בייחורים צעירים. בהתאם נמצא שבעקבות חיתוך ייחורים נוצר יותר ניטריק אוקסיד בייחורים צעירים מאשר בייחורים בוגרים. כמו כן חומר תורם ניטריק אוקסיד עודד השתרשות בייחורים צעירים ובוגרים. הגן לניטראט רדוקטאז בודד מאיקליפטוס גרנדיס ונמצא פעיל מבחינת ייצור ניטריק אוקסיד בצמחי ארבידופסיס טרנסגנים. הצמחים הטרנסגנים מראים עיכוב משמעותי בהתפתחות **5. מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות:** ניתן לבדוק חומרים תורמי ניטריק אוקסיד לייעול השתרשות ייחורים של מיני איקליפטוס

מבוא

זני איקליפטוס הולכים ותופסים מקום חשוב ומרכזי בעולם כגידול למטרות שונות החל מיערות, יערות משקיים שנועדו לתעשיית העץ, הפקת דלק צמחי, ועד לענפי קישוט ירוקים שנכללים בסל המוצרים הנמכרים בבורסה לפרחים. העדר יכולת ההשרשה של ייחורים מעצים בוגרים ממינים אלה מהווה צוואר בקבוק במסלול התפתחות הענף החקלאי משום שאין יכולת לברור קוים מצטיינים ולרבות אותם וגטיבית במסות גדולות. בזני איקליפטוס קיימת קורלציה בין המעבר מהשלב היונילי לבוגר, ולאובדן כשר השרשה. מסתמן אפילו שיש זנים בהם אובדן כשר ההשרשה אף מקדים את השתנות צורת העלה ונשמר אם בכלל, רק בענפים היוצאים סמוך מאד לפני הקרקע (כדי סנטימטרים ספורים) או רק בנבטים צעירים מאד בני חודשיים-שלושה. אובדן היכולת ליצור שורשים אדוונטיבים הוא אחד מהתופעות הדרמטיות שקורות במעבר מהשלב היונילי לשלב הבוגר בעצי יער, עצי פרי ושיחי נוי מעוצים רבים. אי יכולת השרשה היא מכשול רציני לריבוי וגטיבי (קלונלי) של פנוטיפים מצטיינים.

מסיבה זו אי יצירת שורשים אדוונטיבים היא התופעה הנחקרת ביותר בהקשר של המעבר מהשלב היוונילי לבוגר בעצי מחט, אלונים איקליפטוסים ועוד (1-4). על פי הספרות (4), יצירת שורשים אדוונטיבים מתבצעת בארבעה שלבים: 1. שלב של דה-דיפרנציאציה 2. שלב של אינדוקציה של חלוקות תאים 3. היווצרות פרימורדיה של שורש ו-4. הצצה של השרש. בכל אחד מן השלבים הללו לאוקסין תפקיד חשוב ואכן ידוע שטיפולים שונים באוקסין מעודדים השרשה בייחורים. יחד עם זאת במקרים מסוימים המצב יותר מורכב כאשר מאזן נכון של רמות אוקסין והורמונים נוספים כמו ציטוקינין הכרחיים להתפתחות השרש (5). בנוסף נמצא שאוקסין אינו מהווה את הגורם המגביל במהלך הירידה בכשר ההשרשה המלווה את ההתבגרות: לא נמצאו הבדלים בקליטת אוקסין, במטבוליזם שלו וכן בתנועה ובפיזור שלו בין ייחורים בעלי כשר השרשה וחסרי כשר השרשה בעצי מחט שונים (6) וציטוטים שם

מטרות המחקר היו

1. כיול תנאי ריבוי והשרשה של *Eucalyptus brachyphylla* (איקליפטוס לענפי קישוט) מתרבית רקמה.
2. בדיקת ביטוי דיפרנציאלי של גנים מייחורים בוגרים שאינם משרישים לייחורים צעירים בעלי כשר השתרשות.

פירוט עיקרי הניסויים שבוצעו וכלל התוצאות שהתקבלו במהלך שנות המימון

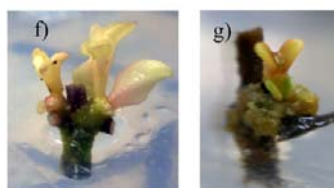
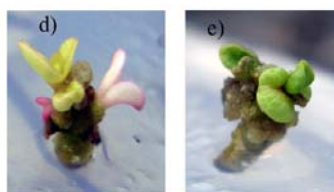
1. **ריבוי בתרבית רקמה של איקליפטוס ברכיפילה.** איקליפטוס ברכיפילה הוא מקבוצת עצי האיקליפטוס בעלי עלים מאפירים. ייחורים מעצים אלו הם קשיי השרשה במיוחד גם בגיל צעיר מאד. לכן ריבוי וגטיביבי של קלונים מצטיינים אפשרי רק בתרבית רקמה.

במהלך העבודה כיילנו תנאים

לריבוי של נצרונים צדדיים של

איקליפטוס ברכיפילה בתרבית

רקמה.



Eucalyptus brachyphylla



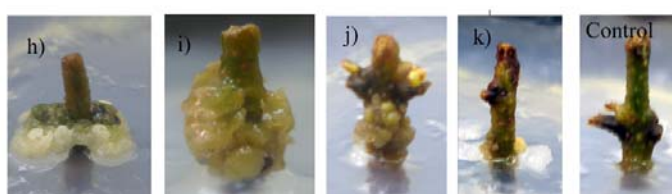
איור 1. התפתחות פקעים צדדיים של איקליפטוס ברכיפילה בתרבית רקמה. a-k. החומר הצמחי טופל בשילובים שונים של הורמונים. נראה שטיפולים a-c נתנו תגובה טובה בעוד שטיפולים h-k גרמו להופעת קאלוס בלבד.

לאחר שלב פריצת הפקעים,

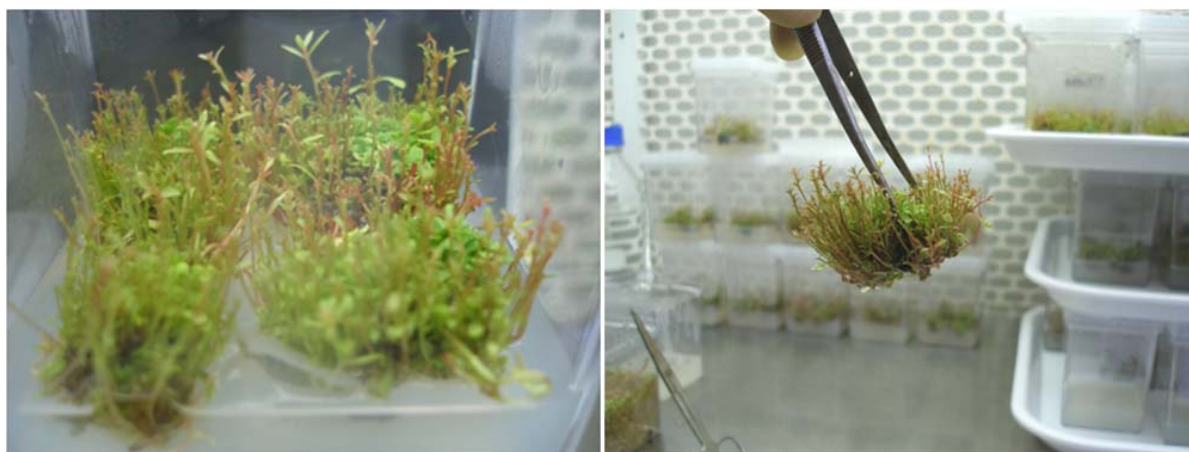
הוכנסו הנצרונים לטיפולי ריבוי.

איור מס' 2 מראה את מקדם

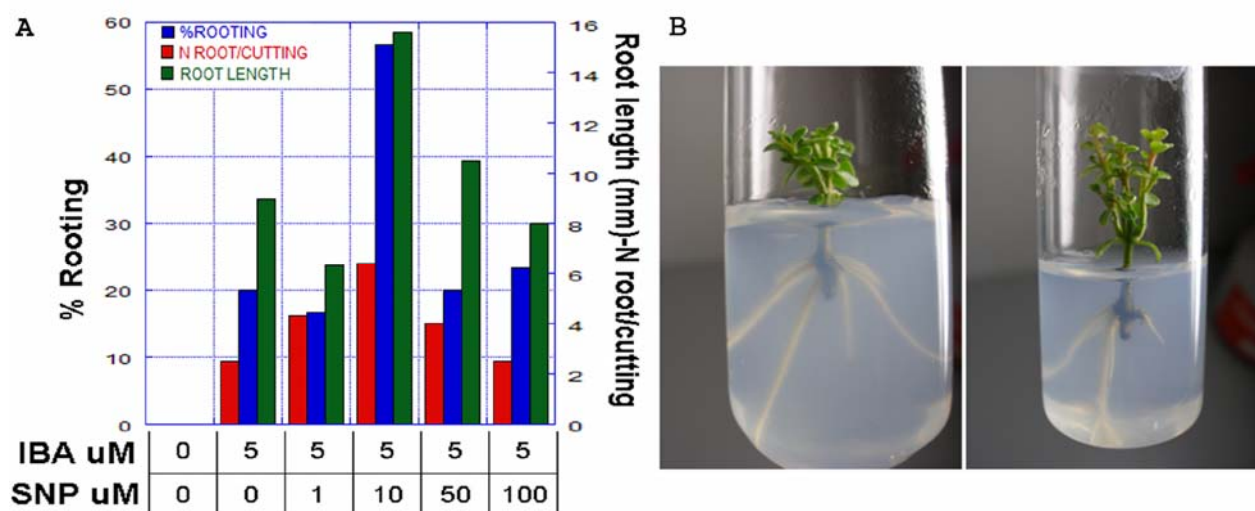
הריבוי הגבוה אליו הצלחנו להגיע.



לאחר הריבוי הוכנסו הנצרונים לתנאי השרשה שכללו ריכוזים שונים של אוקסין בתוספת SNP (sodium nitroprusside) שהוא חומר תורם ניטריק אוקסיד (NO). איור 3 מראה שהשילוב של 5 ח"מ IBA עם 10 ח"מ SNP עודד השתרשות בכמעט 60% מהנצרונים. בהמשך אנו מכיילים שיטה להקשחת הצמחונים המושרשים והוצאתם לשטח.



איור 2. מג'נטות עם מאות נצרונים של איקליפטוס ברכיפילה

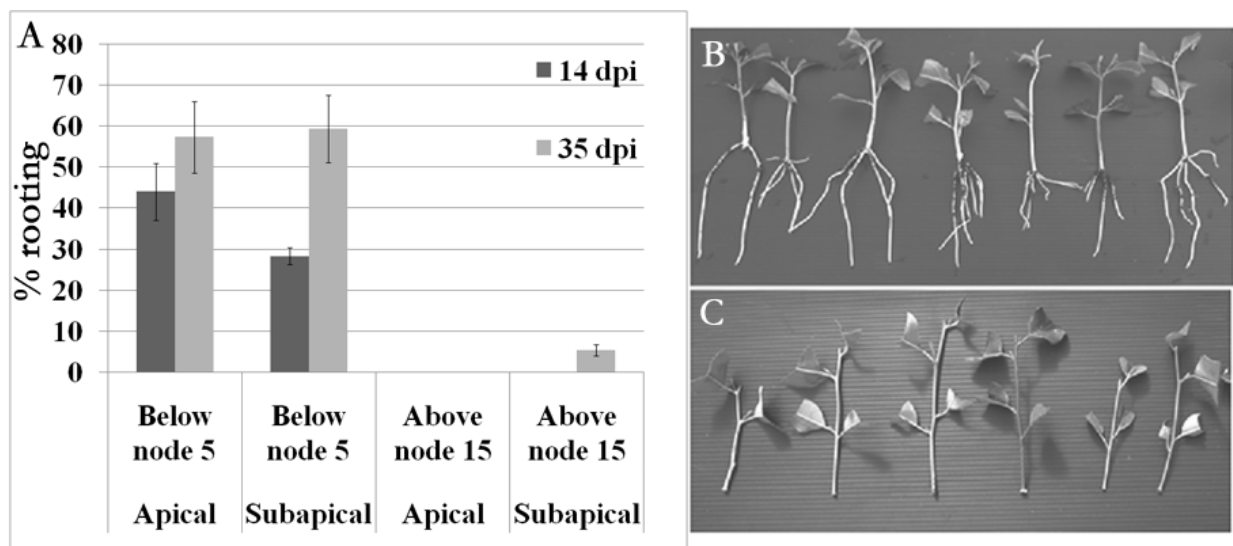


איור 3. כיוול תנאי השרשה לנצרונים של איקליפטוס ברכיפילה בתרבות. A גרף המראה אחוז השתרשות, מספר שורשים לייחור ואורך ממוצע של שורש בתנאי השרשה שונים. B. שתי דוגמאות של נצרונים מושרשים.

בגלל שינויים בענף הפרחים הוחלט לא להמשיך בריבוי של איקליפטוס ברכיפילה בתרבות.

2. לימוד הבסיס המולקולרי של אובדן כושר ההשתרשות בייחורים בוגרים מצמחים מעוצים.

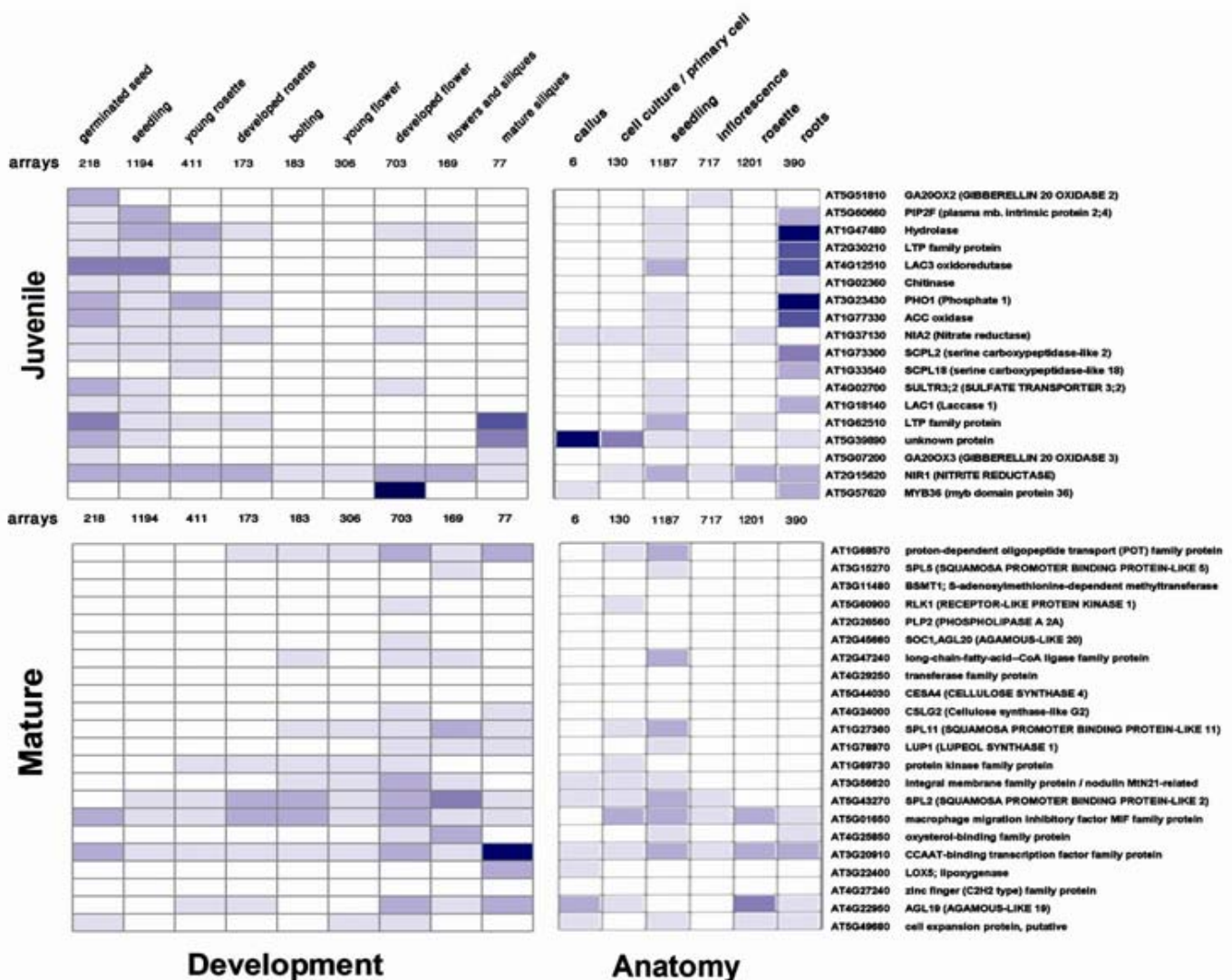
על מנת לכייל מערכת להשוואת ביטוי גנים בייחורים יונילים משרישים ובייחורים בוגרים חסרי כשר השרשה בעלי רקע גנטי זהה, בחרנו לחרוג מהתוכנית המקורית ובמקום לבדוק גנים נבחרים לערוך אנליזה של שבב דנ"א. תחילה היה עלינו לבחור במערכת הצמחית המתאימה. מכיון שמשרד האנרגיה האמריקאי החל לפני כ-3 שנים לרצף את הגנום של איקליפטוס גרנדיס נבחר העץ בתור מודל. בעבר כבר דווח שייחורים הנלקחים מאיקליפטוס גרנדיס מתחת לענף 5 משתרשים ואילו ייחורים הנלקחים מעל לענף 15 אינם משתרשים (7). על מנת לבחון ממצא זה גידלנו עצים לגיל 6 חודשים. חצי מן העצים נגזמו בגובה 15 ס"מ מהקרקע (מתחת ענף 5) והחצי השני של העצים נגזם בגובה מטר וחצי (מעל ענף 15). ענפים שפרצו עקב הגיזום הושרשו. נמצא שייחורים צעירים שנגזמים במרחק של כ-15 ס"מ מהקרקע, משתרשים ביעילות של 60% לאחר 35 ימים בעוד שייחורים בוגרים שנגזמים בגובה של 150 ס"מ מהקרקע משתרשים בשיעור של פחות מ-10% (איור מס 4).



איור 4. השתרשות ייחורים מאיקליפטוס גרנדיס. עצי איקליפטוס גרנדיס בני 6 חודשים נגזמו בגובה 15 ס"מ מהקרקע (מתחת ענף 5) או בגובה מטר וחצי (מעל ענף 15). ענפים שפרצו עקב הגיזום הוטבלו ב 6000 ח"מ של K-IBA למשך 20 שניות. **A.** תוצאות ההשרשה מייחורים אמיריים (apical) ותת אמיריים (subapical). **B.** דוגמאות של הייחורים הצעירים (below node 5). **C.** דוגמאות של הייחורים הבוגרים (above node 15).

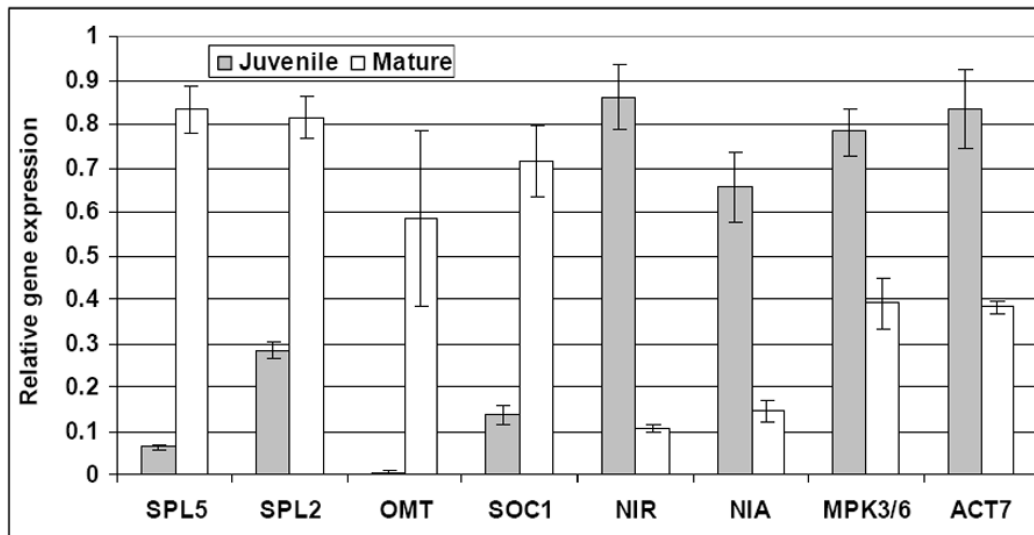
באמצעות רצפים שפורסמו מאיקליפטוס גרנדיס (8) ובעזרתו של רון אופיר מהמחלקה לגנומיקה במכון וולקני תוכנן שבב דנ"א שהודפס ע"י חברת אג'ילנט. רנ"א באיכות מעולה הוכן מחלקם התחתון של ייחורים בוגרים וצעירים של א. גרנדיס ביום החיתוך לפני האינדוקציה להשרשה. סימון הרנ"א וההיברדיזציה לשבב נעשתה במכון ויצמן. ניתוח התוצאות נעשה אף הוא ע"י רון אופיר והגנים

שביטויים נבדל בצורה מובהקת באחד משני סוגי הייחורים נבחנו על פי הספרות על מידת מעורבותם בהתפתחות שורשים אדוונטיבים. אוכלוסיות הגנים שהראו ביטוי נבדל משמעותי מבחינה סטטיסטית נותחו לקביעת העשרה אפשרית של פעילויות שונות בתוכנה gene ontology. נמצא שבייחורים הצעירים עלתה באופן מובהק רמת הביטוי של מספר אנזימים המעורבים בפעילות של חימצון חיזור במסלולים של ליגנין, חומרים ארומטים ופנילפרופנואידים. בייחורים הבוגרים לעומת זאת עלו בצורה מובהקת מספר פקטורי שיעתוק המעורבים בסינטזה של פלבנואידים וטריטרפנואידים. בנוסף, ביטוי גנים מארבידופסס שהם אורטולוגים לאלו שעלו בשלב דנ"א מאיקליפטוס גרנדיס נותחו ע"י תוכנת - genevestigator (9). נמצאה הקבלה בין שני הצמחים בביטוי הנבדל של חלק גדול מהגנים (איור 5). כמו כן נמצא שגנים שביטויים עלה בייחורים הצעירים הצטברו יותר באברי השורש. בין הגנים שעלו בייחורים הבוגרים נמצאים SPL2, SPL5, עליהם דווח לאחרונה כמעורבים במעבר לשלב הבוגר בארבידופסס (10) ובין הגנים שעלו בייחורים היובנילים נמצא ACT7 אקטין 7, עליו דווח שהוא עולה בשלב היובנלי בארבידופסס, ומושרה ע"י אוקסין (11). האשרור לממצאים ממערכות אחרות, מחזק את שאר התוצאות מהשלב. שני גנים ממסלול ההטמעה של חנקן עלו בצורה מובהקת בייחורים הצעירים: nitrite reductase NIR (12) ו-NIA Nitrate reductase (13).



איור 5. ניתוח ביטוי גנים אורטולוגים מארבידופסיס באמצעות תוכנת *genevestigator*. גנים מאיקליפטוס גרנדיס שביטויים בייחורים צעירים היה גבוה יותר נמצאו ברמת ביטוי גבוהה יותר גם בארבידופסיס. בהתאם, כך לגבי גנים שביטויים עלה בייחורים בוגרים של איקליפטוס לעומת גנים המתבטאים בשלבי התפתחות בוגרים של ארבידופסיס. מעניין שחלק מהגנים שהתבטאו יותר בייחורים הצעירים מצטברים בשורש. ככל שהצבע הכחול יותר כזה כך הביטוי יותר גבוה.

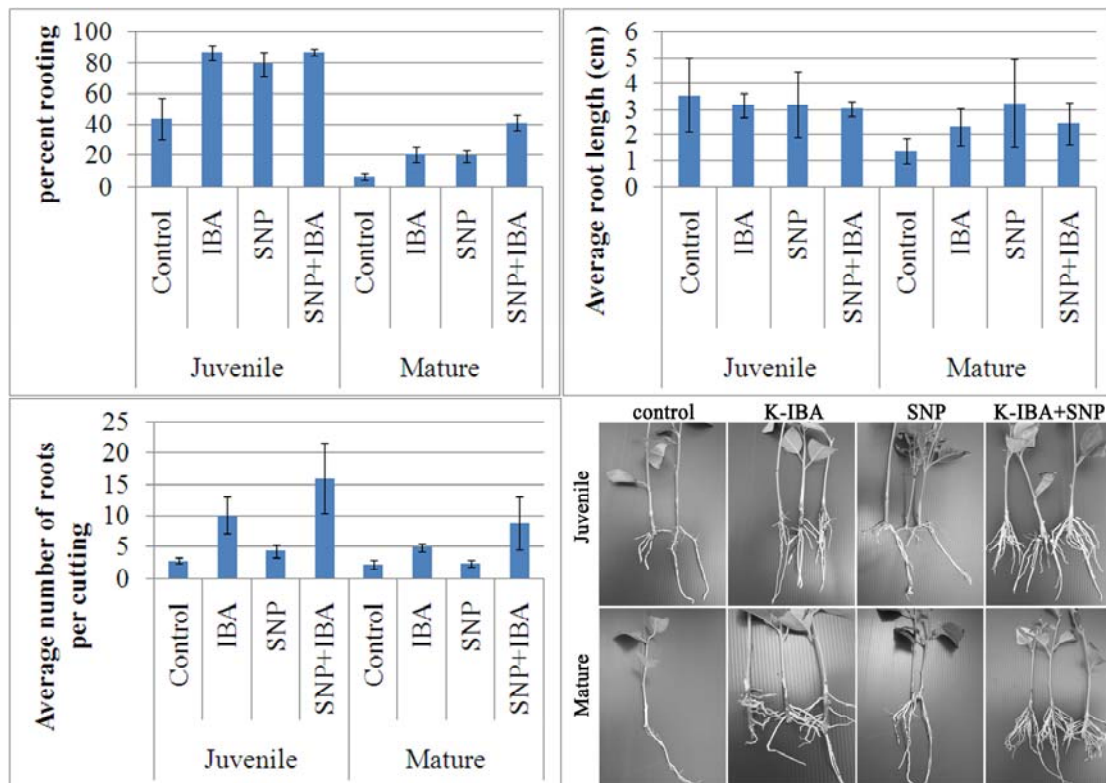
על מנת לאמת את התוצאות משבב הדנ"א נבחרו חלק מהגנים לאנליזת real time PCR. איור 6. מראה שאכן אותם דגמי הביטוי שהתקבלו באנליזת השבב חזרו על עצמם באנליזת ה- real time PCR.



איור 6. אישור תוצאות השבב ע"י ריאקציית PCR כמותי. הגרף מראה את תוצאות בדיקת ביטוי מספר גנים באמצעות real time PCR. (כל תוצרי ההגברה רוצפו כדי לאמת את התוצאות). כל תוצאה היא ממוצע של שלוש חזרות, התוצאות נורמלו לפי רמת הביטוי של גן "תחזוקת בית" (*IDH (isocitrate dehydrogenase)*). אלו הגנים שנבדקו:

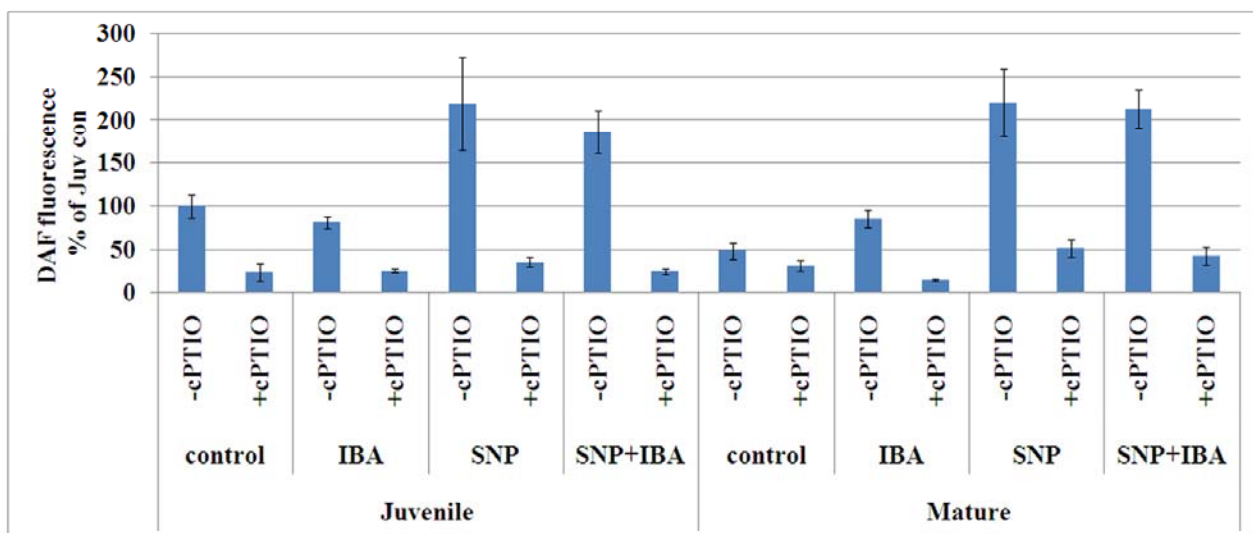
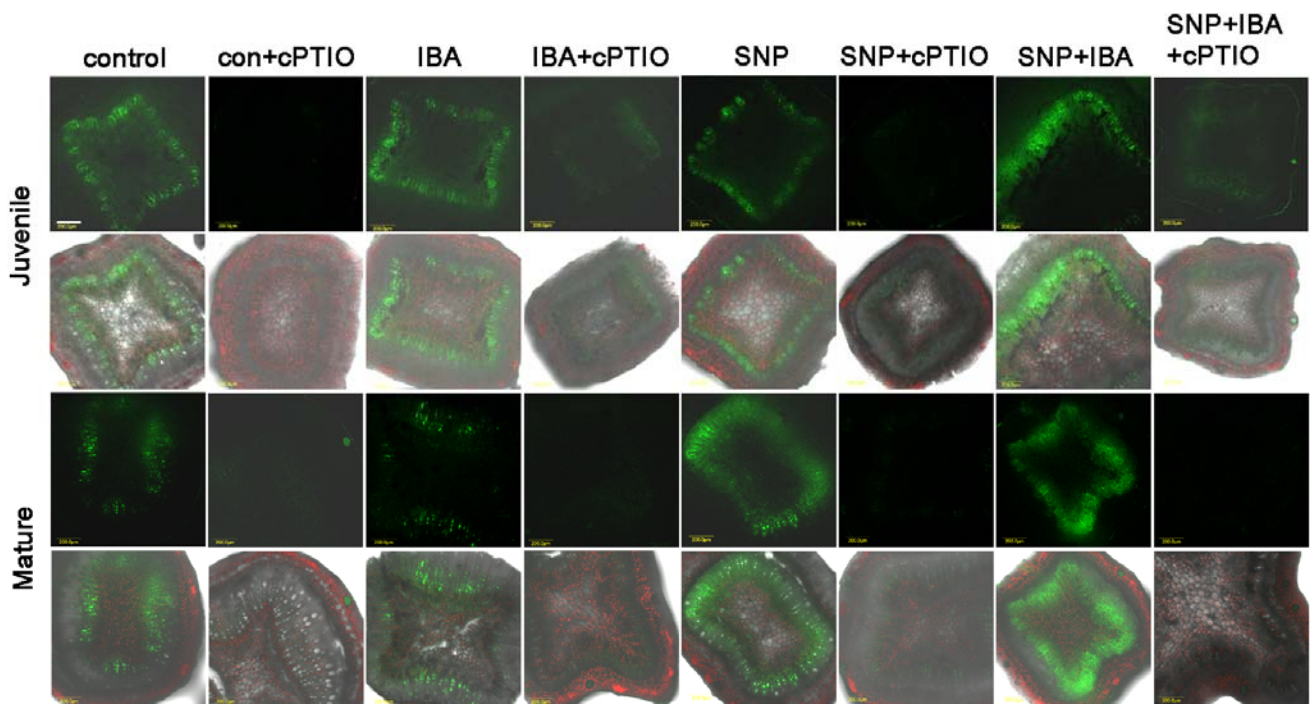
: **SPL5, SPL2**:: *squamosa promoter binding protein-like*; **OMT**: *o-methyltransferase 1*; **SOC1**: *suppressor of overexpression of constans*; **NIR**: *nitrite reductase*; **NIA**: *nitrate reductase*; **MPK3**: *mitogen-activated protein kinase 3*; **ACT7**: *actin7*

הגן שתפש את תשומת ליבנו, ניטרט רדוקטאז, עלה בשתי צורות הניתוח שבוצעו לקבוצות הגנים, (העשרה של פעילות ביולוגית ודגם ביטוי זהה בגנים אורטולוגים מארבידופסיס). ניטראט רדוקטאז מעורב בהטמעה של חנקן. הוא מחזר ניטרט לניטריט בעוד שניטריט רדוקטאז, שביטוי גבוה בייחורים צעירים, מחזר ניטריט לאמוניה (14-16). ידוע שניטרט רדוקטאז בצמחים הופך גם בתנאים מסוימים ניטריט לניטריק אוקסיד (14-16). מאידך, ניטריק אוקסיד ידוע כחלק ממסלול האותות של אוקסין, המשפיע על התמיינות שורשים אדוונטיבים (17-20). תוצאות אלו רמזו שביטוי יותר גבוה של ניטראט רדוקטאז בייחורים צעירים הוביל לרמות ניטריק אוקסיד יותר גבוהות ולכן השפעה יותר יעילה של אוקסין על התמיינות שורשים אדוונטיבים. על מנת לבדוק האם ריכוזים מוגברים של ניטריק אוקסיד משפיעים על השרשה באיקליפטוס גרנדיס טיפלנו בייחורים בחומר SNP שהוא משחרר ניטריק אוקסיד. ייחורים יובנלים ובוגרים הוטבלו ב 500 ח"מ של IBA עם וללא תוספת של 1000 ח"מ של SNP למשך 3 שעות. נמצא ש-SNP עודד השתרשות בייחורים בוגרים (מעל ל- 40% בתוך 20 יום). בנוסף הטיפול העלה את מספר השורשים הממוצע לייחור בייחורים צעירים ובוגרים לכ- 15 עד 10 בהתאמה איור 7.



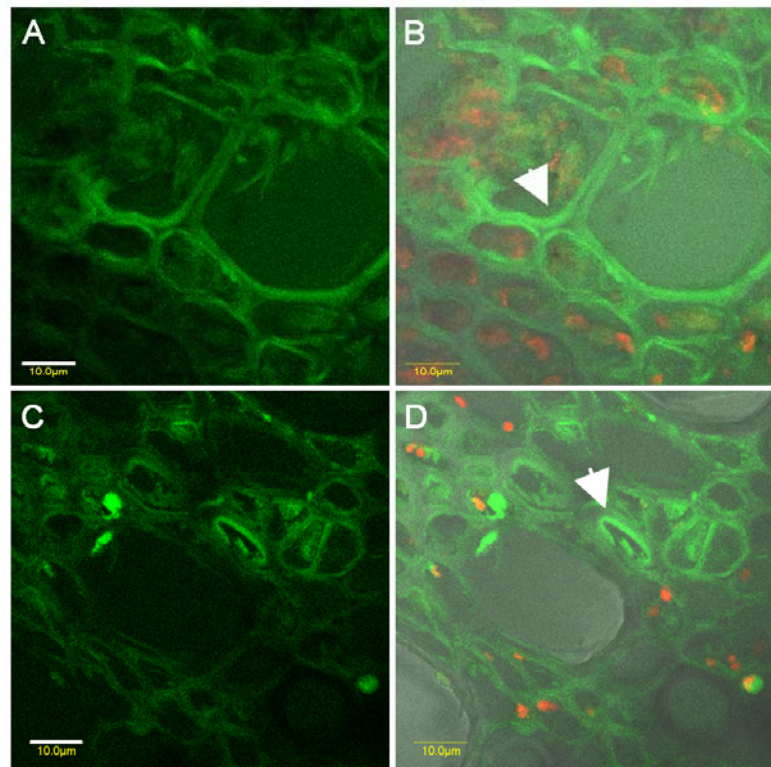
איור 7. השתרשות ייחורים מאיקליפטוס גרנדיס בנוכחות SNP, חומר תורם ניטריק אוקסיד. מוצגים שלושה גרפים: אחוז השתרשות, מספר ממוצע של שורשים לייחור ואורך ממוצע של השורשים. כמו כן דוגמאות של הייחורים לאחר מגוון הטיפולים. הטיפולים כללו K-IBA בריכוז 500 ח"מ ו-SNP בריכוז 1000 ח"מ למשך 3 שעות.

לאחר שהסתבר שניטריק אוקסיד אכן משמעותי לכשר ההשתרשות בדקנו האם באמת קיימים ריכוזי ניטריק אוקסיד גבוהים יותר בייחורים צעירים. על מנת לכמת ריכוזי ניטריק אוקסיד (NO) השתמשנו בצבע הפלואורסנטי, DAF 2A. על פי הספרות זהו צבע שזוהר בירוק בנוכחות ניטריק אוקסיד אך מידת הספציפיות שלו לא מוחלטת (21). לפיכך נהוג להשתמש גם בחומר הקושר ספציפית ניטריק אוקסיד ולא מאפשר לריאקציה הפלואורסנטית להתבצע. החומר נקרא cPTIO וכל פלואורסנציה של DAF 2A שנעלמת בנוכחות cPTIO נחשבת כעדות מהימנה לנוכחות NO. ייחורים צעירים ובוגרים של איקליפטוס הוגמזו בתמיסות המכילות DAF 2A בנוכחות או בהיעדר cPTIO. לאחר כשלושים דקות, נחתכו פרוסות דקיקות מתחתית הייחור באמצעות סכין גילוח והונחו בין זכוכיות של מיקרוסקופ. מידת הפלואורסנציה נבדקה ונמדדה באמצעות המיקרוסקופ הקונפוקלי. איור 8 מראה שאכן רמות הפלואורסנציה של DAF 2A היו באופן הדיר גבוהות פי 2 בייחורים הצעירים לעומת הבוגרים. בנוסף בעוד שטיפול ב- IBA ל 30 דקות לא גרם לעליה ברמת הפלואורסנציה, טיפול ב-SNP הגביר מאד את רמות הפלואורסנציה דבר המוכיח שאכן טיפולי ה-SNP העלו את רמות הניטריק אוקסיד בייחורים. בחינה בהגדלה יותר גדולה במיקרוסקופ אישרה שניטריק אוקסיד מצטברת בציטופלזמה של תאים ברקמת העצה הראשונית והמשנית (איור 9)

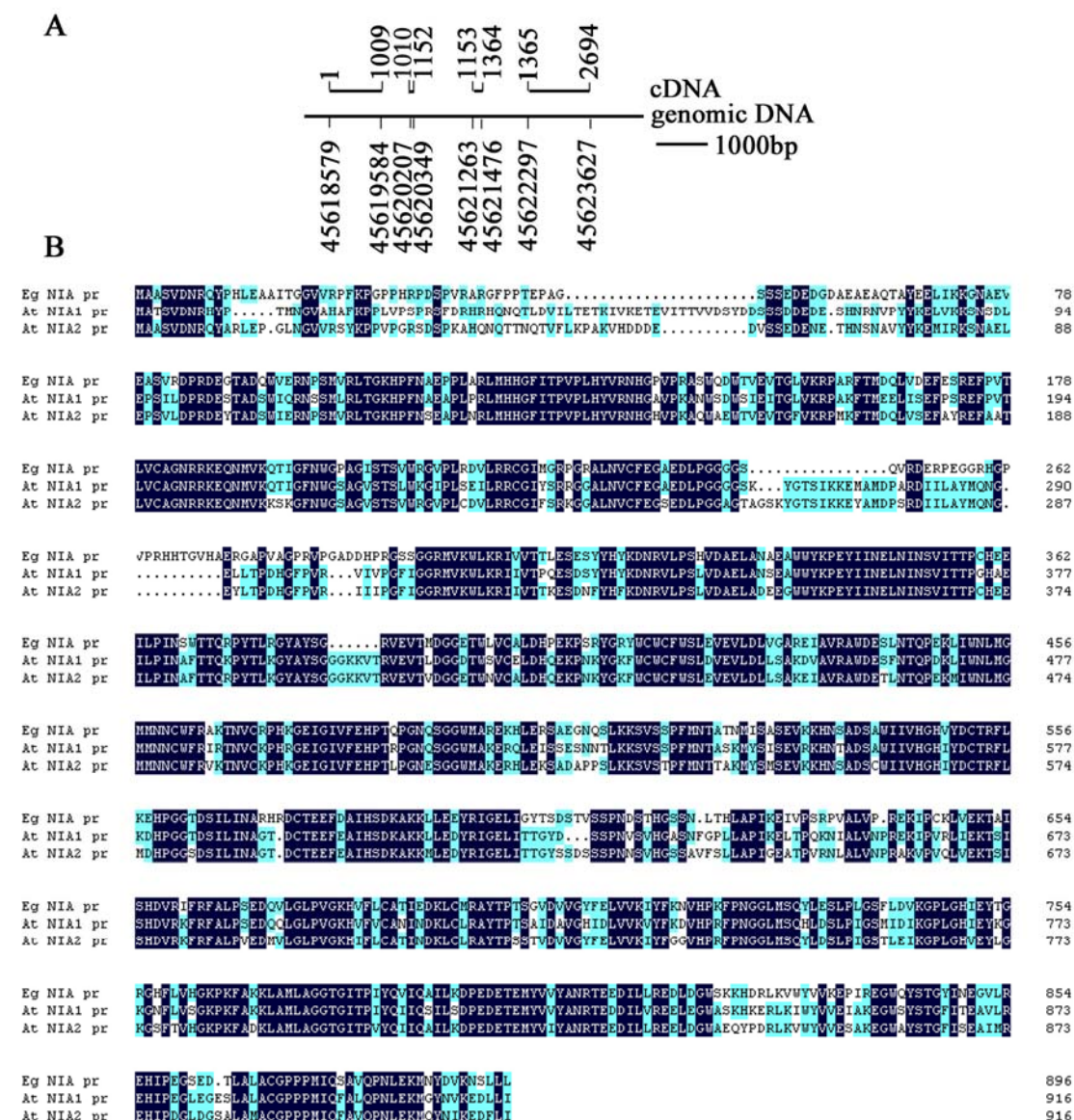


איור 8. בדיקות פלואורסנציה של DAF 2A בחתכים דקים של ייחורים צעירים ובוגרים מאיקליפטוס גרנדיס. ייחורים הוגמנו ב $250 \mu\text{l}$ תמיסת בופר 10mM MES pH 5.7 שהכילה $10\mu\text{M}$ DAF 2A בנוכחות או בהיעדר $200\mu\text{M}$ cPTIO למשך 30 דקות. לאחר שכל התמיסה נשתתה ע"י הייחורים נחתכו חתכים דקים שנצפו במיקרוסקופ הקונפוקלי. רמות הפלואורסנציה נמדדו מ 5 חתכים מכל טיפול בארבע חזרות. הגרף מראה ממוצעים כאחוז מרמת הפלואורסנציה בייחור צעיר. שורת התמונות העליונה והשלישית מראה פלואורסנציה של DAF 2A ואילו שורת התמונות השנייה והרביעית מראה את החתך באור עובר ובנוסף פלואורסנציה עצמית של כלורופלסטים באדום וכן את הפלואורסנציה בירוק של DAF 2A. סמן גודל 200 מיקרון.

איור 9. הצטברות של ניטריק אוקסיד בתאי גבעול של איקליפטוס גרנדיס. הצטברות ניטריק המזוהה ע"י הצבען הפלואורסנטי DAF 2A נבדקה באמצעות המיקרוסקופ הקונפוקלי. B-A ייחור צעיר, D-C ייחור בוגר. D, B אור פלואורסנטי על גבי התמונה של האור העובר המראה את דפנות התאים. ירוק – DFA 2A אדום – פלואורסנציה עצמית של הכלורופלסטים. גודל הסמן 10 מיקרון. החיצים מראים על הציטופלזמה הממוקמת בין החללית והדופן.

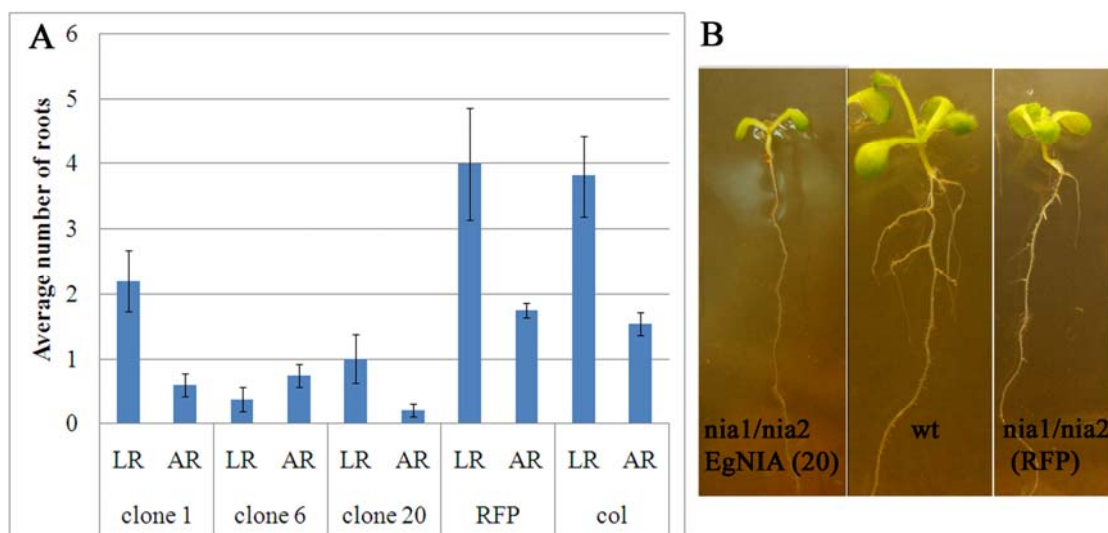


על מנת לודא שהגן לניטראט רדוקטאז שביטוייו עלה בייחורים הצעירים אכן מקודד לחלבון פעיל המעורב בייצור ניטריק אוקסיד בודדנו את ה-cDNA שלו מרנ"א של איקליפטוס גרנדיס באמצעות PCR. הודות לזמינות של הרצפים הגנומיים ולרצפי ESTs שפורסמו בעבר (8) שובט ורוצף מלוא אורכו של ה-cDNA של ניטראט רדוקטאז שנקרא EgNIA. סריקת בסיס הנתונים הגנומי העידה על קיומו של גן אחד בלבד לניטראט רדוקטאז באיקליפטוס גרנדיס. השוואה לרצפים מארבידופסיס העידה על שימור ברמה של 79% זהות באנזים מאיקליפטוס ועל קיומם של כל האיזורים הפונקציונאליים הידועים באנזימי ניטראט רדוקטאז מאורגניזמים אחרים (22). בנוסף, החלוקה לאקסונים ואינטרונים דומה מאד בין איקליפטוס לארבידופסיס (23) (איור 10).



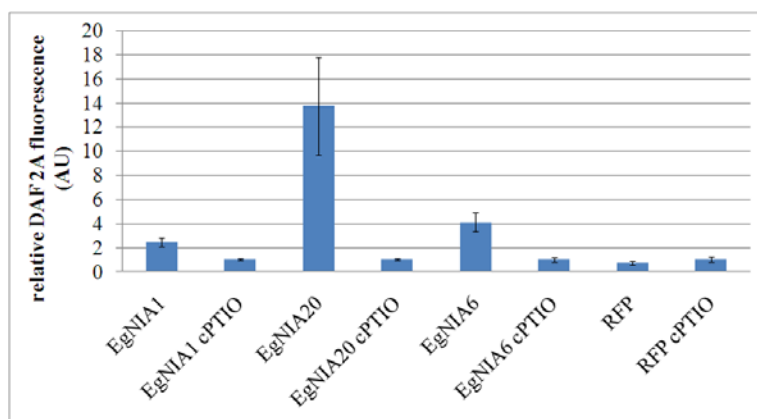
איור 10. הגן לניטראט דוקטאז מאיקליפטוס גרניס *EgNIA*. *A* חלוקה לאקסונים ואינטרונים. *B* הומולוגיה לגנים מאריבדופסים *NIA1* ו-*NIA2*.

רצף ה-cDNA של *EgNIA* שובט בוקטור לביטוי בצמחים תחת הבקרה של הפרומוטר 35S ולקצה ה-C-term שלו אוחה החלבון הזוהר באדום RFP עם גשר של 4 חומצות אמינו אלנין. צמחי אריבדופסים מוטנטים לשני הגנים לניטראט דוקטאז *nia1/nia2* עברו טרנספורמציה עם הגן מאיקליפטוס ובתור ביקורת עם RFP לבד. הסלקציה נבחרה להיות בסטה מכיוון שצמחי *nia1/nia2* עמידים לקנמיצין. זרעים מצמחים בודדים מדור F2 נזרעו בצלחות פטרי על מצע MS ונעשה מעקב אחר דגם ההתפתחות שלהם (איור 11). בנוסף, הצמחים הושרו ב- DAF 2A על מנת לבדוק כשר ייצור NO (איור 12).

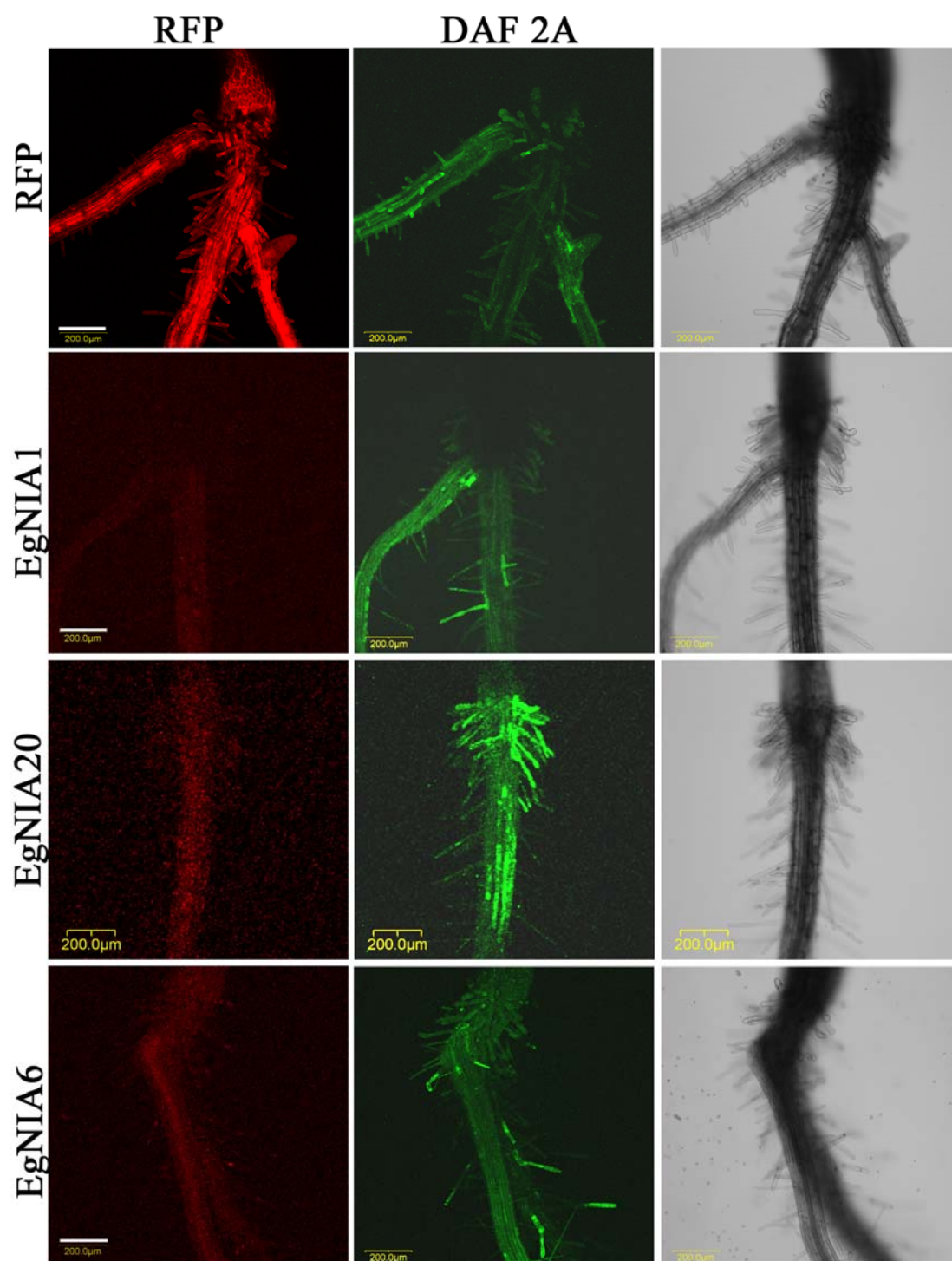


איור 11. התפתחות צמחי *nia1/nia2* המבטאים את הגן *NIA* מאיקליפטוס יותר איטית. צמחונים בני 10 ימים שגדלו על צלחת מאונכת צולמו ומספר השורשים הצדדיים והאדוונטיבים שלהם נספרו. שורשים אדוונטיבים הם אלו היוצאים מאיזור החיבור בין ההיפוקוטיל והשורש הנקרא *collett*. נראה שישנם פחות שורשים צדדיים ואדוונטיבים בצמח המבטא את הגן מאיקליפטוס. קלון 20 הוא הצמח המצולם. *RFP* הוא הצמח המבטא את החלבון הזוהר באדום לבד.

הצמחים הטרנסגנים נטבלו בבופר המכיל את הצבען DAF 2A בנוכחות או בהעדר cPTIO. בדיקה כמותית במיקרוסקופ הקונפוקלי הראתה פלואורסנציה חזקה יותר בצמחים שביטאו את הגן מאיקליפטוס לעומת הצמחים שביטאו *RFP* לבד בנוכחות DAF 2A. כמו כן הסקוונג'ר של ניטריק אוקסיד cPTIO החליש מאד את הזהירה של DAF 2A, דבר המעיד על נוכחות מוגברת של ניטריק אוקסיד בצמחים המבטאים ביתר ניטרט רדוקטאז מאיקליפטוס (איורים 12 ו-13).



איור 12. כימות של הפלואורסנציה הנובעת מצביעת DAF 2A בצמחי ארבידופסיס טרנסגנים המבטאים את הגן לניטריק אוקסיד מאיקליפטוס מאוחה ל *RFP* או *RFP* לבד. התוצאות מבוטאות ביחס לרמת הפלואורסנציה בנוכחות cPTIO בכל קלון בנפרד.



איור 13. צביעת DAF 2A בצמחי ארבידופסיס טרנסגנים המבטאים RFP לבד או את הגן לניטראט רדוקטאז מאיקליפטוס גרנדיס מאוחד ל-RFP.

דיון:

במסגרת מענק מחקר זה התחלנו ללמוד התמינות שורשים אדוונטיבים בצמחים מעוצים בכמה רמות. על מנת ללמוד את תרומת תהליך הצערה בתרבית רקמה לחידוש כשר השתרשות בחרנו איקליפטוס ברכפילה. זהו איקליפטוס לנוי בעל עלים מאפירים שמאבד את כשר ההשתרשות שלו בשלב מקודם מאד בחייו. הצערה של קלון מצטיין אכן הוכיחה את עצמה והובילה לחידוש כשר השתרשות. על מנת ללמוד על הבסיס המולקולרי של אובדן כשר ההשתרשות עם תהליך ההתבגרות בחרנו באיקליפטוס גרנדיס כצמח מודל. ע"י אנליזה השוואתית של מכלול הגנים המתבטאים בייחורים צעירים לעומת בוגרים באמצעות שבבי דנ"א גילינו שהאנזים ניטראט רדוקטאז מבוקר התפתחותית. בצמחים, ניטראט רדוקטאז הוא אחד מהאנזימים המעורבים בסינטזת ניטריק אוקסיד. בהמשך נמצא שמולקולת הניטריק אוקסיד המשמשת גם כמתווכת אותות מאוקסין משמעותית להתמינות שורשים אדוונטיבים. **בהתאמה מצאנו שתוספת ניטריק אוקסיד לטיפול ההשרשה שיפרו השתרשות באיקליפטוס גרנדיס.** בדיקות של תכולת ניטריק אוקסיד הוכיחו שאכן קימות רמות גבוהות במקצת בייחורים הצעירים לעומת הבוגרים. כמו כן האנזים שביטוי עלה בייחורים הצעירים בודד ובוטא בצמחי ארבידופסיס. מדידות של תכולת ניטריק אוקסיד בצמחים הללו מוכיחות שהאנזים פעיל. עבודה זו מוכיחה שמחקרים ברמה התשתיתית יכולים להוביל לפתרונות אגרוטכנים.

ביבליוגרפיה

1. I. J. Bennett, J. A. McComb, C. M. Tokin, D. A. J. McDavid, *Ann. Bot.* 74, 53 (1994).
2. A. G. Fett-Neto *et al.*, *Tree Physiol* 21, 457 (May, 2001).
3. K. W. Hutchison, P. B. Singer, S. McInnis, C. Diaz-Sala, M. S. Greenwood, *Plant Physiol* 120, 827 (Jul. 1999),
4. N. Vidal, G. Arellano, M. C. San-Jose, A. M. Vieitez, A. Ballester, *Tree Physiol* 23, 1247 (Dec, 2003).
5. R. D. Ioio *et al.*, *Curr Biol* 17, 678 (Apr 17, 2007).
6. C. Diaz-Sala, G. Garrido, B. Sabater, *Physiol Plant* 114, 601 (Apr, 2002).
7. D. M. Paton, R. R. Willing, W. Nichols, L. D. Pryor, *Aus J Bot* 18, 175 (1970).
8. E. Novaes *et al.*, *BMC Genomics* 9, 312 (2008).
9. P. Zimmermann, M. Hirsch-Hoffmann, L. Hennig, W. Gruissem, *Plant Physiol* 136, 2621 (Sep, 2004).
10. F. Fornara, G. Coupland, *Cell* 138, 625, 138 Aug 21, 2009.
11. M. K. Kandasamy, L. U. Gilliland, E. C. McKinney, R. B. Meagher, *Plant Cell* 13, 1541 (Jul, 2001).
12. Y. Morot-Gaudry-Talarmin *et al.*, *Planta* 215, 708 (Sep, 2002).

- .13 H. C. Oliveira, G. C. Justino, L. Sodek, I. Salgado, *Plant Sci.* 176, 105 (2009).(
- .14 P. Rockel, F. Strube, A. Rockel, J. Wildt, W. M. Kaiser, *J Exp Bot* 53, 103 (Jan, 2002).(
- .15 H. Yamasaki, Y. Sakihama, *FEBS Lett* 468, 89 (Feb 18, 2000).(
- .16 H. Yamasaki, Y. Sakihama, S. Takahashi, *Trends Plant Sci* 4, 128 (Apr , (1999
- .17 I. Lanteri, G. C. Pagnussat, A. M. Laxalt, L. Lamattina, *In: Adventitious root formation of forest trees and horticultural plants - from genes to applications. Eds. K. Niemi and C. Scagel, Research Signpost, India*, pp. 31 (2009).(
- .18 G. C. Pagnussat, M. L. Lanteri, L. Lamattina, *Plant Physiol* 132, 1241 (Jul, 2003).(
- .19 G. C. Pagnussat, M. L. Lanteri, M. C. Lombardo, L. Lamattina, *Plant Physiol* 135, 279 (May, 2004).(
- .20 G. C. Pagnussat, M. Simontacchi, S. Puntarulo, L. Lamattina, *Plant Physiol* 1) 954 ,29Jul, 2002.(
- .21 E. Planchet, W. M. Kaiser, *J Exp Bot* 57, 3043 (2006).(
- .22 W. H. Campbell, K. R. Kinghorn, *Trends Biochem Sci* 15, 315 (Aug, 1990).(
- .23 M. Konishi, S. Yanagisawa, *Plant Cell Physiol* 52, 824 (May.(

סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס לכל השאלות בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).

שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.

הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
באופן כללי הושגו מטרות המחקר,
עיקרי הניסויים והתוצאות.
פתחנו פרוטוקול לריבוי איקליפטוס ברכיפילה בתרבות. במסגרת הלימוד של הבסיס המולקולרי להתמינות שורשים אדוונטיבים בייחורים צעירים גילינו שמסלול סינטזת ניטריק אוקסיד רלוונטי ושתוספת ניטריק אוקסיד חיצונית משפרת השתרשות באיקליפטוס גרנדים
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?
מטרות המחקר הושגו. גילינו שהחומר תורם ניטריק אוקסיד מעודד השתרשות באיקליפטוס ברכיפילה וגרנדים. זוהי למעשה דוגמא לידע שעובר מהמבחנה לשדה. כרגע אנו בוחנים מיני איקליפטוס נוספים ושיחים מעוצים קשי השרשה אחרים באשר ליכולתו של החומר לעודד בהם התפתחות שורשים אדוונטיבים.
בעיות שנותרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנותרה לביצוע תוכנית המחקר?
עדין עלינו לאפיין לעומק את תפקידם של מספר גנים שעלו בשבב הדנ"א באשר לתרומתם להתמינות שורשים אדוונטיבים.
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פוטנטיים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום
העבודה תוצג בכנס 6 th International Symposium on Root Development: Adventitious, lateral and primary roots המתקיים בקנדה באוגוסט הקרוב. שני מאמרים המתארים את התוצאות נמצאים בשלבי כתיבה מתקדמים.
פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)
רק בספריות ⏪
ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) ⏪
חסוי – לא לפרסם נא להשאיר את הדו"ח חסוי ⏪
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן* - לא -

