

204-0345-98

קוד מחקר:

נושא: פיתוח מערכת מוטגנזה בצמחים רב שנתיים בעזרת טרנספוזונים, ממשפחת DS, המייצבים את עצמם

מוסד: מינהל המחקר החקלאי

ד"ר דורון הולנד

חוקר ראשי:

2

חוקרים שותפים:

1996-1998

תקופת מחקר:

מאמרים:

תקציר

הפרוייקט התבצע בשלושה שלבים. מטרתו הראשונה היתה ליצור וקטורים בינריים אשר מכילים אלמנט מסוג DS המסוגל לשנע את עצמו בתוך הצמח. בשלב ב' של העבודה וקטורים אלה "יוחדרו" לתוך צמחים ובשלב ג' תעשה אנאליזה של הצמחים.

הוקטורים שמכילים AC/DS נבנו במהלך 8 חודשי עבודה. זהו וקטור מורכב המצריך שלבים רבים של הנדסה גנטית. רוב הקונסטרוקט נבדק הן ע"י קביעת רצף, אנאליזות רסטריקציה ופעילות פונקציונליות. באמצעות ירי על תרביות תאים.

טרנספורמציה לצמחים - נעשתה טרנספורמציה לצמחי אשכולית מסוג דנקן, לצמחי אראבידופסיס ולצמחי גפן. בהדרים נבדקו הצמחים הן ע"י PCR והן ע"י אנאליזת צבע ל-GUS. באראבידופסיס נעשתה אנאליזה רק ע"י צביעת GUS. בצמחי גפן נעשתה אנאליזה ע"י צביעת GUS.

העברה לעצים - צמחי הדורים טרנסגניים עברו הקשייה ועד כה הורכבו הצמחים על עשרה ענפים. המטרה הסופית היא ליצור 100 צמחים מארועי טרנספומציה בלתי תלויים. בגפן יש עשרות צמחים שנמצאים בתהליכי הקשייה.

מסקנות:

1. יש להמשיך באנאליזות המולקולריות בכדי לעקוב אחרי ארועי הטרנספוזיציה.

2. יש לפתח וקטורים משוכללים יותר לזיהוי ארועי קפיצה.

3. קרוב לודאי שיש ארועי טרנספוזיציה בהדרים ובגפן.



2-DH-1

04 February 1999

פיתוח מערכת מוטגנזה בצמחים רב שנתיים בעזרת טרנספוזונים מהונדסים, ממשפחת DS

המייצבים את עצמם

**Development of transposon mutagenesis in perennials by the use of self  
stabilizing transposon elements**

דורון הולנד, מרכז וולקני, בית דגן, ישראל. VHHOLLAND@VOLCANI.AGRI.IL

אבי פרל, מרכז וולקני, בית דגן, ישראל. VHLPERL@VOLCANI.AGRI.IL

אברהם לוי, מכון ויצמן, מחלקה לגנטיקה של צמחים, רחובות, ישראל –

LPLEVY@WICCMail.WEIZMANN.AC.IL

דו"ח מסכם

מבוא

צבירת מוטציות דומיננטיות בצמחים רב-שנתיים כדוגמת גפן והדרים הינה כלי רב ערך ביכולת להשביח זנים של צמחים אלו בקצב מהיר. אחת האפשרויות ליצור מוטציות בעלות ערך כלכלי הוא באמצעות טרנספוזונים מסוג AC. טרנספוזונים כאלה "קופצים" באופן כמעט אקראי בגנום הצמח וממקמים את עצמם באזורים שונים של הגנום. הוספת מגברים "Enhancers" טרנסקריפציה לאלמנט הקופץ מאפשרת אקטיבציה של גנום ברמת הטרנסקריפציה אם במקרה הטרנספוזון ממוקם בקרבת הגן. באופן זה אפשר לקבל מוטציות דומיננטיות הניתנות לזיהוי כבר ב-  $T_1$  כאשר הצמח במצב הטרנזיגוטי וללא צורך בהכלאה עצמית. מובן שכלי כזה בידי המשביח הוא אמצעי יעיל במיוחד הן ליצירת מוטציות והן לאבחון ולימוד הגנים הקשורים בפנוטיפ. הבעיה עם טרנספוזונים מסוג AC/DS הוא היכולת לשלוט בהם ולמנוע מצב שבו כאשר כבר מושגת מוטציה רצויה היא איננה יציבה.

בעבודה זו אנו בוחנים אפשרות ל"יצב" מוטציות מסוג AC/DS באמצעות יצירת מצב שבו הפרומוטר של הגן האחראי לקפיצה מתנתק ממנו לאחר קפיצה אחת. בעבודה המתוארת להלן נעשה נסיון לאמץ את מערכת הטרנספוזיציה מסוג AC/DS לתוך צמחים עציים במטרה לקבל במהירות יחסית מוטציות רצויות. מוטציות כאלה מעצם טבען הן מוטציות שמסוגלות להשפיע על תכונות כמותיות המבוקרות ע"י מספר גנים. בנוסף, ניתן בקלות יחסית לאפיין ולבודד

את הגן שעבר מוטציה, ללמוד את תפקידו הפיזיולוגי ואת השימוש הפוטנציאלי שלו במערכות אחרות

### פרוט הניסויים שבוצעו

א - בנית וקטור בינארי המכיל את המרכיבים הבאים:

- 1 - טרנספוזזה ללא פרומוטר
- 2 - מגברי טרנסקריפציה "Enhancers"
- 3 - מרקר לעמידות
- 4 - GUS/BAR מרקר לנוכחות Ds
- 5 - פרומוטר דו כיווני
- 6 - mGFP מרקר פלואוריסנציה לארוע קפיצה

ב. טרנספורמציה לצמחים

טרנספורמציה לצמחים בוצעה לצמחי הדרים, גפן ואראבידופסיס. גפן וחדרים מייצגים צמחים רב שנתיים בעלי חשיבות חקלאית. אראבידופסיס מייצג צמח מודל לאנאליזות גנטיות, מולקולריות וכן לבחינת היכולת להשיג מוטציות מכוונות בגישות של סלקציה.

### טרנספורמציה להדרים

בהדרים לא היתה קיימת מערכת טרנספורמציה. הצמח שנבחר הינו אשכולית דנקן

"CITRUS PARADISI". הצמח נבחר בשל יכולתו לפרוח פריחה מוקדמת להערכתנו תכונה זו תאפשר להעריך מוטציות בתקופת זמן קצרה יחסית. במהלך הפרויקט הני"ל פותחה מערכת טרנספורמציה אשר לא היתה קיימת עד עתה לצמחי דנקן. טרנספורמציות בוצעו עם שני סוגים של פלסמידים.

PACG – מכיל טרנספוזון אוטונומי מסוג Ac בין ה- פרומוטר S35 לבין הגן המדווח GUS. אירוע של קפיצה עשוי בעקרון לקרב את הפרומוטר ל- GUS ולהפעילו. הצמחים שיתקבלו יהיו צמחים כחולים.

CONS5 מכיל את הוקטור שתואר בשלב א'.

עד עתה התקבלו מספר צמחים טרנסגניים עמידים לקנמיצין. במבחן GUS של צמחים אלו התקבלו תוצאות חיוביות לכ- 4 צמחים. מתוך צמחים אלו שניים החזיקו מעמד בתנאי הקשיה. מופע GUS בצמחים הני"ל הוא מאוד שונה בין שני הצמחים. בעוד שבצמח אחד העלים מכוסים בנקודות כחולות בצמח השני כל העלה כחול אם כי באופן סקטוריאלי.

בדיקת GUS חוזרת שנעשתה מדי מספר חדשים והתוצאות היו די דומות. לאחר כ- 5 חודשים הורכבו הצמחים ע"ג כנות של דנקן והתקבלו עציצים מפותחים של הצמחים הטרנסגניים. בדיקת GUS לעלים נתנה תוצאות חיוביות. לאחר כשנה בערך, הורכבו ענפים קטנים מהעציצים ע"ג כנות של תלת עלה במטרה ליצור צמחים של ממש. עד עתה יש בידינו כ- 10 הרכבות על כנות של תלת עלה. הצמחים אמורים לפרוח בתחילת מרץ. בכוונתנו להרכיב עוד כ- 6-10 צמחים ולקבל בערך כ- 10-15 צמחים מכל ארוע טרנספורמציה. עלים של הצמחים יבדקו בדיקות מולקולריות אשר מיועדות לבחון את השאלות הבאות:

א. האם היה ארוע של קפיצה בצמחים הנ"ל? בדיקה זו תעשה באמצעות PCR ו-SOUTHERN. יש לציין שהצמחים הראשונים כבר נבדקו פעם אחת בראקציה של PCR. אנאליזות ב-PCR נעשו עם הפריימרים הבאים:

פריימר 1 - יוצא מכיוון פרומוטר 355 לכיוון קצה 3'. פריימר 2 - יוצא מקצה 5' של הגן המקודד ל-GUS לכיוון 5'. תוצאות ה-PCR הראו שהיה ארוע של קפיצה בצמחים נושאי PACB.

ב. מה התדירות הקפיצית בעלים והאם המריסטמות עדיין מכילות טרנספוזונים?

ג. האם הקפיצות מפוזרות אקראית בגנום או שהן קרובות יותר לאתר החדירה הראשוני?

סעיפים ב-1 ג-עדיין לא נבדקו ואני ממתין למספר מספיק של צמחים. במקביל לניסויים הנ"ל נעשו גם טרנספורמציות עם CONST.5. התגלה שיש בעיה ביעילות הטרנספורמציות עם הפלסמיד הנ"ל לצמחי הדר. עד עתה ביצענו טרנספורמציה לכמה אלפי פרגמנטים של הדרים. מתוך הרבה צמחים עמידים לקנמיצין הצלחנו לקבל רק שני צמחים חיוביים ל-GUS. זוהי יעילות מאוד נמוכה ומחייבת שיפור בשיטות הטרנספורמציה. הצמח ששרד את תנאי ההקשיה הורכב ע"ג כנת דנקן ובחדשים הקרובים יורכב על תלת עלה לקבלת מספר צמחים. במקביל נעשים ניסיונות לשפר את שיטת הטרנספורמציה ולהגדיל את מספר הצמחים הטרנסגניים. השאלות שניתן כעת לשאול הן: א. האם היו ארועי טרנספוזיציה בצמח שעבר טרנספורמציה? ב. האם כצפוי, יכולת הטרנספוזיציה אבדה לאחר הארוע הראשוני של הקפיצה? אנליזות מולקולריות לברור שאלות אלה עדיין לא נעשו. אנליזות אלה יעשו מיד עם חזרתו הצפויה של דורון הולנד בספטמבר 99.

#### טרנספורמציה לצמחי גפן

טרנספורמציה לגפן החלה להעשות בצורה מסודרת לפני מספר חדשים. פיתוח מערכת הטרנספורמציה לגפן וטרנספורמציה עם CONST.5 נעשו באחריותו של דר' אביחי פרל. פיתוח מערכת הטרנספורמציה לגפן איננו חלק אינטגרלי מתכנית זו ונעשה בצורה בלתי תלויה לפרויקט זה.

טרנספורמציה לגפן מראה שיעילות הטרנספורמציה בגפן היא טובה. התקבלו עד עתה כמה עשרות של צמחי גפן טרנסגניים. אנליזות GUS לצמחים מראה שהצמחים חייבים ל-GUS. כעת נמצאים הצמחים בשלבי הקשיה שונים. כאשר יתקבלו עציצים מוקשחים יוחל באנליזות מולקולריות של גפן כפי שפורט לגבי הדרים. נראה שמבחינת טרנספורמציה, מערכת הגפן היא המערכת הרב שנתית היותר יעילה.

#### סיכום טרנספורמציה לרב שנתיים

עד עתה התקבלו צמחים טרנסגניים בהדרים ובגפן. בהדרים יש כבר צמחים מוקשחים שניתן לבצע איתם ניסויים מולקולריים. בגפן הצמחים עדין בהקשיה. כל הצמחים חיוביים ל-GUS. לא נבדקה עדין עמידות ל-BASTA למרות שהגן המקודד ל-GUS ול-GUS ול-BASTA. זהים ב-CONST.5.

מערכת הטרנספורמציה בהדרים עדין לא יעילה ואיננה מאפשרת קבלת מספר גדול של צמחים מארועים בלתי תלויים של טרנספורמציה. לעומת הדרים מערכת הטרנספורמציה לגפן מאוד יעילה וסביר להניח שבעתיד הלא רחוק ניתן יהיה להשיג מספר של כמה מאות צמחים טרנסגניים נושאי CONST.5.

כל הצמחים – הדרים וגפן, יגודלו לשלב מתן פירות. מעקב אחרי הצמחים והפנוטיפים שלהן יתבצע באופן שוטף. אנליזות מולקולריות יאפשרו לזהות ענפים שבהם לא היו ארועי קפיצה או ענפים שבהם היו ארועי קפיצה שלא גרמו למוטציות מענינות. ענפים אלה ייגזמו ותעודד יצירת פקעים חדשים ממריסטמות אשר בהן לא היה עדיין ארוע קפיצה. באופן זה אפשר יהיה להשתמש במספר מצומצם של צמחים כ-100-20 מהדרים או מגפן לסריקה של מוטציות.

#### טרנספורמציה לאראבידופסיס

טרנספורמציה לאראבידופסיס נעשתה למטרות הבאות: א. בחינה מהירה האם CONST.5 נושא טרנספוזון פעיל. ב. האם ארועי הטרנספורמציה הם חד פעמיים כרצוי וכמצופה? ג. יצירת מספר גדול של צמחים טרנסגניים במטרה לבחון את מידת היכולת לקבל מוטציות רצויות למטרות של מחקר בסיסי. התברר ש-CONST.5 יעיל לטרנספורמציה באראבידופסיס. עד עתה התקבלו כ-200 צמחים טרנסגניים. חלק מצמחים אלה נבדק ל-GUS ונמצא חיובי. למרבה ההפתעה יש וריאביליות גדולה בצביעת GUS בין הצמחים השונים כמו כן הפנוטיפ של הצמחים מראה שונות מפתיעה שונות כזו לא נמצאה בטרנספורמציה עם פלסמידים אחרים. לא ברורה עדין סיבת השונות הגדולה הן במופע ה-GUS והן כפנוטיפ של הצמחים.

בתחילת הניסויים, טרנספורמציה נעשתה באמצעות סלקציה ע"ג קנמיצין. זוהי שיטה עתירת עבודה. לפיכך נבדקה סלקציה באמצעות BASTA. פותחה שיטה מהירה לסלקציה של מס' מילוני זרעים והשיטה עובדת היטב. באמצעות ריסוס ב-BASTA בודדו כ-100 צמחים טרנסגניים בתוך תקופה דו קצרה. אנליזות מולקולריות של הצמחים עדיין לא בוצעו.

### סיכום ביניים של הפרוייקט

יש בידינו הוכחות ראשוניות לטרנספוזיציות בהדרים. עדין לא ברור האם CONST.5 מאפשר טרנספוזיציות מיוצבות ודרושות אנליזות גנטיות ומולקולריות לבירור שאלות אלה. מערכת הטרנספורמציה לגפן יעילה יותר ומערכת ההדרים מצריכה שיפור יסודי ביעילות הטרנספוזיציות. כבר עתה ברור ש-GFP איננו יכול לשמש מרקר טוב לאירועי קפיצה. בחינת פעולות GPP ב-20 צמחי אראבידופסיס לא הראתה כל פעילות באף אחד מהצמחים. רצוי למצוא מרקרים אחרים לאירועי קפיצה. לפי הצעתו של דר' אבי לוי הגן KNOTED-1 יכול לשמש מרקר כזה. ביטוי אקטיבי של KNOTED1 בעלים של עגבניה יוצר פנוטיפ אפייני וקל לזיהוי. יש בידינו גן ממשפחה זו מעגבניה ובכוונתנו לבדוק את יעילותו כמחקר לטרנספוזיציה.

2-dh-2

12 ינואר 1999

סיכום

1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.  
רוב מטרת העבודה הראשונה הושגו. נעשתה טרנספורמציה לצמחי גפן והדרים, אובחנו ארועי טרנספוזיציה בצמחים, נוצרו עצים טרנסגניים המכילים טרנספוזונים. לא בוצעו כל האנליזות המולקולריות הדרושות.
2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהוגשו התקופה אליה מתייחס הדו"ח.  
א. יצירת וקטורים עם טרנספוזונים Ac/DS המייצבים את עצמם. ב. טרנספורמציה גפן והדרים. ג. הוכחת ראשונה לקיים טרנספורזיציה בהדרים. ד. הרכבת הצמחים הטרנסגניים על עצים. ה. בשנים הבאות צפויה בקרת איכות הזנים החדשים.
3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו.  
א. טרנספורמציה של Ac/DS אפשרות בהדרים.  
ב. יצירת מוטציות בהדרים באמצעות טרנספוזונים צפויה במהלך התקופה הקרובה.
4. הבעיות שנתרו לפתרון ו/או השינויים במהלך העבודה.  
א. הצעת מחקרים הלוך לאבחון לארועי טרנספוזיציה.  
ב. שיפור תדירות הטרנספורמציה.
5. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח.  
לא הופץ הידע הזו עדין בשום צורה שהיא.