

תקציר הדו"ח:

1. חשיבות ומטרות: הצמחים השייכים לקבוצת הגיאופיטים מהווים את אחת קבוצות הצמחים המובילים במסחר צמחי הנוי בעולם. בהולנד, היצרנית המובילה בעולם של מוצרי נוי צמחיים, מהווים הגיאופיטים כ-45% מכלל היצור של פרחי הקטף. ערך חומר הרבוי של הגיאופיטים בהולנד הוא כ-6.5 מיליארד יחידות ריבוי אשר מוערך ביותר ממיליארד גילדן לשנה. הרהבת היקף ענף זה מחייבת טיפוח ואקלום זנים חדשים בעלי תכונות רצויות עם ערך מוסף גבוה. מטרת מחקר זה היא לפתח מערכת טרנספורמציה גנטית עבור נץ חלב דוביזם שהוא גיאופיט חד-פסיגי ממשפחת השושניים. גידול זה מאוד אטרקטיבי בשוק העולמי והינו בעל חשיבות כלכלית גבוהה בארץ ובעולם וידוע כרגיש לאלות בוירוסים. לכן, זמינות מערכת טרנספורמציה יעילה יכולה לשמש כלי חשוב להתחדת גנים רצויים לגידול הזה.
2. מהלך ושיטות עבודה: החידק אגרובקטריום טומיפאסינס (*AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*) הינו האמצעי היעיל ביותר בטרנספורמציה של מיני דו-פסיגיים שונים. אבל במקרה של חד-פסיגיים או שאינו מדביק אותם ובמקרים מסוימים מדביק אותם בצורה מאד חלשה. לכן, במחקר זה יישמנו את שיטת הטרנספורמציה בעזרת רובה החלקיקים אשר הוכח כיעיל בטרנספורמציה של חד-פסיגיים. לשם כך, פיתחנו מערכת רגנרציה נצרים יעילה. בנוסף, נססנו מערכת סלקציה יעילה לברירת הצמחים הטרנסגניים. לאחר מכן, עשינו נסיונות לאופטימזציה של הנורמים השונים לקבלת מקסימום ביטוי חולף של הגן המדווח.
3. תוצאות עיקריות: תרכיות רקמה של נץ חלב דוביזם: נמצאו התנאים המיטביים לקבלת רגנרציה של צמחים בתרכית מקטעי כסיסי עלים אשר ניתן לשמור אותם בתנאי תרכית. מצע הרגנרציה המתאים היה מצע כסיסי ע"ש מורשיגי וסקוק בתוספת 3% סוכרוז ו-0.1 MG/L NAA + 1 MG/L BA. שיטה זו תשמש לנסיונות הטרנספורמציה. בנוסף, פותחה שיטה של רגנרציה ישירה של נצרים דרך מערכת של עוברים סומטיים.
4. מסקנות והמלצות: לאחר אישור הטרנספורמציה ע"י SOUTHERN BLOT חשוב מאד להתחיל בהחדת גנים בעלי חשיבות כלכלית כגון עמידות לוירוסים.

פיתוח מערכת טרנספורמציה גנטית בגן חלב - גידול בצל פורח
Development of Transformation System for *Ornithogalum*

דו"ח מסכם (לשנתיים: 96 - 97)

Final Report 96 - 97

מוגש: למו"פ בתי צמיחה ורבוי-מדען ראשי

Submitted to Chief Scientist Ministry of Agriculture

ע"י: עבד וואד, רן סטו, אבנר כהן

By: Abed Watad, Ran Stav, Avner Cohen

המחלקה לפרחים וצמחי נוי - מרכז וולקני

Dept. of Ornamental Hort. The Volcani Center

Email: vcwatad@volcani.agri.gov.il

תקציר:

1- חשיבות ומטרות- הצמחים השייכים לקבוצת הגיאופיטים מהווים את אחת קבוצות הצמחים המובילים במסחר צמחי הנוי בעולם. בהולנד, היצרנית המובילה בעולם של מוצרי נוי צמחיים, מהווים הגיאופיטים כ-45% מכלל היצור של פרחי הקטיפ. ערך חומר הרבוי של הגיאופיטים בהולנד הוא כ-6.5 מליארד יחידות רבוי אשר מוערך ביותר ממליארד גילדן לשנה. הרחבת היקף ענף זה מחייבת טיפוח ואקלום זנים חדשים בעלי תכונות רצויות עם ערך מוסף גבוה. מטרת מחקר זה היא לפתח מערכת טרנספורמציה גנטית עבור נץ חלב דוביום שהוא גיאופיט חד-פסיגי ממשפחת השושניים. גידול זה מאד אטרקטיבי בשוק העולמי והינו בעל חשיבות כלכלית גבוהה בארץ ובעולם וידוע כרגיש לאלוהי ביורוסים. לכן, זמינות מערכת טרנספורמציה יעילה יכולה לשמש כלי חשוב להחדרת גנים רצויים לגידול הזה.

2- מהלך ושיטות עבודה- החידק אגרובקטיריום טומיפאסינס (*Agrobacterium tumefaciens*) הינו האמצעי היעיל ביותר בטרנספורמציה של ימיני דו-פסיגיים שונים. אבל במקרה של חד-פסיגיים או שאינו מדביק אותם ובמקרים מסויימים מדביק אותם בצורה מאד חלשה. לכן, במחקר זה יישמנו את שיטת הטרנספורמציה בעזרת רובה החלקיקים אשר הוכח כיעיל בטרנספורמציה של חד-פסיגיים. לשם כך, פיתחנו מערכת רגנרציה נצרים יעילה. בנוסף, ביססנו מערכת סלקציה יעילה לברירת הצמחים הטרנסגנים. לאחר מכן, עשינו נסיונות לאופטמוזציה של הגורמים השונים לקבלת מקסימום ביטוי חולף של הגן המדווח.

3- תוצאות עיקריות- תגובות רקמה של נץ חלב דוביום: נמצאו התנאים המיטביים לקבלת רגנרציה של צמחים בתרבות מקטעי בסיסי עלים אשר ניתנו לשמור אותם בתנאי תרבות. מצע הרגנרציה המתאים היה מצע בסיסי ע"ש מוריסיגי וסקוק בתוספת 3% סוכרוז ו-1 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA. שיטה זו תשמש לנסיונות הטרנספורמציה. בנוסף, פותחה שיטה של רגנרציה ישירה של נצרים דרך מערכת של עוברים סומטיים. נמצאו התנאים האופטמליים של טרנספורמציה לאחר אופטמוזציה של תנאי החדרת הגן המדווח ובדיקת רמת הביטוי החולף של גן זה לקטעי בסיסי עלים שמקורם בתרבות. תנאים אלה היו:

שימוש בחלקיקי טנגסטין בקוטר $1.2 \mu m$ וכמות הדנ"א האופטימלית ליחידת חלקיקי מתכת היא 0.5 mg DNA/ mg Tungsten וכאשר הירי של הפלסמיד התבצע במרחק של 6 cm ממקור הירי ובלחץ של 1100 psi ולא נמצאה השפעה לריכוז הסוכר במצע. גורם לחץ הסלקציה היעיל הוא באסטה בריכוז של 0.5 mg/l - 2 mg/l. צמחים עמידים לבאסטה התקבלו עקב נסיונות הירי בפלסמיד שנושא את הגן *PAT*. נותר לאשר את האינטגרציה של הגן הנייל בגינום של נץ החלב דוביום ע"י מבחן Southern blot.

4- מסקנות והמלצות- לאחר אישור הטרנספורמציה ע"י Southern blot חשוב מאד להתחיל בהחדרת גנים בעלי חשיבות כלכלית כגון עמידות לוירוסים.

מבוא (רקע מדעי ומטרות המחקר לתקופת הדו"ח לשנים 97-98):

הצמחים השייכים לקבוצת הגיאופיטים מהווים את אחת קבוצות הצמחים המובילים במסחר צמחי הנוי בעולם. בהולנד, היצרנית המובילה בעולם של מוצרי נוי צמחיים, מהווים הגיאופיטים כ-45% מכלל היצור של פרחי הקטף. ערך חומר הרבוי של הגיאופיטים בהולנד הוא כ-6.5 מליארד יחידות רבוי אשר מוערך ביותר ממליארד גילדן לשנה. הרחבת היקף ענף זה מחייבת טיפוח ואקלום זנים חדשים בעלי תכונות רצויות עם ערך מסוף גבוה. בהולנד החלה כבר פעילות רחבה לפיתוח מערכות טרנספורמציה גנטית להחדרת תכונות רצויות חשובות בצמחי גיאופיטים שונים, (כגון עמידות למזיקים ולשנוי צבע של הפרחים). לעומת זאת אצלנו לא קיים כל מחקר עד כה בנושא זה בגיאופיטים פורחים.

הערה: החלק של שושן הורד מהתוכנית המתקנת וזאת על פי החלטת ועדת השיפוט להתרכז בנץ חלב בלבד.

נץ חלב:

הסוג *Ornithogalum* הוא גידול בצל פורח חד-פסיגי ממשפחת השושניים. מיני נץ החלב העקריים: ערבי (לבן); טרזואידי (לבן); "עובה" (לבן) ודוביום (צהוב וכתום). לנץ החלב דוביום, פרחים לא אחידים, גבעול פריחה קצר וצבע הפרחים קיים בנווני צבע שונים (צהוב-כתום). במין זה אין עדיין סלקציות אחידות וקיימות בו מספר מגבלות: שיעור הרבוי הווגטטיבי שלו נמוך מאד, אורך גבעול הפריחה שלו קצר והוא מתאלח בוורוס בתדירות גבוהה. מאידך נץ החלב דוביום מאד מבוקש ואטרקטיבי בגלל צבע פרחיו. לאחרונה החלו נסיונות לטיפול (ע"י אבנה כהן) ולהכלאות בין-מיניות במטרה לקבל צמחים בעלי גבעולי פריחה ארוכים יותר עם סבילות לוורוס. בשנה האחרונה נמכרו בבורסות ההולנדיות כ-32 מליון פרחים במחיר ממוצע של 50 סנט הולנדי. רוב הפרחים ששווקו בבורסות הן מנץ חלב טרזואידי (כ-15 מליון) ונץ חלב ערבי (4.5 מליון גבעולים פורחים), לאחרונה ישנה התעניינות רבה במינים. מישאל יוצאו בשנה שעברה כ-230 אלף פרחים במחיר ממוצע של 30 סנט הולנדי. ציבור המגדלים בארץ מגלה התעניינות רבה בגידול זה וצפויה הרחבתו בעתיד.

רקע מדעי: טיפוח בדרכים קונבינציונלית הביא לשיפור רב ועצום של גדולים שונים בחקלאות אבל דרך זו הינה מוגבלת ע"י מספר התכונות הזמינות במאגר הגנטי של מינים או זנים תואמים מבחינה גנטית ושניתן לבצע ביניהם הכלאות פוריות. מבין ההישגים החשובים של הנדסה גנטית הוא השימוש בטכנולוגיית הטרנספורמציה של גנים לתוך הגנום של צמחים עילאיים. להתבטאות של גנים אלה בפנוטיפ של צמחים קיימת חשיבות גדולה ובמיוחד כאשר לגנים אלה קיימת חשיבות כלכלית. באמצעות החידק אגרובקטריום, מספר גידולים חקלאיים חשובים מהדו-פסיגיים הותמרו בהצלחה לדוגמא כותנה, פשתה, סוייה ותפוחי אדמה. באמצעות פיתוח הטכנולוגיה של התמרת גנים לצמחים הוחדרו גנים חשובים שהביאו לשיפור איכות הצמח. החדרתו של דני"א לתאים צמחיים מתאפשרת באמצעות מגוון

שיטות מבניהן: אגרובקטריום, קליטה ישירה של דנ"א דרך פרוטופלסטים, ע"י הזרקה (microinjection) עדינה ובאמצעות ירי של חלקיקי דנ"א ברובה חלקיקים (Particle bombardment). לכל אחת מהשיטות הנ"ל קיימות יתרונות וחסרונות, ובעצם לאף אחת מהשיטות שהוזכרו לעיל יש את היכולת לפתור את כל הקשיים בנושא טרנספורמציה של מיני צמחים שונים. הטרנספורמציה של כל צמח תלויה ביכולת להחדיר מקטע מהגנום לתא מסויים וביכולת הרגנרציה לצמח שלם של התא הטרנספורמנטי. הגידול שדנה בו תוכנית מחקר, נץ חלב, הינו גיאופיט חד-פסיגי. כידוע טרנספורמציה של חד-פסיגיים היתה נושא קשה מאד עד לאחרונה וזאת עקב העדר מערכת טרנספורמציה מתאימה.

טרנספורמציה של חד-פסיגיים:

החיידק אגרובקטריום טומיפאסינס (*Agrobacterium tumefaciens*) הינו האמצעי היעיל ביותר בטרנספורמציה של מיני דו-פסיגיים שונים. אבל במקרה של חד-פסיגיים או שאינו מדביק אותם ובמקרים מסויימים מדביק אותם בצורה מאד חלשה. שיטות נוספות נוסו לטרנספורמציה של חד-פסיגיים ואשר מבוססות על החדרת דנ"א לפרוטופלסטים כגון בנכחות הפולימר (PEG) פוליאטילן-גליקול או ע"י אלקטרופורזיה. שיטות אלה (אשר מבוססות על שימוש בפרוטופלסטים) הן מאד בעייתיות בחד-פסיגיים מאחר ודרוש זמן ממושך לרגנרציה של פרוטופלסט עד לקבלת צמח שלם. בנוסף על כך דרושה רמת רגנרציה מאד גבוהה כאשר בהרבה מקרים של חד-פסיגיים המצב אינו כך, בעייה נפוצה נוספת בחד-פסיגיים היא קבלת צמחים רגנרטים עקרים מינית מפרוטופלסטים. בנוסף לשיטות הנ"ל, ייושם רובה החלקיקים ונמצא היעיל ביותר לטרנספורמציה של חד-פסיגיים וכעת קיימת רשימה מאד ארוכה של צמחים חד ודו-פסיגיים אשר הותמרו בגנים בדרך זו. שיטות חד-פסיגיות לשיטה הזאת של רובה החלקיקים ישנם מספר יתרונות בתהליך הטרנספורמציה: בעזרתו ניתן לעקוף את שאלת הספיציפיות של האגרובקטריום לפונדקאים (מיני צמחים) שונים, ניתן להשתמש בסוגים שונים של רקמות ואברי צמח כיעד לטרנספורמציה כגון עוברים סומטיים, קאלוס, קטעי עלים או קטעי גבעולים. מבין הגורמים החשובים להצלחת תהליך הרגנרציה באמצעות רובה החלקיקים הוא התכונות המורפוגנטיות של רקמת הייעד, חשוב שזו תהיה רקמה עם תאים מרסטימיים ובעלת יכולת רגנרציה של צמחים. גם לגורמים פזיקלים כגון: גדל וצפיפות חלקיקי המתכת שמשתמשים בהם כנשאים לדנ"א, מנת הדנ"א ליריה, רמת הוואקום שמפעילים בגוף המתקן, המרחק של רקמת הייעד ממקור הירי.

את האופטמזציה של המערכת מבצעים ע"י מעקב אחרי התבטאותם (אפשר לאחר 24 או 48 שעות במקרה של בדיקת ביטוי חולף) של גנים מדווחים כגון, β -glucuronidase (GUS). תהליך הסלקציה לקבלת התמרת יציבה של הגן, מלווה בהוספת גורם לחץ סלקציה למצע הגידול זמן מסויים (בדרך כלל 48 שעות) לאחר הירי של רקמת הייעד על מנת לאפשר שילובו. סוג החומר שימש לסלקציה נקבע בהתאם לגן הסמן

(Selectable marker gene) שהפלסמיד נושא כגון הגן *NPT II* אשר מקנה עמידות לקנמצין אבל מדווח בספרות על בעייתיות השימוש בקנמצין כחד-פסיגיים מאחר והם עמידים יחסית לאנטביוטיקה זו ואז מתקבלים הרבה צמחים שאינם טרנסגניים. לכן קיימת עדיפות בלהשתמש בחומרים אחרים כגון מקבוצת קוטלי העשבים בסטה (Basta, Bialaphos) ולשם כך משתמשים בפלסמידים נושאי נושאי הגן *PAT* או *BAR*. לסיכום, לשימוש ברובה החלקיקים כאמצעי לטרנספורמציה של מינים חד-פסיגיים קיים יתרון רב על השימוש באמצעי לטרנספורמציה אחרים. ועל מנת להבטיח קבלת צמחים מותמרים בצורה יציבה יש לקחת בחשבון גורמים שונים אשר השתדלו להתייחס אליהם בדיון עד כה: כפי שהוזכר לעיל תוכנית זו תתרכז בטרנספורמציה של נץ חלב באמצעות רובה החלקיקים.

תרביות רקמה של נץ חלב:

רגנרציה של נצרים בתרבית רקמה ניתן לקבל בשני מסלולים: באמצעות תהליך רגנרציה ישירה של נצרים מקטעי הצמח השונים או באמצעות רגנרציה עקיפה, קרי דרך מעבר בשלב קאלוס שמתפתח מרקמות קטעי הצמח השונים. במסגרת מחקר זה תיבחן האפשרות של רגנרציה ויצירת צמחים בשתי הדרכים הנ"ל. בנוסף, ניתן לקבל רגנרציה של צמחים דרך מסלול של עוברים סומטיים. למערכת זו קיים יתרון חשוב בתהליך קבלת צמחים טרנסגניים מאחר ובדרך כלל עוברים סומטיים מתפתחים מתאים בודדים. וכאשר מקבלים צמחים ממקור תא בודד אין בעייה של קבלת מחים כימריים.

מטרות המחקר באופן כללי:

לפתח מערכת לטרנספורמציה גנטית עבור נץ חלב שהוא גיאופיט חד-פסיג ממשפחת השושניים. למטרה זו אנחנו מתכוונים להשתמש במערכת הרגנרציה הראשונה, מערכת רגנרציה ישירה מקטעי אברים ווגטיבי שונים של הצמח כגון גלדים, עוגת הבצל, ניצנים ועלים. המערכת השנייה, מעוברים סומטיים. כאמצעי לחדרת גנים בכונתנו להתרכז ברובה החלקיקים שהוא אמצעי יעיל לטרנספורמציה של חד-פסיגיים.

מטרות המחקר לשנתיים: 96 - 97:

- 1- הכנסה וביסוס תרבית נץ חלב דוביום ממקור גלדים של בצל האם.
- 2- ביסוס מערכת רגנרציה של נץ חלב דוביום מהגלדים ולאחר מכן מקטעי גלדים ומבסיסי עלים של הבצלצולים והנצרים שיתקבלו בתנאי תרבית.
- 3- ביסוס מערכת רגנרציה עקיפה מקאלוס דרך אורגנוגניזה עקיפה.
- 4- ביסוס מערכת רגנרציה ישירה של עוברים סומטיים.
- 5- ביסוס מערכת סלקציה. הנסיונות יכללו חשיפה של קטעי בסיסי עלים וגושי קאלוס לרמות שונות של קנמצין (0, 10, 25, 50, 100, 200 mg/l) ובמקביל לרמות עולות של בסטה (0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 mg/l) על

מנת להגדיר את הריכוז המתאים לתחילת נסיונות הטרנספורמציה.

6- אופטמזציה של הגורמים השונים לקבלת מקסימום ביטוי חולף של הגן המדווח. עבור טרנספורמציה ברובה החלקיקים ייבדקו הגורמים הבאים: השפעת גדל חלקיקי המתכת (טנגסטין) בקוטר $0.6, 1.2, 2.0, 4.0 \mu m$. תבדק כמות הדניא האופטימלית ליחידת חלקיקי מתכת ($0.5, 1.0, 2.0, 4.0 \text{ mg DNA/mg Tungsten}$). ייבדק הלחץ שיופעל בזמן הירי ($900, 1100, 1500 \text{ psi}$) והמרחק של רקמת הייעד ממקור הירי ($6.0, 9.0 \text{ cm}$). תבדק השפעת הוספת אוסמוטיקום למצע ההכנה לירי ($3.0 \text{ and } 9.0\% \text{ sucrose}$).

7- קבלת צמחים טרנסגניים של נץ חלב דוביום.

בכל נסיונות בדיקת ביטוי טרנספורמציה חולפת באמצעות ריאקציה הצבע בנוכחות X-Gluc על חלק מקטעי הצמח וחלק אחר מהקטעים הצמחיים יועברו למצע רגנרציה בנוכחות המתאים של קנמיצין או בסטה.

הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו לתקופת הדו"ח:

1- הכנסה וביסוס תרבית נץ חלב דוביום ממקור גלדים של בצל האם. קטעי גלדים מבצלי אם של נץ חלב דוביום הוכנסו ובוססו בהצלחה בתנאי תרבית לאחר שטיפה יסודית במים זורמים וחיטוי חיצוני בתמיסת כלור פעיל.

2- ביסוס מערכת רגנרציה של נץ חלב דוביום מהגלדים ולאחר מכן מקטעי גלדים ומבסיסי עלים של הבצלולים והנצרים שיתקבלו בתנאי תרבית.

ביססנו מערכת רגנרציה יעילה של נצרים מקטעי גלדים אספטיים שנשמרו בתנאי תרבית. נצרים מקטעי גלדים התקבלו במצע גידול ע"ש מורשינג וסקוק בתוספת $3\% \text{ סוכרוז}$, $1 \text{ mg/l BA} + 0.1 \text{ mg/l NAA}$. נמצא שהעברת נצרים אלה למצע שהכיל תוספת של $6\% \text{ סוכרוז}$ ו- 0.1 mg/l NAA הם מתפתחים לצמחונים מושרשים אך מעובים בבסיסים לקראת התפתחות בצלצולים בהמשך. בסיסי הצמח המעובים עם ובלי בצלצול היה ניתן לפרק ליחידות קטנות אשר ישמשו מקור לרגנרציה של צמחים. מהנסיונות שביצענו, נמצא שקטעי בסיסי עלים היו מאד רגנרטיביים וניתן לקבל מהם רגנרציה של נצרים דרך רגנרציה ישירה ע"י אינקובציה למשך חודש-חודשיים במצע גידול MS בתוספת 0.1 mg/l BA או $1 \text{ mg/l BA} + 0.1 \text{ mg/l NAA}$ עם יתרון ברור למצע השני (תמונה 1 א'). ואילו כאשר מדגירים את קטעי בסיסי העלים על מצע בתוספת 0.1 mg/l NAA בלבד מתקבלים מעט נצרים אבל עם שושרשים (תמונה 1 א').

3- ביסוס מערכת רגנרציה עקיפה מקאלוס דרך אורגנוגניזה עקיפה. כאשר מדגירים בסיסי עלים על מצע שהכיל $0.1 \text{ mg/l BA} + 1.0 \text{ mg/l NAA}$ מתפתח קאלוס אשר מפתח הרבה נצרים לאחר העברתו למצע שהכיל 0.1 mg/l BA (תמונה 1 ב').

לכן, לנסיונות הסלקציה על קנמיצין ובסטה וגם לנסיונות האופטמזציה של הטרנספורמציה ברובה החלקיקים

השתמשנו בקטעי בסיסי עלים.

4- פתוח מערכת רגנרציה ישירה של צמחים דרך עוברים סומטיים. השיטה שפותחה התבססה על השימוש בזרעים לא בשלים של נץ חלב דוביום והדגרתם על מצע שהכיל 1/2 MS salts והרכב מלא של ויטמינים של MS ובתוספת של 40 mg/l של טיאמין, 3% סוכרוז וי 6.5 g/l אגר. בתמונה 5, רואים את שלבי ההתפתחות השונים של העוברים הסומטיים כולל הבשלתם לצמחים שלמים.

5- ביסוס מערכת סלקציה. הנסיונות כללו חשיפה של קטעי בסיסי עלים וגושי קאלוס לרמות שונות של קנמצין (0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 mg/l) ובמקביל לרמות עולות של באסטה (0, 10, 25, 50, 100, 200 mg/l) על מנת להגדיר את הריכוז המתאים לתחילת נסיונות הטרנספורמציה.

נסיונות פתוח מערכת הסלקציה התרכזו בקטעי בסיסי עלים אשר נחשפו לריכוזים שונים של קנמצין ובסטה בנפרד. נבדקה תגובתן בשני מצעים, הראשון: מצע שהכיל 1.0 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA והשני הכיל תוספת של 0.1 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA.

התגובה לקנמצין במצע הראשון: תחילת עיכוב גדילה והתפתחות נמצאה בריכוז 25 mg/l Kanamycin עם תמותה של כ- 25% מהמקטעים ועיכוב ברור בהתפתחות (תמונה 2). מצד שני חוסר התפתחות של מרבית המקטעים התקבל בנוכחות 200 mg/l Kanamycin. תוספת של 50 או 100 mg/l Kanamycin גרמה לתמותה של כ- 50% מהמקטעים ועיכוב בהתפתחות בשיעור של כ- 75% (תמונה 2 א'). לכן, מומלץ להשתמש בתוספת של קנמצין בריכוז של 50 עד 100 מ"ג/ל' כאשר משתמשים בסוג מצע זה.

התגובה לקנמצין במצע ההשני היתה דומה בעקרון לתגובה במצע הראשון: התגובה של קטעי בסיסי עלים לריכוזי באסטה שונים במצע הראשון: נמצא שכבר בריכוז הנמוך של באסטה שנבדק (0.5 מ"ג/ל') היה עכוב בולט על תהליכי גדילה והתפתחות של קטעי בסיסי העלים (תמונה 2 ב'). ובתוספת של 1.0 מ"ג/ל' כ- 50% מהמקטעים לא התפתחו כלל במשך שתי העברות חודשיות בנוכחות ריכוז זה של באסטה. בנוכחות הריכוזים 2-8 מ"ג/ל' היתה תמותה של כ- 50% מהמקטעים וההתפתחות היתה זעירה מאד (תמונה 2 ב'). התגובה של קטעי בסיסי עלים לריכוזי באסטה שונים במצע השני: התגובה לריכוזי הבאסטה השונים במצע ההשני היתה דומה בעיקרון לתגובה במצע הראשון.

לכן, החלטנו להשתמש בגורם לחץ סלקציה זה (באסטה) בגלל יעילותו והרגישות הגבוהה של הרקמה הצמחית של נץ חלב דוביום כלפיו. והריכוז שנבחר לנסיונות הטרנספורמציה הוא 0.5 מ"ג/ל'.

6- אופטמיזציה של הגורמים השונים לקבלת מקסימום ביטוי חולף של הגן המדווח *GUS*. נמצא שההתבטאות החולפת של הגן המדווח היתה מקסימלית כאשר השתמשנו בחלקיקי טנגסטין בקוטר $1.2 \mu m$ וכמות הדנ"א האופטימלית ליחידת חלקיקי מתכת היא 0.5 mg DNA/mg Tungsten וכאשר הירי של

הפלסמיד התבצע במרחק של 6 cm ממקור הירי ובלחץ של 1100 psi ולא נמצאה השפעה לריכוז הסוכר במצע (תמונה 3 וטבלה 1).

7- קבלת צמחים טרנסגניים של נץ חלב דוביוס.

בשנה האחרונה בוצעו נסיונות טרנספורמציה בתנאים המיטביים הנ"ל ע"י שימוש בתערובת של שני פלסמידים, האחד נושא את הגן המדווח והשני נושא את הגן *PAT* אשר מקנה עמידות לבאסטה שמשמשת גורם לחץ הסלקציה (אך, מאחר ושני הפלסמידים הינם בעלי פרומטור זהה, רוב המקטעים עברו נסיונות טרנספורמציה עם הפלסיד שנושא את הגן של *PAT*). בסך הכל נסיונות נורו כ-1000 אקספלנטים אשר כל הזמן הועברו על מצע רגנרציה של נצרים בנוכחות של 2 מ"ג/ל של באסטה. משך כל העברה היה כחודש ימים. כעבור 4 העברות חודשיות התחילו להתפתח גושים של נצרים. לאחר מכן, נצרים הופרדו מהגוש והועברו למשך שתי העברות חודשיות על מצע שהכיל רמה נמוכה של באסטה (0.5 מ"ג/ל) וזאת במצע התארכות של נצרים ($MS + 0.5 \text{ mg/l BA} + 1 \text{ mg/l IAA}$) על מנת לאפשר צמיחה מהירה יותר של הנצרים. כעבור שתי ההעברות הנ"ל, הנצרים הועברו בחזרה לרמה הגבוהה של באסטה (2 מ"ג/ל) ואז נצפו הבדלים ברורים בתגובת הנצרים (חלקם מת (70%), חלקם היה כימי (20%) בעל צבע מגוון ירוק וצהוב וחלק מהנצרים (10%) היה ועדיין ירוק וגדל בצורה מוצלחת בנוכחות באסטה בריכוז גבוה). לסכום, כעת ישלנו כ-170 נצרים שגדלים בצורה מוצלחת בנוכחות באסטה (תמונה 4) בריכוז ליטאלי לצמחי הביקורת שלא עברו טרנספורמציה. נצרים אלה ירוקים וללא כל סימן פגיעה. כעת בכוונתנו להשריש את הנצרים האלה בנוכחות באסטה ולאחר מכן לבדוק את הטרנספורמציה באמצעות *PCR* ולבחון את מידת האינטגרציה של הגן הסלקטיבי בגנום ע"י בדיקת *Southern blot* כמקובל. חלק מהנצרים האלה נגזרו מרגנרציה משנית (בנוכחות 0.5 מ"ג/ל באסטה) מעלים שנתלשו מנצרים שבמקור עברו רגנרציה בנוכחות רמה גבוהה של באסטה (2 מ"ג/ל) לאחר נסיונות הירי עם הגן הסלקטיבי וזאת במטרה להגדיל את הסיכויים לקבלת צמחים טרנסגניים אמיתיים ולא כימיריים. לאחר האישור הסופי של הטרנספורמציה ע"י מבחני *PCR and Southern blot* יש להתחיל בטרנספורמציה של גנים בעלי חשיבות חקלאית כלכלית כגון עמידות לוירוסים.

המסקנות והשלכותיהן על המשך ביצוע המחקר:

נמצאו התנאים האופטימליים לקבלת רגנרציה של צמחים מקטעי בסיסי עלים של נץ חלב דוביוס דרך שני המסלולים המורפוגנטיים: אורגנוגנזה ישירה ועקיפה ובנוסף פותחה שיטה של רגנרציה דרך מערכת של עוברים סומטיים. החלטנו להשתמש בבסיסי עלים כרקמת יעד לנסיונות הטרנספורמציה בהמשך המחקר וזאת עקב יעילותה בתהליך הרגנרציה.

לאחר השלמת תהליך האופטמיזציה של טרנספורמציה ע"י מציאת התנאים האופטימליים לקבלת ביטוי חולף יעיל

של הגן המדווח, נסיונות הקו-טרנספורמציה (תערובת פלסמידים של הגן המדווח עם הגן שמקנה עמידות לבאסטה) בוצעו בשנה האחרונה באמצעות רובה החלקיקים. כעת ישלנו נצרים של נץ חלב דוביום שגדלים בנוכחות באסטה בריכוז גבוה. הנצרים גדלים יפה והם בצבע ירוק בנוכחות 2 מ"ג/ל באסטה, ריכוז זה הינו לטאלי לצמחי הביקורת. עכשיו, אנחנו מתכוונים לבדוק את הטרנספורמציה באמצעות PCR and Southern blot. לאחר אישור הטרנספורמציה בשני המבחנים המוליקולריים הנ"ל יהיה אפשר להתחיל בנסיונות טרנספורמציה עם גנים בעלי חשיבות חקלאית וכלכלית כגון עמידות לזיהומים שידועה כבעיה בגידול זה.

סכום מדעי של הדו"ח:

תרביות רקמה של נץ חלב דוביום: נמצאו התנאים המיטביים לקבלת רגנרציה של צמחים בתרבות מקטעי בסיסי עלים אשר ניתן לשמור אותם בתנאי תרבות. מצע הרגנרציה המתאים היה מצע ביסיסי ע"ש מורשיגי וסקוק בתוספת 3% סוכרוז וי 1 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA. שיטה זו תשמש לנסיונות הטרנספורמציה. בנוסף, פותחה שיטה של רגנרציה ישירה של נצרים דרך מערכת של עוברים סומטיים. נמצאו התנאים האופטימליים של טרנספורמציה לאחר אופטימיזציה של תנאי החדרת הגן המדווח ובדיקת רמת הביטוי החולף של גן זה לקטעי בסיסי עלים שמקורם בתרבות. תנאים אלה היו: שימוש בחלקיקי טנגסטין בקוטר 1.2 μ m וכמות הדנ"א האופטימלית ליחידת חלקיקי מתכת היא 0.5 mg DNA/ mg Tungsten וכאשר הירי של הפלסמיד התבצע במרחק של 6 cm ממקור הירי ובלחץ של 1100 psi ולא נמצאה השפעה לריכוז הסוכר במצע. גורם לחץ הסלקציה היעיל הוא באסטה בריכוז של 0.5 mg/l - 2 mg/l. צמחים עמידים לבאסטה התקבלו עקב נסיונות הירי בפלסמיד שנושא את הגן PAT. נותר לאחר את האלטרציה של הגן הנ"ל בגינים של נץ חלב דוביום ע"י מבחן Southern blot.

פרסומים מדעיים:

לאחר אישור הטרנספורמציה בשיטות שתוארו לעיל יתאפשר פרסום התוצאות בספרות המדעית.

הבעת תודה לגורמים שמימנו את המחקר:

תודתנו העמוקה למינהל המחקר החקלאי ולמדען הראשי של משרד החקלאות על מימונם ביצוע המחקר הנ"ל בשנים

1996-1997.

מקרא התמונות:**תמונה 1.**

א- רגנרציה של נצרים וצמחונים של נץ חלב דוביום בתנאי תרבית. קטע בסיס עלה כעבור 50 יום על מצע בסיסי בתוספת 0.1 mg/l BA (מצד ימין), בתוספת 0.1 mg/l NAA (באמצע), בתוספת 1.0 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA (מצד שמאל). ב- רגנרציה של נצרים מקאלוס שמקורו בקטע בסיס עלה לאחר הדגרתו במשך חודש על מצע בסיסי עם תוספת של 0.1 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA וכעבור חודש מהעברתו למצע שהכיל 0.1 mg/l BA (תמונה 1 ב').

תמונה 2 א.

תגובת קטעי בסיסי עלים של נץ חלב דוביום לריכוזים עולים (0, 10, 25, 50, 100, 200 mg/l) של קנמצין. המקטעים הודגרו במשך שתי העברות חודשיות בנוכחות הריכוזים הנ"ל במצע בסיסי של MS בתוספת 3% סוכרוז ו- 1.0 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA.

תמונה 2 ב.

תגובת קטעי בסיסי עלים של נץ חלב דוביום לריכוזים עולים (0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 mg/l) של באסטה. המקטעים הודגרו במשך שתי העברות חודשיות בנוכחות הריכוזים הנ"ל במצע בסיסי של MS בתוספת 3% סוכרוז ו- 1.0 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA.

תמונה 3.

התבטאות חולפת של הגן המדווח *GUS* בקטעי בסיסי עלים של נץ חלב דוביום וזאת לאחר ירי ברובה חקיקים של הפלסמיד pPHP 3953 שנושא את הגן המדווח כעבור 48 שעות מתחילת הניסוי.

תמונה 4.

תגובת גושי נצרים של נץ חלב דוביום לריכוז גבוה של באסטה (2 מ"ג/ל) וזאת לאחר שגדלו במשך שתי העברות חודשיות על בנוכחות רמה נמוכה של באסטה (0.5 מ"ג/ל). בתמונה רואים נצרים ירוקים עמידים לבאסטה.

תמונה 5.

שלבי התפתחות שונים של רגנרציה נצרים ישירה ממקור של זרעים לא בשלים של נץ חלב דוביום.

טבלה 1.

השפעת פרמטרים שונים של ירי ברובה החלקיקים על התבטאות חולפת של של הגן המדווח GUS בקטעי בסיסי עלים של נץ חלב דוביום. קטעי בסיסי העלים הודגרו במשך 2-4 ימים במצע MS שהכיל תוספת של 3% או 9% סוכרוז וי 1.0 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA. הביטוי החולף נבדק כעבור 48 שעות מזמן הטרנספורמציה ע"י ספירת מספר הנקודות הכחולות למקטע.

GUS Transient Expression

<u>Blue spots/explant</u>	<u>Treatment</u>
3.1 ± 1.1	900 psi, 6 cm, 3% sucrose
3.3 ± 1.5	900 psi, 6 cm, 9% sucrose
1.8 ± 0.6	900 psi, 9 cm, 3% sucrose
2.1 ± 0.5	900 psi, 9 cm, 9% sucrose
12.5 ± 4.2	1100 psi, 6 cm, 3% sucrose
11.2 ± 3.9	1100 psi, 6 cm, 9% sucrose
4.1 ± 0.9	1100 psi, 9 cm, 3% sucrose
3.8 ± 0.8	1100 psi, 9 cm, 9% sucrose
7.2 ± 1.3	1500 psi, 6 cm, 3% sucrose
6.6 ± 1.6	1500 psi, 6 cm, 9% sucrose
9.4 ± 2.6	1500 psi, 9 cm, 3% sucrose
10.1 ± 3.2	1500 psi, 9 cm, 9% sucrose

a



b

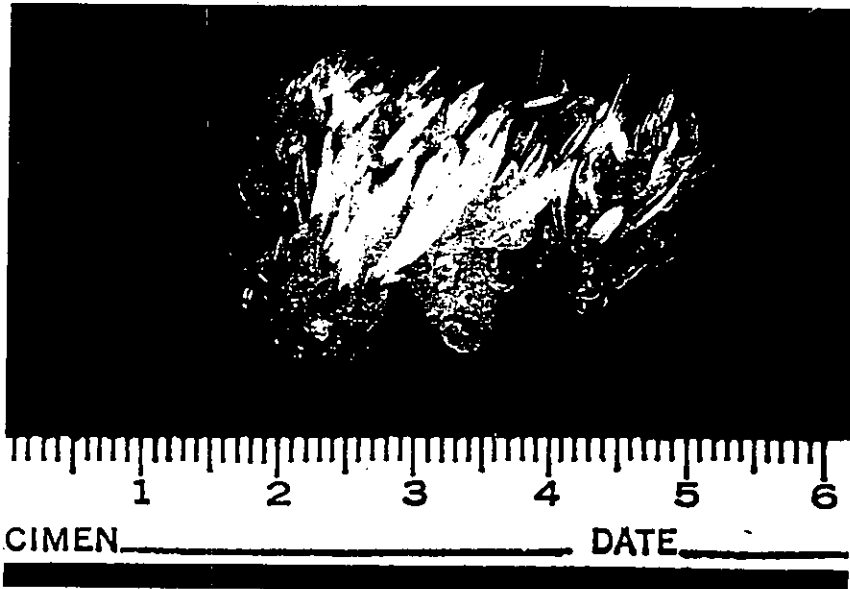
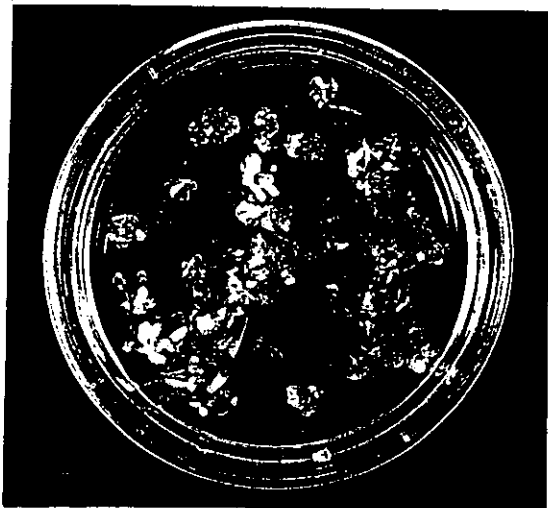


Fig. 1

MS 1 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA
0 mg/l kanamycin



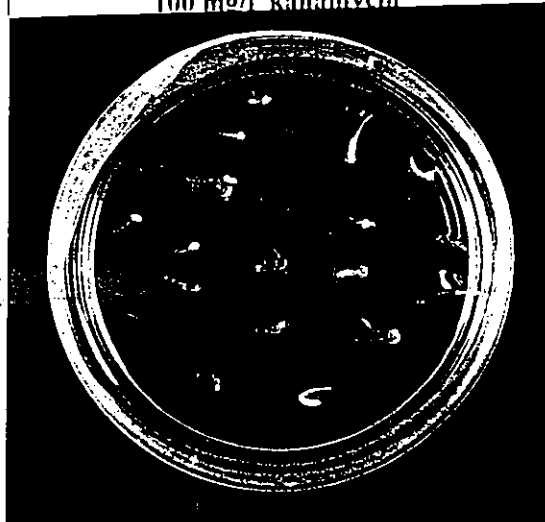
MS 1 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA
50 mg/l kanamycin



MS 1 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA
10 mg/l kanamycin



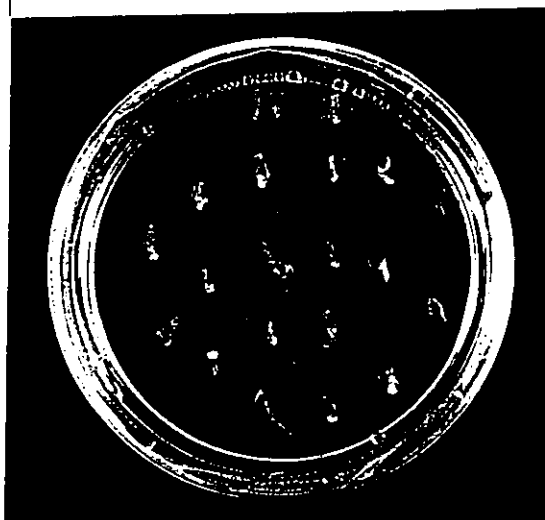
MS 1 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA
100 mg/l kanamycin



MS 1 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA
25 mg/l kanamycin



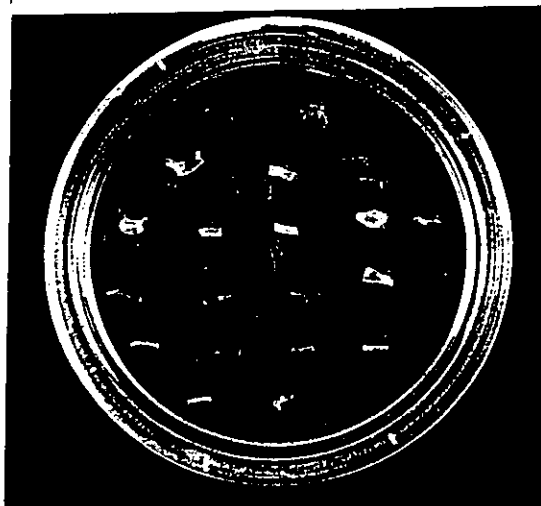
MS 1 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA
200 mg/l kanamycin



MS 1 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA
0 mg/l bialaphos



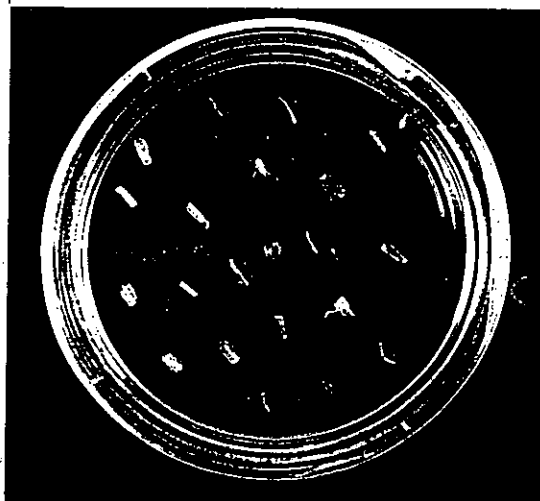
MS 1 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA
2 mg/l bialaphos



MS 1 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA
0.5 mg/l bialaphos



MS 1 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA
4 mg/l bialaphos



MS 1 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA
1 mg/l bialaphos



MS 1 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA
8 mg/l bialaphos

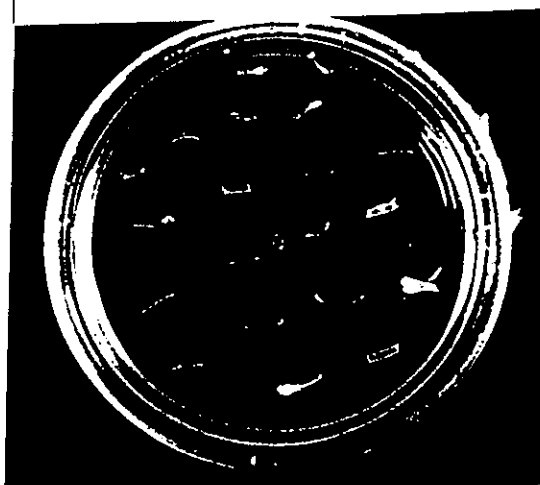


Fig. 2



Fig. 3

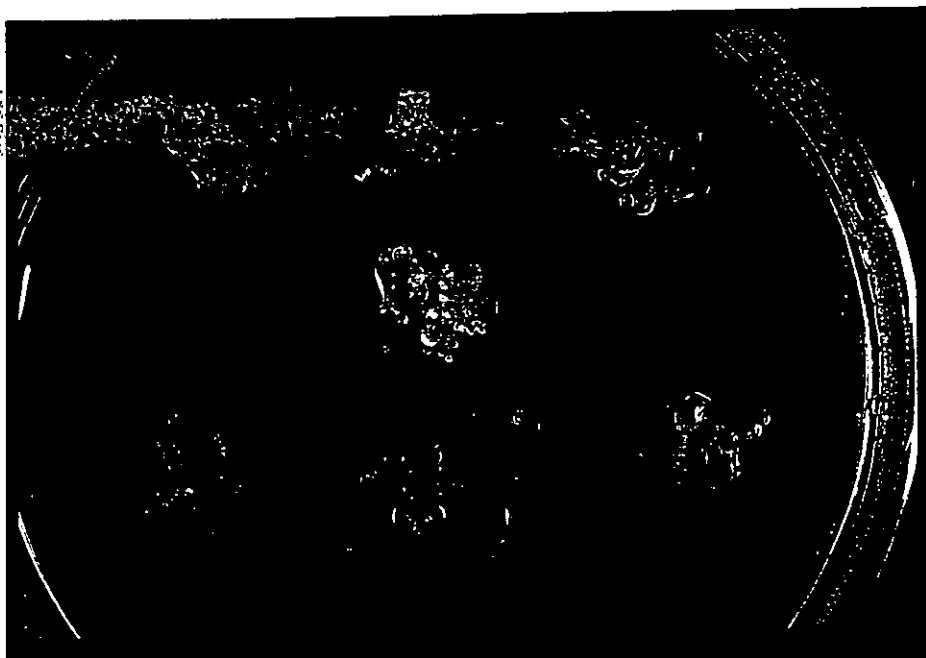


Fig. 4.

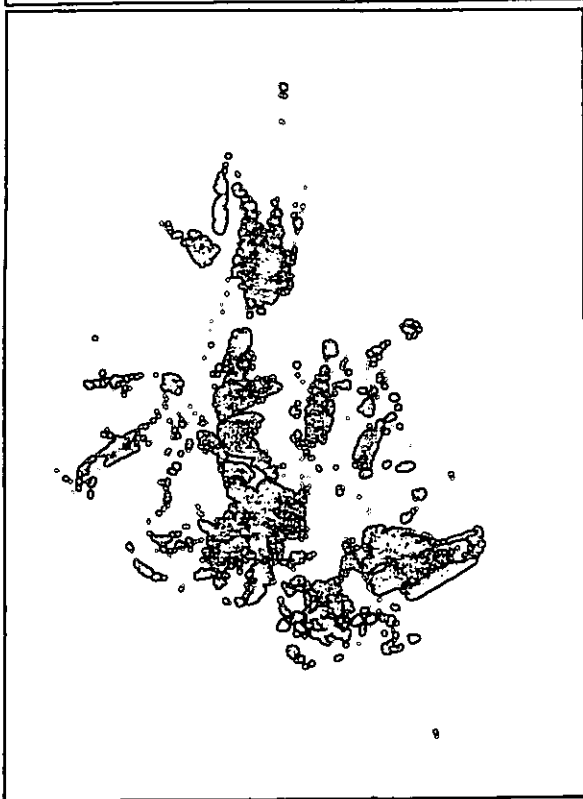
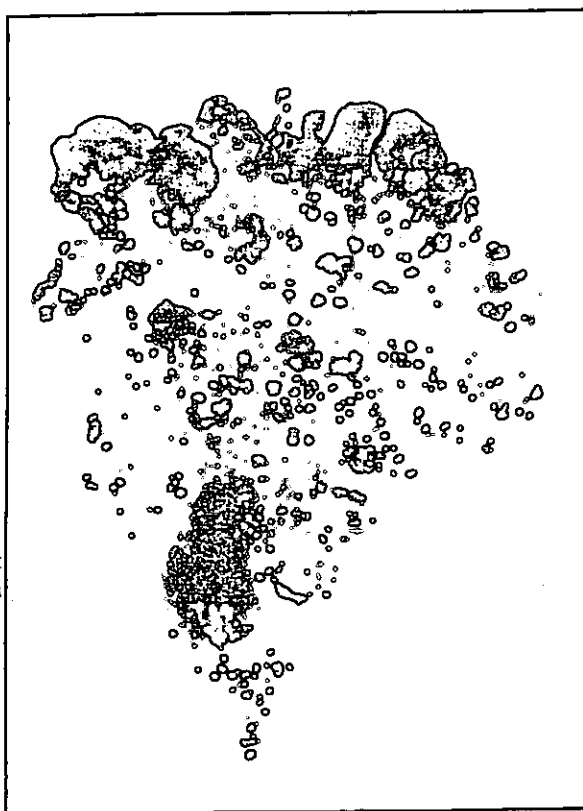


Fig. 5