

## תקציר

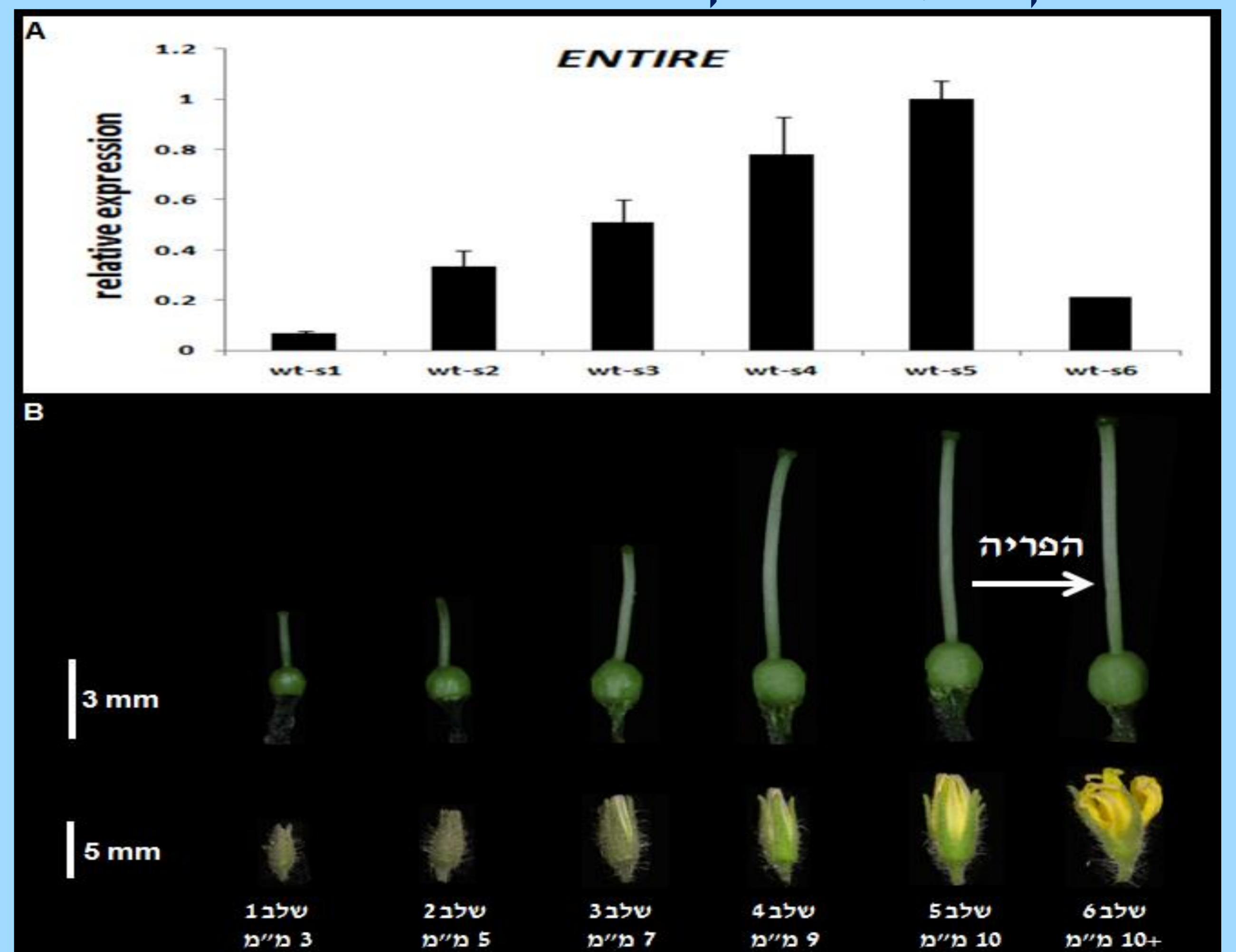
חנטה, היווצרות הפרי משחלת הפרח, היא תהליך מבוקר מאד, המאפיין את הצמחים הפורחים. הפרי מספק בין היתר סביבה מוגנת להתפתחות הזרעים. באופן נורמאלי, החנטה והתפתחות הפרי תלויות בהפריה, ומבוקרות בין היתר על ידי ההורמונים אוקסין וג'יברלין. הגן *ENTIRE* (*E*) מעגבנייה מקודד למעבב של סיגנל האוקסין. כתוצאה ממוטציה בגן *E* מתפתחים עלים פשוטים מאוד ביחס לעלים המורכבים של צמח הבר ופירות פרתנוקרפיים. בפירות אלו מופר הצימוד בין ההפריה והתפתחות הפרי, כך שהשחלה מתפתחת לפני גס בהיעדר האבקה והפריה. מטרת המחקר הייתה להבין את מעורבות הגן *E* בתהליך התפתחות הפרי, וכיצד מופר הצימוד בין ההפריה להתפתחות הפרי במוטנט *entire* (*e*). כדי לבחון היכן *E* פועל, ייצרתי צמחים טרנסגנים המבטאים את החלבון הפלואורסנטי (YFP) תחת בקרת הפרומוטר האנדוגני של הגן *E*. מצאתי, כי בעלים הפרומוטר מתבטא באזורי גבול בין העללים, ובפרחים הוא מתבטא בביציות שבשחלה. אנליזת qRT-PCR העלתה, כי ביטוי הגן *E* עולה במהלך התפתחות הפרח ומגיע לשיא בזמן פתיחת הפרח (אנתזיס) ויורד לאחר ההפריה. כדי להבין את תפקיד *E* בהתפתחות הפרי, אפיינתי את פירות המוטנט *e* בהשוואה לפירות מין הבר. מצאתי כי בהשוואה למין הבר, הפירות של *e* ארוכים יותר, בעלי תכולת סוכר גבוהה יותר ו pH נמוך יותר. על מנת להבין את המנגנון המולקולארי שמתווך את פעילות *E*, השווייתי את פרופיל ביטוי הגנים בשחלות צעירות בין צמחי מין הבר, באמצעות ניסוי RNA-seq. ניתוח התוצאות זיהיתי שני גנים המקודדים לפקטורי שעתוק ממשפחת ה *MYB*, המתבטאים ספציפית בשחלות ושיבטויים עלה מאוד בשחלות *e* בהשוואה למין הבר. אנליזת ביטוי של אחד מגנים אלה העלתה, כי הוא מתבטא בביציות ובצללקת, ושיבטוי מתגבר לאורך התפתחות השחלה. התוצאות מצביעות על תפקיד מרכזי של *E* בהתפתחות הפרי, ועל מעורבות אפשרית של פקטורי שעתוק ממשפחת ה *MYB* בתיווך פעילות זו במורד הזרם לאוקסין.

**מטרת המחקר:** הבנת הגורמים הגנטיים והמולקולאריים שמתווכים את סיגנל האוקסין בהתפתחות שחלת הפרח לפרי.

**מטרות ספציפיות:** 1. לאפיין את ביטוי הגן *E* והפרומוטר שלו. 2. לאפיין את השפעת המוטציה *e* על התפתחות הפרח והפרי. 3. למצוא גני מטרה במסלול של *E* בהתפתחות הפרח.

## תוצאות

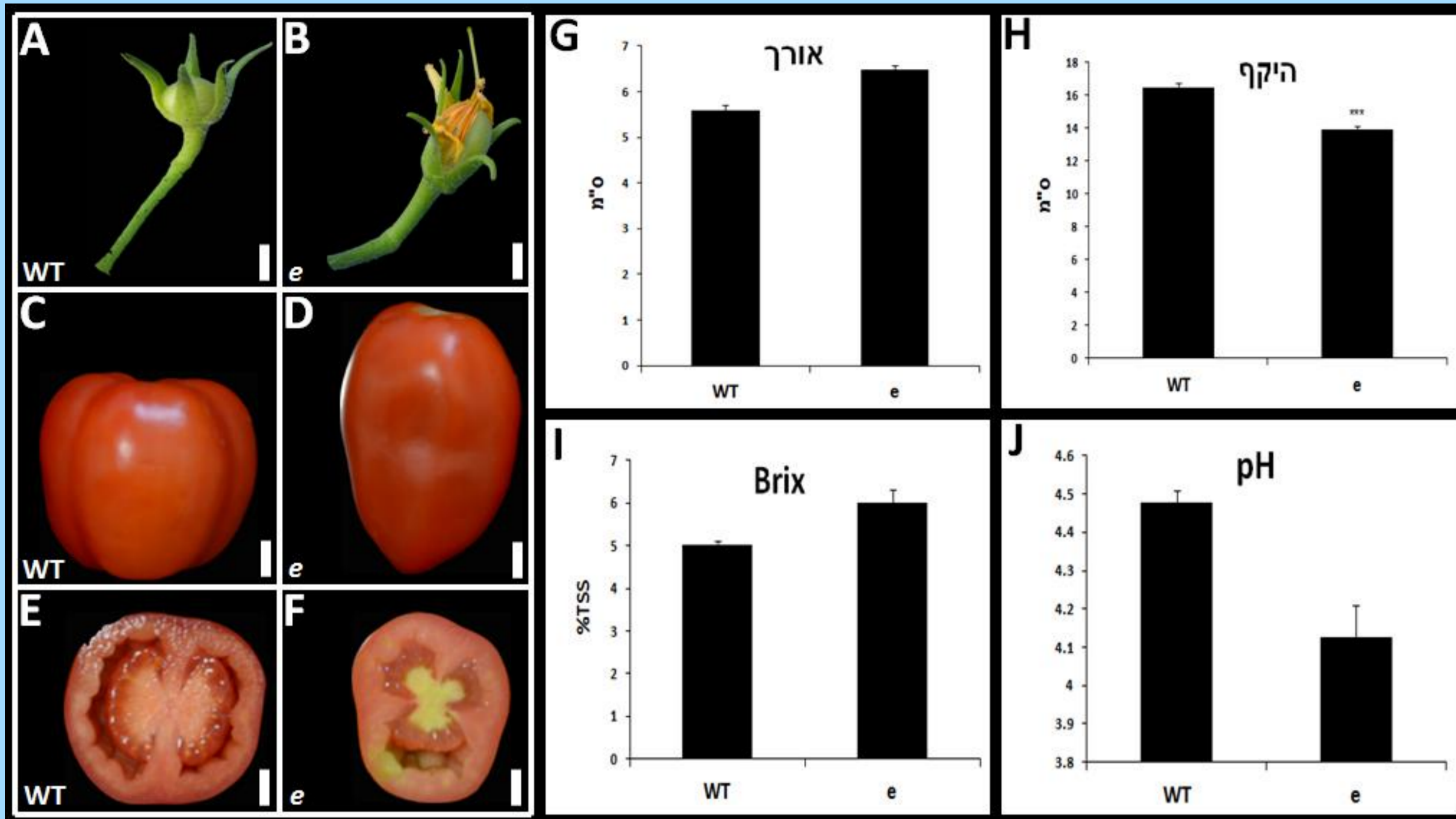
### ביטוי הגן *E* עולה במהלך התפתחות הפרח ויורד לאחר ההפריה



איור 1

A - ביטוי הגן *E* בשלבי התפתחות הפרח במין הבר. הביטוי נבחן באמצעות qRT-PCR. עבור כל שלב, נאספו לפחות 5 חזרות ביולוגיות, כאשר בכל חזרה היו לפחות 3 שחלות. קווי שגיאה מסמנים שגיאות תקן. B - שלבי התפתחות הפרח במין הבר, בהתאם לשלב בגרף. לגבי כל שלב, מוצגים בחלק התחתון שלב ואורך שחלה ועלי, מעליו צילום פרח, ומעליו צילום שחלה עם עמוד העלי. שלב 5 מייצג את יום פתיחת הפרח (אנתזיס) ושלב 6 מייצג שחלה לאחר האבקה והפריה. ניתן לראות כי ביטוי *E* עולה בהדרגה עד לאנתזיס, ויורד לאחר ההפריה.

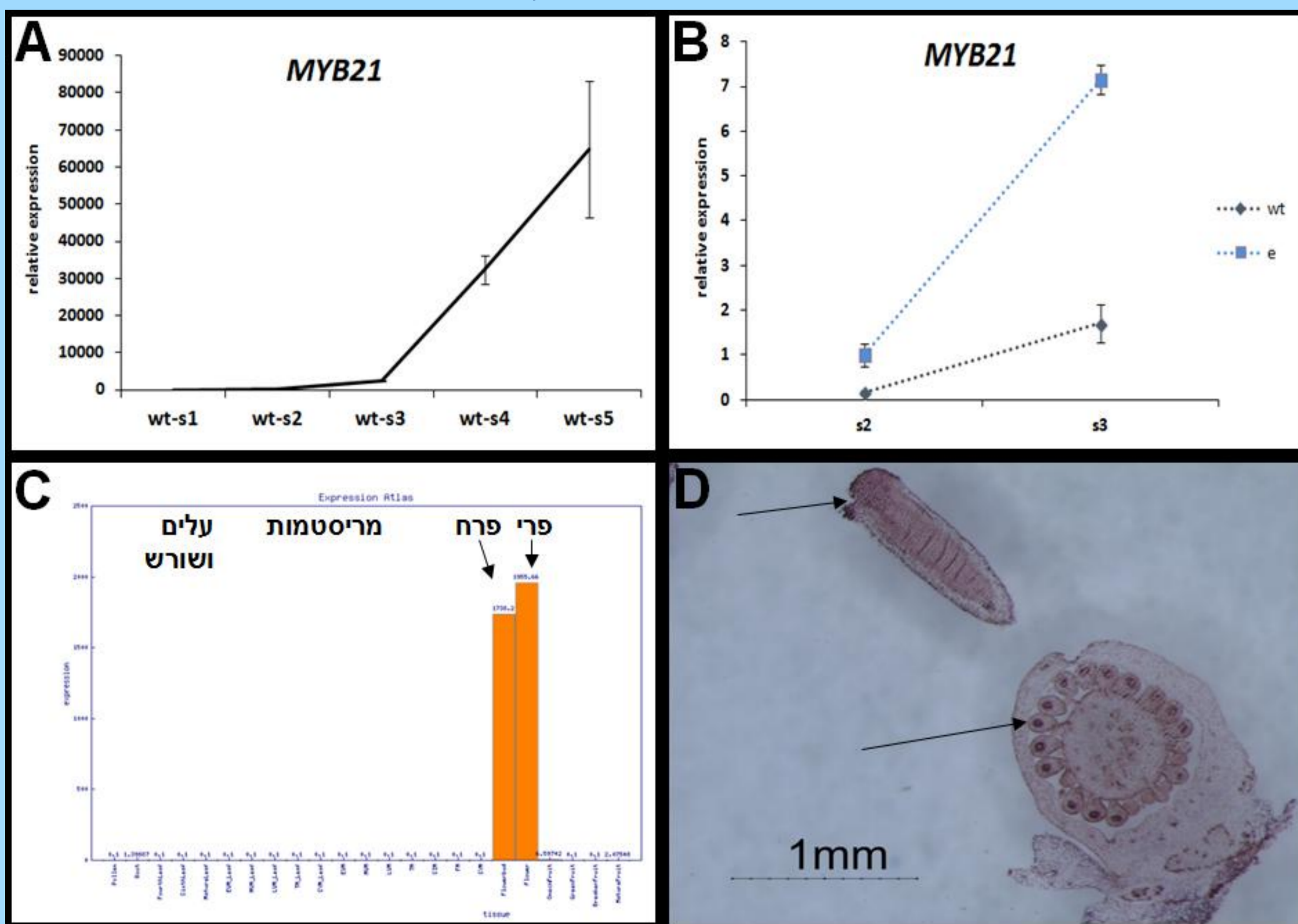
### *e* משפיע על תכונות הפרי



איור 3

A, B - פירות צעירים אחרי חנטה של WT ו *e*, בהתאמה. C, D - פירות שלמים ובשלים של WT ו *e*, בהתאמה. E, F - חתכי רוחב של פירות WT (עם זרעים) ו *e* (חסר זרעים) בהתאמה. הקו הלבן מסמן 1 ס"מ. G, H - ממוצע אורך והיקף של פירות בשלים של WT ו *e*, בהתאמה. קווי שגיאה מסמנים שגיאות תקן ( $n > 20$ ). I - ממוצע מדד בריקס, מדד לכמות המוצקים המסיסים בפר, המוצג ביחידות %TSS (total soluble solids). J - ממוצע רמת החומציות בפר. קווי שגיאה מסמנים שגיאות תקן ( $n > 10$ ). *e* משפיע על צורת הפרי, ה pH ורמת הסוכרים בפר.

### *MYB21* מתבטא ספציפית בפרח ומושפע מ *E*

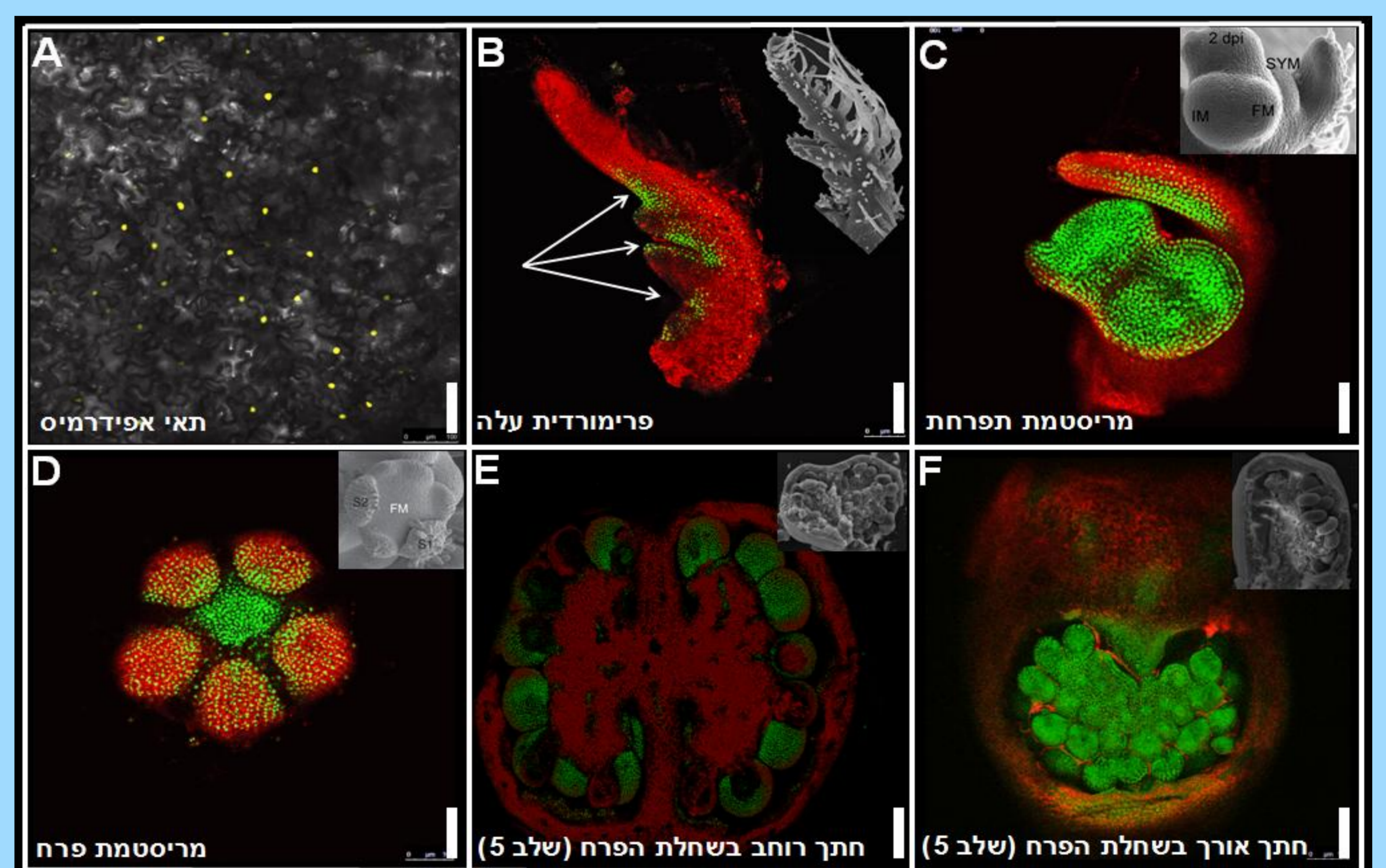


איור 4

כדי לזהות גורמים המתווכים את פעילות *E* בהתפתחות הפרי, השווייתי את פרופיל ביטוי הגנים בין מין הבר ו *e* באמצעות RNAseq בשלב 1.

A - ביטוי הגן *MYB21* בשלבי התפתחות הפרח במין הבר. B - השוואת ביטוי הגן *MYB21* בין מין הבר לבין *e* בשלבים 2 ו 3 נבחנה באמצעות qRT-PCR. ביטוי הגן *MYB21* עולה מאוד במוטנט *e*. C - ביטוי ספציפי של *MYB21* בפרח ובפרי (מתוך מאגרי נתונים). D - בחינת תבנית ביטוי ה mRNA של *MYB21* בשיטת *In-situ* hybridization, סיגנל הביטוי (סגול, מסומן בחיצים) נראה בביציות שבשחלות משלב 1 ובצללקת.

### פרומוטר *E* מתבטא באזורי עיכוב גדילה בעלה וביציות שבשחלה



איור 2

ביטוי פרומוטר הגן *ENTIRE*. מוצגות תמונות מיקרוסקופ קונפוקלי של תאים או רקמות צמח המבטאים את הקונסטרוקט *pE::YFP-NLS*. ביטוי הקונסטרוקט נראה כפלואורסנציה צהובה או ירוקה, ושאר הרקמה נראית באדום. באיורים בפינה הימנית העליונה מוצגות תמונות מיקרוסקופ אלקטרוני סורק של מבנה האיבר, בהתאמה. בפינה השמאלית התחתונה של כל תמונה מצוינת הרקמה המוצגת. הקו הלבן מסמן 100 μm. A - ביטוי חולף של הקונסטרוקט בגרעיני תאי אפידרמיים של טבק. B-D - ביטוי הפרומוטר ברקמות המצוינות. SYM - Inflorescence Meristem, FM - Floral meristem, IM - Sympodial Shoot Meristem. E, F - חתכי רוחב ואורך של שחלות, בהתאמה. פרומוטר *E* מתבטא באזורי גבול בעלים, באזורים מריסטמיים וביציות בפרחים.

**סיכום:** בעבודה זו יצרתי צמחים המבטאים את הפרומוטר של הגן *E* ומצאתי כי הוא מתבטא בין העללים, במריסטמת התפרחת, וביציות שבשחלה. בנוסף מצאתי שביטוי הגן *E* עולה לאורך שלבי התפתחות הפרח עד לשיא באנתזיס ויורד לאחר ההפריה. בהתאם לביטוי החזק של הגן בפרחים ובפירות בון הבר, למוטציה *e* השפעה על תכונות הפרי הסופיות: אחוז סוכר גבוה יותר ו pH נמוך יותר. מצאתי גם שמקודד לחלבון ממשפחת פקטורי השעתוק *MYB*, אשר ביטוי מושפע ממוטציה בגן *E* ודפוס הביטוי שלו בפרחים דומה לזה של *E*. על כן ייתכן שהגן מתווך את פעילות *E* בהתפתחות הפרי.