



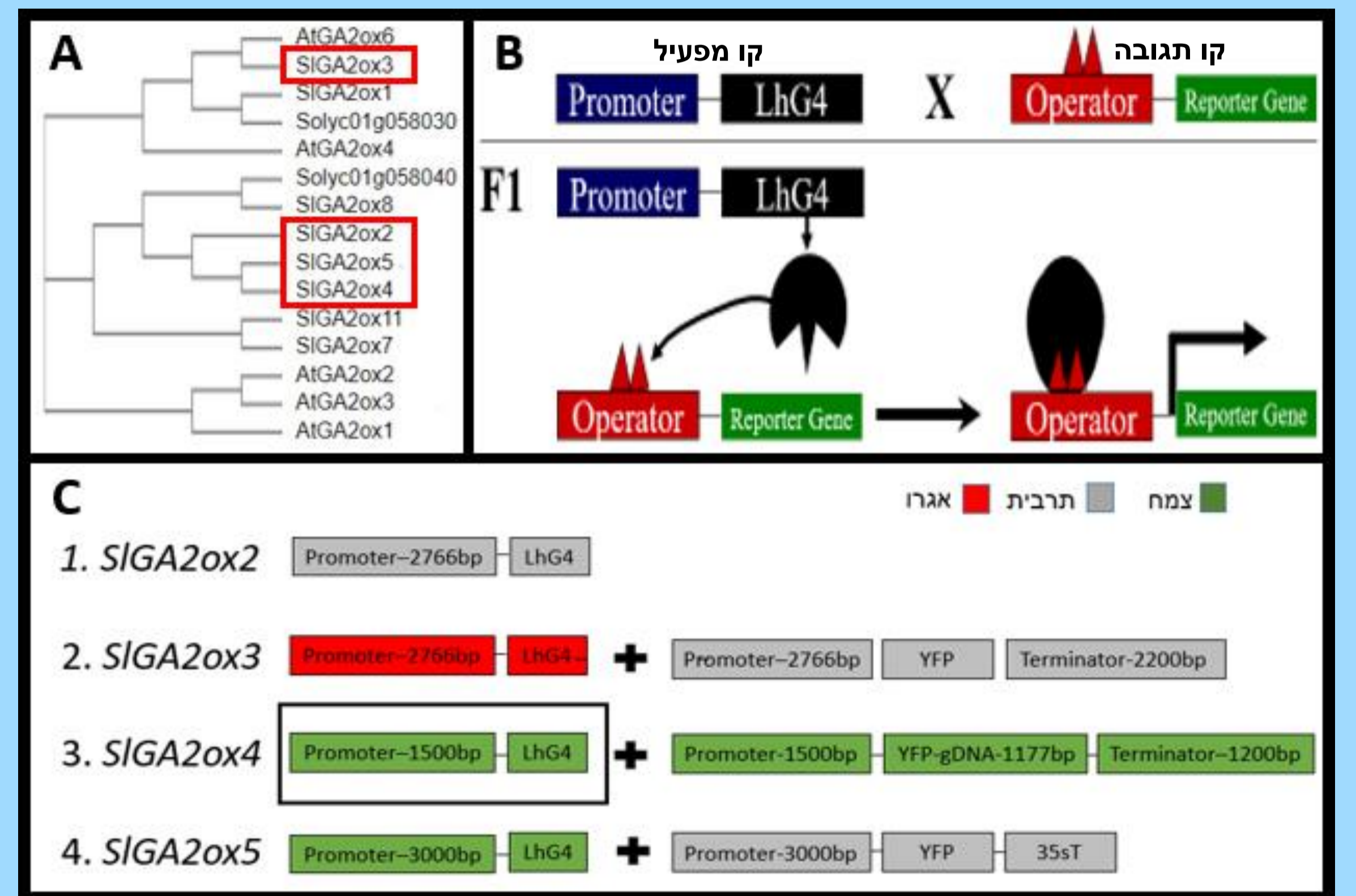
## תקציר

עלים מספקים לצמח את האנרגיה הדרושה לקיומו באמצעות פוטוסינתזה, ולכן הם בעלי חשיבות רבה לכלל מחזור החיים בטבע. גודל וצורת עלים הן תכונות מגוונות ביותר בטבע, המאפשרות התאמה לתנאי סביבה שונים. עלה העגבנייה (*Solanum lycopersicum*) הוא בעל צורה מורכבת ובנוי מעלעלים נפרדים המחוברים ביניהם על ידי מבנה דמוי גבעול. ההורמון הצמחי אוקסין מעודד יצירה של עלעלים, אך טרם ברור המנגנון המולקולרי דרכו אוקסין מבקר את התהליך. ניסויים קודמים במעבדה הראו כי אוקסין מעודד ביטוי של מספר גנים ממשפחת *GA2ox* (*GA2ox*), המקודדים לאנזימים מפרקי ההורמון ג'יברלין (*GA*). תוצאות אלה הובילו אותנו להיפותזה שאוקסין מעודד יצירת עלעלים על ידי פירוק ההורמון ג'יברלין, בעזרת עידוד ביטוי *GA2ox*. מטרת עבודה זו הייתה לחקור את הבקרה על הביטוי של מספר גנים ממשפחת ה *SIGA2ox* בעגבנייה. כדי לבחון היכן הגנים ממשפחת ה *SIGA2ox* מתבטאים יצרתי ואפיינתי צמחים טרנסגניים המבטאים חלבון פלואורסנטי (YFP) תחת בקרת הפרומוטרים של הגנים. מצאתי, כי הפרומוטר של *SIGA2ox4* מכוון ביטוי בנקודות יציאת איברים לאורך התפתחות הצמח, כגון נקודות יציאת שורשים צדדיים, עלים ועלעלים, וכן בצלקת הפרח. על מנת להבין את הבקרה על הביטוי הספציפי של הגנים ממשפחת ה *SIGA2ox*, יצרנו מוטציות בפרומוטר של הגן *SIGA2ox5* בעזרת עריכה גנומית בטכנולוגיית ה CRISPR/Cas9. התקבלו מוטציות באזורים שונים בפרומוטר. להמשך האפיון, יצרתי קווים הומולוגיים ("מקובעים") ל 3 אללים שונים עם מוטציות בפרומוטר. אפיון הביטוי של הגן *SIGA2ox5* בקווים אלה לעומת מין הבר בעזרת אנליזת qRT-PCR העלה, שהמוטציות השונות בפרומוטר גורמות לירידה בביטוי הגן, ובחלק מהמקרים לשינוי בתגובת הגן להורמון ג'יברלין. התוצאות מצביעות על כך שהגנים *SIGA2ox4*, *SIGA2ox5* מתבטאים באזורי יציאה של איברים. סביר שישנם אזורי בקרה נוספים המתווכים את העלייה בביטויים בתגובה לאוקסין וג'יברלין. התוצאות תומכות בתפקיד מרכזי לפירוק ג'יברלין בתיווך יצירת איברים על ידי אוקסין.

**מטרת המחקר:** אפיון גנים ממשפחת ה *SIGA2ox* והקשר שלהם בתיווך סיגנל האוקסין בבקרת היצירה והגדילה של העלעלים בשולי עלה העגבנייה. **מטרות ספציפיות:** 1. אפיון ביטוי פרומוטרים של גנים ממשפחת ה *SIGA2ox*. 2. בחינת אזורי בקרה חשובים לביטוי גנים ממשפחת ה *SIGA2ox*.

## תוצאות

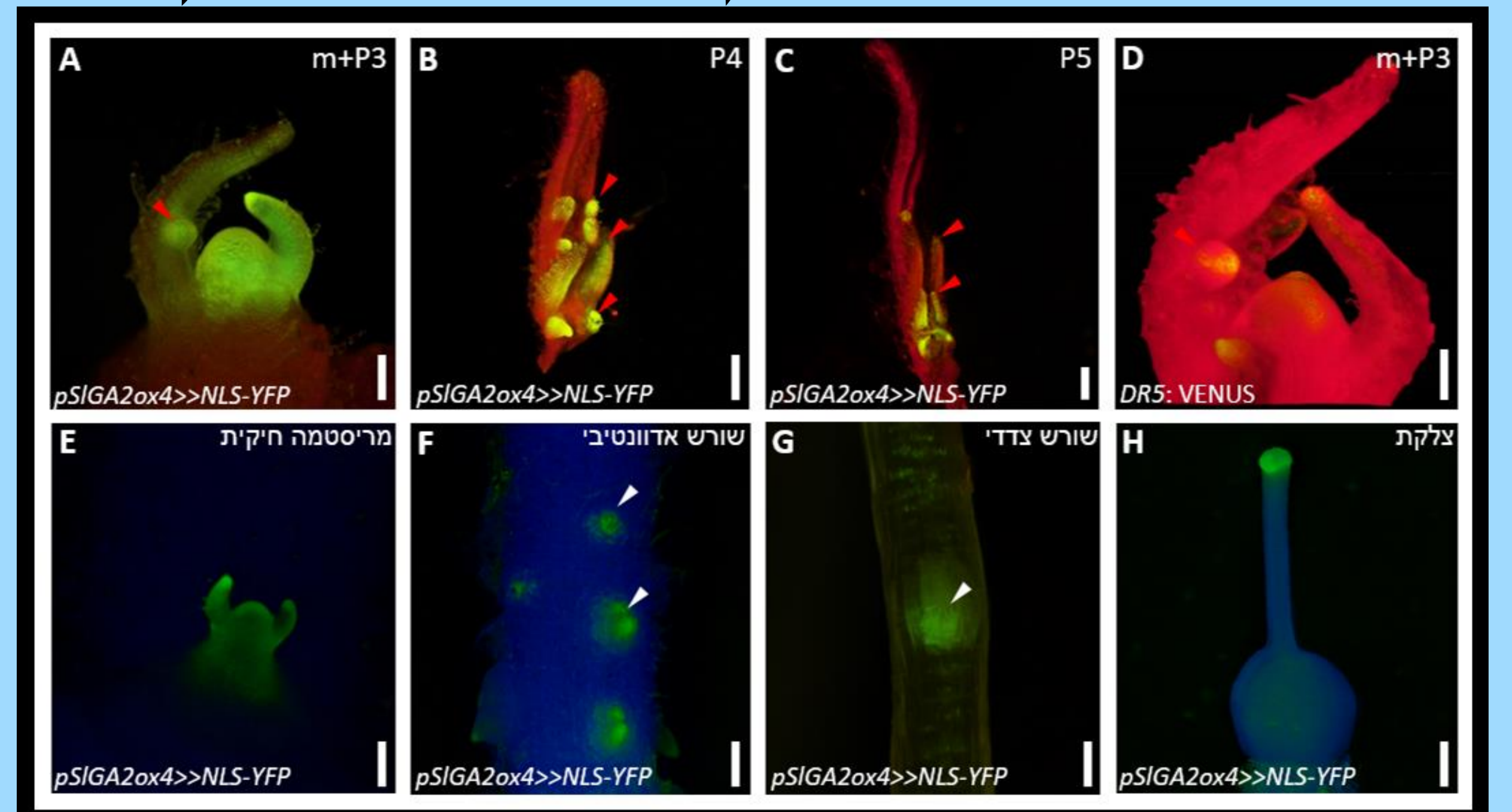
### 1. שיבוט פרומוטרים של גנים ממשפחת ה *SIGA2ox*



איור 1

לצורך אפיון מיקום ביטוי גנים ממשפחת ה *SIGA2ox*, שיבטתי אזורי בקרה במעלה הזרם לתחילת השעתוק ויצרתי קונסטרוקטים לביטוי גן מדווח תחת בקרת אזורי בקרה אלה. (A) עץ פילוגנטי של משפחת החלבונים GA2OX מעגבנייה ואריבדופסיס. בניית העץ והשוואת רצפי חומצות האמינו של החלבונים בוצעה על ידי הכלי האינטרנטי Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). עבור הגנים מסומנים במלבן אדום שובטו אזורי בקרה לאפיון הביטוי. (B) תיאור סכמטי של מערכת הטרנס-אקטיבציה. פקטור השיתופי LhG4, מכיר ספציפית את רצף ה Operator (OP) אך לא רצפים אחרים בצמח. כתוצאה מכך הכלאה בין קו מפעיל לקו תגובה מאפשרת ביטוי ספציפי של הגן תחת בקרת הפרומוטר שנבחר. בעבודה זו יצרתי קווים מפעילים עם הפרומוטרים של גנים ממשפחת ה *GA2ox* (*promoter: LhG4*). (C) הקונסטרוקטים הנמצאים בשלבים שונים של טרנספורמציה לצמחים ואפיון לפי המפתח הבא: ירוק – יצאו צמחים מתרבות רקמה, אפור – הקונסטרוקט בתרבות רקמה, ואדום – הקונסטרוקט מוכן לטרנספורמציה באגרובקטריום. צמחי *pSIGA2ox4: LhG4* הוכנו כחלק מעבודת הדוקטורט של אלון ישראלי.

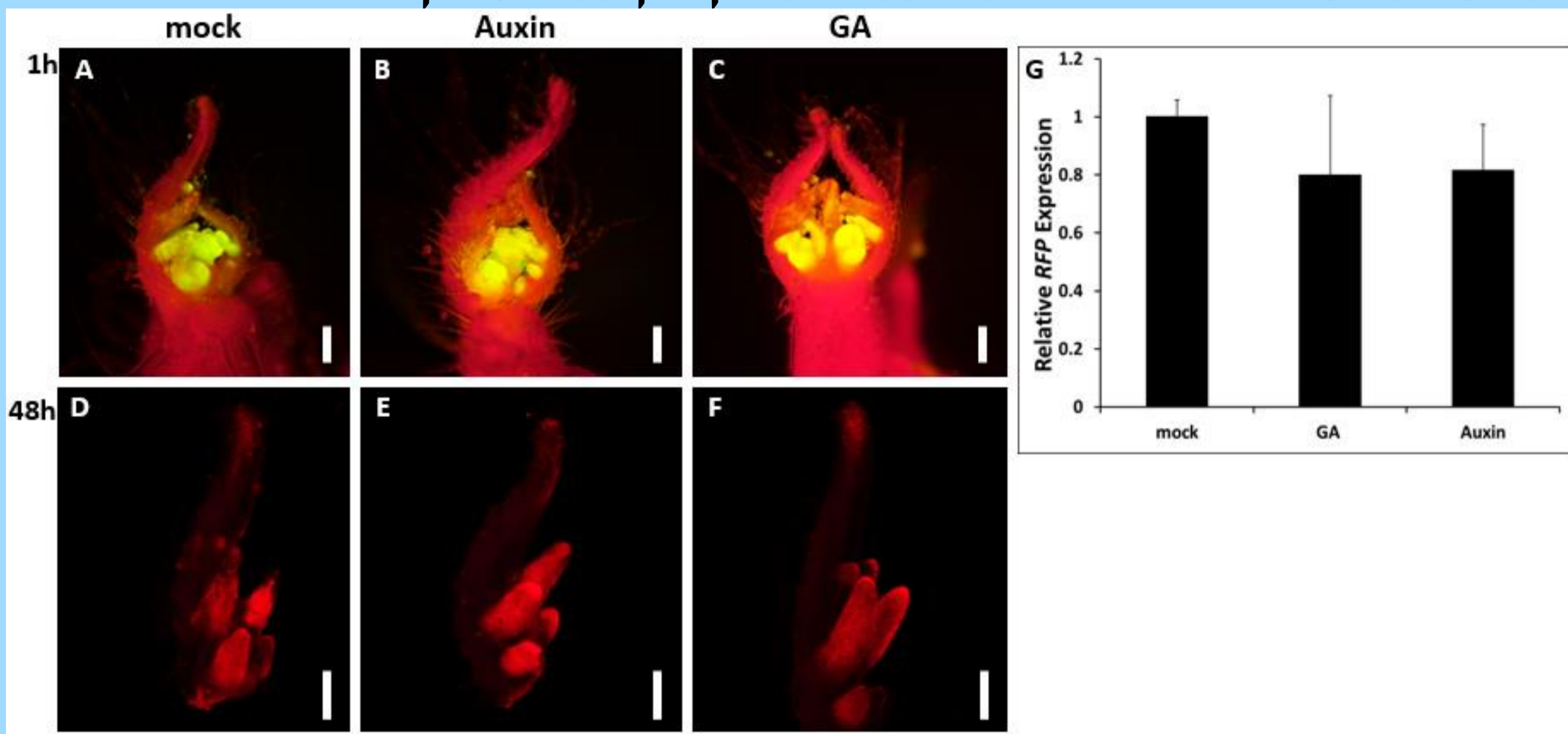
### 2. פרומוטר *SIGA2ox4* מתבטא בנקודות יציאת איברים לאורך הצמח



איור 2

מוצגות תמונות של ביטוי YFP בצמחים. YFP נראה בצהוב/ירוק על רקע הרקמה. סימון: חץ אדום - נקי אינציאציה של עלעל, חץ לבן - נקי אינציאציה של שורש. (A-C) ביטוי הפרומוטר בפרימורדיות העלים, P מציינ את גיל העלה ביחס למריסטמה, כך ש P1 הוא העלה הצעיר ביותר, P2 נוצר לפניו וכן הלאה. כלומר קיימים שלושה עלים צעירים מ P4. m מציינ מריסטמה. (D) דפוס הביטוי של סמן התגובה לאוקסין *DR5* (צילום אלון ישראלי). ניתן לראות ביטוי דומה של *DR5* ושל הפרומוטר *SIGA2ox4*. (E-H) ביטוי הפרומוטר ברקמות המצוינות. קנה מידה: סמן הגודל בתמונות A-E מציינ 200µm, ובתמונות F-H 1mm.

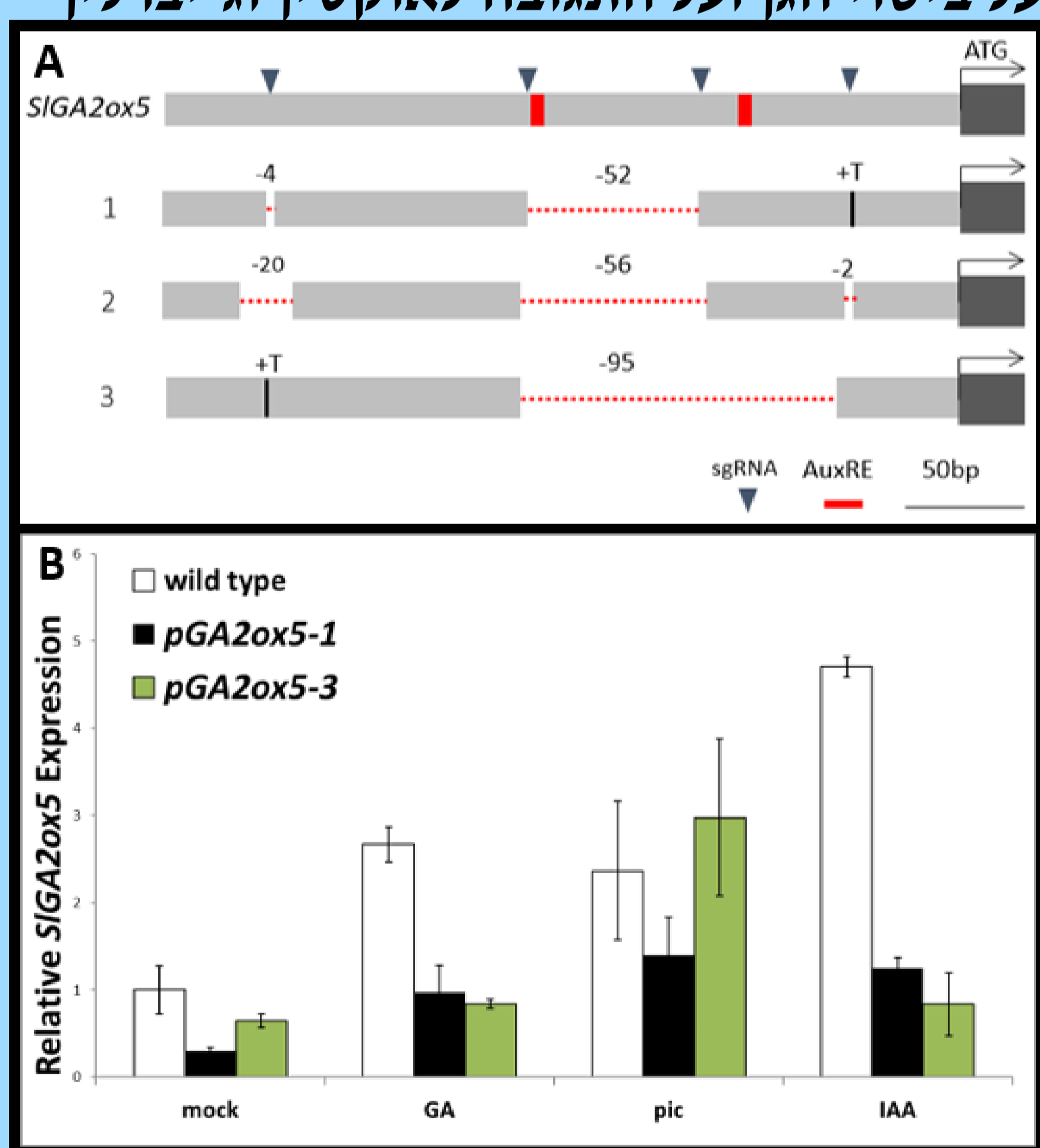
### 3. פרומוטר *SIGA2ox4* לא מגיב לאוקסין וג'יברלין



איור 3

(A-C) מריסטמה עם עלה P4 של הקונסטרוקט *pSIGA2ox4>>NLS-YFP*, שעה לאחר הטיפולים המצוינים. *YFP* נראה בצהוב על רקע הרקמה. (D-F) עלה P4 של הקונסטרוקט *pSIGA2ox4>>NLS-RFP*, 48 שעות לאחר הטיפולים. *RFP* נראה באדום בהיר על רקע כהה. קנה מידה A-F: 200µm. (G) ביטוי הגן *RFP* בשלושת הטיפולים ביחס לגן הביקורת *EXP*. הרקמה נאספה שעה לאחר הטיפולים. קווי השגיאה מסמנים שגיאות תקן של 3 חזרות ביולוגיות, אשר כל אחת הכילה לפחות 5 קדקודים. ריכוז ההורמונים בטיפולים: ג'יברלין (GA) 100µM, אוקסין 1µM ומים כביקורת (mock).

### 4. מוטציות בפרומוטר *SIGA2ox5* משפיעות על ביטוי הגן ועל התגובה לאוקסין וג'יברלין



איור 4

(A) בשורה העליונה מוצג איור של פרומוטר *SIGA2ox5*. ראשי חץ מציינים את מיקוי ה sgRNA במערכת ה CRISPR/Cas9. קווים אדומים מציינים מיקום של רצפים החשודים כרצפים המגיבים לאוקסין (AuxRE). בשלוש השורות התחתונות מוצג מיקום ואופי המוטציות בפרומוטר בשלושת האללים שאופיינו. סימונים: אפור בהיר - רצף הפרומוטר, אפור כהה - תחילת שיעתוק, קו אדום מקוקו-אזור שנמחק, קו שחור - תוספת, המספרים מציינים את גודל המחיקה/תוספת. (B) ביטוי הגן *SIGA2ox5* במין הבר ובאללים 1 ו 3, ביחס לגן הביקורת *EXP*. הרקמה נאספה שעה לאחר הטיפולים. Picloram (pic) ו IAA הם שתי צורות אוקסין, סנטטית וטבעית. ריכוז ההורמונים שטופלו: GA 100µM, pic 1µM, IAA 200µM ומים כביקורת (mock). קווי השגיאה מסמנים שגיאות תקן של 3 חזרות ביולוגיות, אשר כל אחת הכילה לפחות 5 קדקודים.

## סיכום

1. הפרומוטר של הגן *SIGA2ox4* מתבטא באזורי יציאת איברים לאורך הצמח.
  2. אזור הבקרה של הגן *SIGA2ox4* ששובט לא מגיב לאוקסין וג'יברלין. יתכן שיש לבדוק זמני טיפול נוספים, וייתכן שהתגובה מבוקרת על ידי אזורים שלא נבדקו.
  3. מוטציות בפרומוטר של הגן *SIGA2ox5* הביאו לירידה בביטוי.
  4. יש תגובה דיפרנציאלית לאוקסינים שונים וג'יברלין במוטנטים השונים של פרומוטר הגן *SIGA2ox5*.
- לסיכום התוצאות תומכות בתפקיד מרכזי לפירוק ג'יברלין בתיווך יצירת איברים על ידי אוקסין.