

**אפיון גנים המבקרים את התפתחות אברי הפרח בתמר  
(*Phoenix dactylifera* L.) והשוואתם בין עצים נורמאליים ועצים  
בעלי פנוטיפים חריגים**

**עבודת גמר**

**מוגשת לפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה של האוניברסיטה העברית  
בירושלים לשם קבלת תואר "מוסמך למדעי החקלאות"**

**מאת**

**מאור שוחט**

**רחובות**

**ספטמבר 2007**

**אלול תשס"ז**

עבודה זאת נעשתה בהדרכת:

ד"ר יובל כהן, מינהל המחקר החקלאי, מכון וולקני

פרופסור אורי לביא, מינהל המחקר החקלאי, מכון וולקני

תודות:

ברצוני להודות לד"ר יובל כהן ולפרופסור אורי לביא על עזרתם הרבה, הדרכה מקצועית, ויחס אישי.

תודה מיוחדת לד"ר אלון סמך, ד"ר אבנר כהן, רעיה קורצינסקי ולאחותי חן על הסיוע במהלך

העבודה.

לכל צוות המעבדה על העזרה ועל האווירה הנעימה.

תודה לעשור בן זוגי, למשפחתי וחברי על תמיכתם הרבה.

## תוכן עניינים

1.....	תוכן עניינים
3.....	רשימת טבלאות
4.....	רשימת איורים
5.....	1. תקציר
7.....	2. מבוא
7.....	2.1. עץ התמר
8.....	2.2. ריבוי התמר
9.....	2.3. מופעים חריגים של שתילי תמר מתרבית רקמה
11.....	2.4. תופעות העשויות לבקר את יצירת הטיפוסים החריגים
11.....	2.4.1. מתילציה של DNA
12.....	2.4.2. SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms)
12.....	2.4.3. דגם הביטוי
13.....	2.5. זיהוי ואיפיון עצים חריגים מתרבית ריקמה
13.....	2.6. פרח התמר
14.....	2.6.1. בקרת התפתחות אברי הפרח
16.....	2.6.2. גנים מסוג MADS box
17.....	2.6.3. שימור גנים מסוג MADS box
19.....	2.6.4. גנים שאינם מסוג MADS BOX המשפיעים על התפתחות אברי הפרח
20.....	2.7. עצי תמר חריגים מתרבית ריקמה בעלי 'חנטה לקויה' ו'ריבוי שחלות'
22.....	2.8. 'Mantled' - מופע חריג של דקל השמן
23.....	2.8.1. איפיון גנים מבקרי פריחה בדקל השמן
24.....	2.8.2. גנים בעלי דפוסי ביטוי שונים באסוציאציה לפנוטיפ 'Mantled'
25.....	2.9. מטרת העבודה
26.....	3. חומרים ושיטות
26.....	3.1. חומר צמחי
27.....	3.2. הפקת DNA גנומי
28.....	3.3. הפקת Total RNA
29.....	3.4. טיפול ב-DNase I
29.....	3.5. יצירת cDNA
29.....	3.5.1. סינתזת הגדיל הראשון של cDNA
30.....	3.6. איתור גנים מועמדים (candidate genes)
30.....	3.7. בידוד גנים אורתולוגים מתמר

32	3.8	בדיקת איכות וריכוז תוצרי ה-PCR
32	3.9	קביעת רצף ואנליזה של תוצרי ה-PCR
32	3.10	עצים פילוגנטיים
32	3.11	דגם המתילציה של ה-DNA
33	3.12	איתור SNPs
34	3.13	איפיון דגם השעתוק באמצעות Real-Time RT-PCR
37	4	תוצאות
37	4.1	זיהוי גנים מתמר המבקרים את התפתחות הפרח
44	4.2	איפיון גנים מבקרי פריחה מתמר
51	4.3	איפיון דגמי מתילציה
53	4.4	השוואת רצפים
56	4.5	איפיון דגם הביטוי
60	5	דיון
60	5.1	השיטה
61	5.2	אימות התוצאות
62	5.3	בידוד ואיפיון גנים אורתולוגים המבקרים את התפתחות אברי הפרח בתמר
63	5.4	שונות בדגם המתילציה
65	5.5	שונות ברמת הרצף
67	5.6	שונות בדגם ביטוי הגנים
71	6	רשימת ספרות
1	7	תקציר באנגלית

## רשימת טבלאות

- טבלה 1 - השוואת הפנוטיפ 'Mantled' בדקל השמן לפנוטיפ החריג בזן 'ברהי'.....23
- טבלה 2 - עצים ששימשו לאנליזות דגמי המתילציה ורצף הבסיסים .....26
- טבלה 3 - עצים ששימשו לבדיקת דגם הביטוי .....27
- טבלה 4 - רצף התחלים ששימשו לבידוד גנים .....31
- טבלה 5 - איפיון דגמי מתילציה באמצעות אנזימי הרסטריקציה *MspI/HpaII* .....33
- טבלה 6 - תחלים ששימשו לאנליזת דגם המתילציה ולאיתור SNPs בתערובת DNA .....34
- טבלה 7 - תחלים ששימשו לריאקציות Real time RT-PCR .....35
- טבלה 8 - גנים המבקרים את מבנה הפרח .....37
- טבלה 9 - אפיון מקטעי גנים אורתולוגים מתמר לגנים מבקרי התפתחות הפרח .....45
- טבלה 10 - חיתוך DNA על ידי *HpaII/MspI* .....53
- טבלה 11 - סיכום הניסויים לאיתור SNPs בין עצי תמר נורמאליים וחריגים .....55
- טבלה 12 - רמות ביטוי של גנים בעצים נורמאליים ועצים בעלי 'פנוטיפ חמור' .....58
- טבלה 13 - דגם ביטוי של הגנים PdCLV, PdSPW1, PdMADS4 ו-PdDIF בעצים בעלי 'פנוטיפ חלש' ובעצים נורמאליים .....58
- טבלה 14 - דגם הביטוי של הגנים PdDIF ו-PdSPW1 בעצים בעלי 'פנוטיפ חמור' .....59

## רשימת איורים

- איור 1 - מבנה פרח דו-פסיגי ופרח חד-פסיגי. 14.....
- איור 2 - מבנה פרח התמר. 14.....
- איור 3 - החלפת איברים הומאוטית בפרחים חד-פסיגיים. 18.....
- איור 4 - החלפת איברים הומאוטית במוטנט dl-sup1. 20.....
- איור 5 - 'ריבוי שחלות' בפרי תמר מהזן 'ברהי'. 21.....
- איור 6 - השוואת רצף של גנים אורתולוגיים ל-SPW1. 40.....
- איור 7 - רצף התחלים הדגנרטיבים לגן SPW1. 41.....
- איור 8 - TOTAL RNA מפרחים של עצי תמר מזן 'ברהי'. 41.....
- איור 9 - תוצרי PCR של הגן SPW1. 42.....
- איור 10 - השוואת רצף cDNA של הגן PdSPW1 במינים שונים. 43.....
- איור 11 - השוואת רצף חומצות אמינו בין אורתולוגים של הגן PdSPW1. 44.....
- איור 12 - עצים פילוגנטיים על בסיס הרצף של גנים מסוג MADS box. 49.....
- איור 13 - חיתוך DNA גנומי מתמר באנזימים HpaI ו-MspI. 51.....
- איור 14 - Semi-Quantitative PCR לאפיון רמות המתילציה של אתרי HpaI/MspI בגנים מועמדים. 52.....
- איור 15 - מצב הטרוזיגוטי בגן PdMADS4. 54.....
- איור 16 - השוואת רצף של הגן PdMADS4. 54.....
- איור 17 - עקומת כיוול של הגן PdSPW1 באנליזת Real-Time RT PCR. 56.....

# 1. תקציר

התמר הינו ענף מטעים עיקרי ובעל חשיבות כלכלית רבה באזורים המדבריים של המזרח התיכון וצפון אפריקה. ריבוי התמר נעשה בעיקר באמצעות חוטרים, שמספרם בכל עץ מוגבל. הצורך בהרחבת מטעי התמרים בעולם הביא לפיתוח טכניקות לריבוי התמר בתרבית רקמה. שימוש בתרביות רקמה בתמר מביא עימו סיכויים רבים וכלים חדשים להתמודד עם בעיות הענף כגון יצור כמות גדולה של שתילים אחידים בו זמנית ועמידות למחלות נפוצות ולמזיקים. מירב העצים שרובו בתרביות רקמה הינם נורמאליים ואחידים, ואולם נוצרים גם פרטים בעלי פנוטיפים חריגים טיפוסיים. קיימים אלפי עצים חריגים בארץ ומספרם בעולם מגיע לעשרות אלפים. עצים חריגים אלה גורמים נזק כלכלי קשה למגדלי התמר.

עבודה זו מתמקדת בניסיון להבין את המנגנון המבקר את יצירת אחד מהפנוטיפים החריגים הטיפוסיים לעצי תמר מהזן 'ברה'. לפנוטיפ זה מופע של 'חנטה לקויה' ו'ריבוי שחלות'. ב'פנוטיפ החמור', בחלק ניכר מהפרחים נוצרים איברים דמויי שחלות במקומם של אבקנים מנוונים. ה'פנוטיפ החלש' כולל 'חנטה לקויה' ואחוז נמוך מאוד של ריבוי שחלות (בחלק מהעצים אין ריבוי שחלות כלל). ניתן להניח שריבוי השחלות נובע מטרנספורמציה הומאוטית של אבקנים לשחלות, הנגרמת כתוצאה משינוי גנטי או אפיגנטי באחד מהמסלולים או הגנים המבקרים את התפתחות הפרח.

המחקר הנוכחי התבסס על בידוד גנים מועמדים (candidate genes) מתמר המבקרים את התפתחות אברי הפרח, והשוואתם בין עצים נורמאליים לעצים חריגים בעלי מופע של 'חנטה לקויה' ו'ריבוי שחלות'. במהלך העבודה זיהינו 11 מקטעים של גנים מתמר בעלי הומולוגיה גבוהה לגנים המבקרים התפתחות הפרח במיני צמחים שונים. בודדנו מקטעי DNA גנומי ומקטעים מרצפי cDNA שהופקו מ-RNA מפרחי 'ברה'. ההומולוגיה של המקטעים מתמר (ברמת ה-cDNA) לגנים האורתולוגיים מצמחים חד פסיגיים היתה גבוהה ונעה בין 79% ל-96%. רוב הגנים האורתולוגיים מדקל השמן הראו הומולוגיה גבוהה ביותר לתמר (-90% 96%). מקטעי הגנים שבודדו אופיינו בעצים נורמאליים וחריגים בשלושה היבטים: (1) דפוס המתילציה (2) רצף הבסיסים (3) דגם הביטוי.

(1) דגם המתילציה נבחן באתר החיתוך של שני האיזוסכיזומרים *HpaII* ו-*MspI* המזהים את אותו אתר חיתוך מבחינת רצף הבסיסים אך בעלי רגישות שונה למתילציה של אתר זה, בהמשך תוצרי החיתוך הוגברו ב-PCR. בהשוואה ראשונית בלבד, של עץ חריג אחד ועץ נורמאלי אחד בשני גנים מסוג B (*PdSPW1* ו-*PdMADS4*) נמצא שבעץ החריג בשני הגנים התקבל תוצר ב-DNA החתוך על ידי *MspI*, בעוד שבעצים הנורמאליים לא התקבל כל תוצר. יתכן שתוצרים אלה נובעים מחיתוך לא מלא של *MspI*. תוצאה זאת אינה מאפשרת מסקנה



החלטית באם קיים הבדל בדגם המתלציה בין עצים נורמאליים לחריגים או שהתוצאה מבטאת יעילות חיתוך נמוכה של האנזים.

(2) שונות ברמת הרצף נבדקה על ידי השוואת הרצפים של מקטעי הגנים בין העצים החריגים לעצים הנורמאליים תוך חיפוש של SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) המבדילים בין עצים נורמאליים לחריגים (במצב הומוזיגוטי או הטרוזיגוטי) ומצויים באסוציאציה לפנוטיפ. בהשוואת עץ נורמאלי אחד לעץ חריג אחד מצאנו SNP הומוזיגוטי באינטרון של הגן PdMADS4 ו-SNP הטרוזיגוטי ברצף המקדד של הגנים PdMADS4, PdAGL2-3, PdDL ו-PdSQUA. אולם, בבדיקת פרטים נורמאליים וחריגים נוספים הבדלים אלה לא נמצאו באסוציאציה לפנוטיפ.

(3) רמות הביטוי של הגנים השונים נבדקו בפרחים מעצים חריגים ומעצים נורמאליים באמצעות Quantitative RT-PCR. בעצים בעלי 'פנוטיפ חמור' של 'חנטה לקויה' ו'ריבוי שחלות' מצאנו ביטוי נמוך פי שלושה בהשוואה לעצים הנורמאליים בשני גנים: PdDIF ו-PdSPW1. הגן PdSPW1 הומולוגי לגנים מסוג B המבקרים את התפתחות איברי הפרח. הגן PdDIF הומולוגי לגנים מסוג דיפנסין שתפקידם הוא בהגנה על הצמח בתנאי עקה שונים. בפרחים בעלי 'פנוטיפ חלש' של 'חנטה לקויה' ואחוז נמוך מאוד של 'ריבוי שחלות', ההבדלים בביטוי שני הגנים יחסית לפרחים נורמאליים לא היו מובהקים.

העבודה הנוכחית מסייעת להבנת המנגנון של יצירת טיפוסים סומקלונליים חריגים במהלך הריבוי מתרבית ריקמה. שינויים אלה בביטוי גנים המבקרים תהליכי התמיינות, כמו בקרת התפתחות הפרח, הנגרמים ככל הנראה ע"י תנאי תרבית רקמה מסוימים, יכולים להביא ליצירת עצים חריגים בעלי דפוס התפתחותי (במקרה שלנו בפרח) לא תקין. הבנת המנגנון המבקר יצירת עצים חריגים אלה יוכל לאפשר שיפור של פרוטוקול תרבית הרקמה ופיתוח כלים מולקולארים לזיהוי מוקדם של השתילים החריגים כדי למנוע את יצירתם והפצתם במטעים. כלים אלה הינם חיוניים להמשך ריבוי תמרים מתרביות רקמה.

## 2. מבוא

### 2.1. עץ התמר

עץ התמר (*Phoenix dactylifera* L.) הינו חד-פסיגי, דו-ביתי ושייך למשפחת הדקליים (*Arecaceae*). גנום התמר הינו דיפלואידי ומכיל 36 כרומוזומים (Barrow, 1998). לתמר גזע יחיד, בלתי מסתעף, שגובהו עשוי להגיע עד למעלה מעשרים וחמישה מטרים. סיבי הגזע הם צרורות של צינורות הובלה. בראש הגזע אמיר או "כתר" של עלים גדולים, מנוצים המכונים "כפות תמרים". אורך העלים הוא עד ארבעה מטרים ומשך חייהם בין שנתיים לארבע שנים. בתקופת האביב מתפתחות בין העלים תפרחות. התפרחות מכילות כמה עשרות סנסנים שעליהם נמצאים הפרחים. בעצי הזכר מתפתחות תפרחות אבקניות ובעצי הנקבה מתפתחות תפרחות עלייניות. שלבי התמיינות התפרחות מתרחשים בתוך הגזע. לפרח הנקבי יש שלוש שחלות. לאחר ההאבקה וההפרייה, שחלה אחת מתפתחת לפרי ואילו שתי השחלות הנוספות מתנוונות (ברנשטיין, 2004; סטולר, 1977). מהתפרחות הנקביות המופרות מתפתחים אשכולות הפרי. משקלו של אשכול בודד יכול להגיע לכעשרים ק"ג.

העדויות הראשונה על המצאות התמר בארץ נמצאה בחפירות יריחו, כ-1,600 שנה לפני סה"נ (ברנשטיין, 2004; סטולר, 1977). התמר הינו אחד משבעת המינים, שבהם התברכה הארץ. בתקופת המקרא היה התמר נפוץ בכל עמק הירדן, מגינוסר לצוער שבדרום ים המלח ועד ים סוף. כמו כן גדל התמר לאורך מישור החוף, ממפרץ עכו עד עזה. במלחמות היהודים עם הרומאים נגרם נזק רב לחורשות התמרים שבבקעת הירדן ובעין גדי, ובתום ימי הביניים הייתה בקעת הירדן כמעט ריקה מתמרים (ברנשטיין, 2004; סטולר, 1977). במחצית השנייה של המאה ה-19 יובאו לאזור עזה תמרים מהדלתה של מצרים. המפנה הממשי חל עם התיישבות יהודים בבקעת כנרת. באביב 1935 יצא בן-ציון ישראלי לבגדד, ובסיועה של הקהילה היהודית רכש ידע רב בגידול התמר ויבא ארצה חוטרים של מספר זנים מקומיים מפרס, עיראק ומצרים במשך כשש שנים. בשנות החמישים יזם ישראלי מבצע להבאת עשרות אלפי חוטרי תמרים מעיראק, שהיוו את הבסיס העיקרי למטעי התמרים בערבה (אבידוב, 1959). מ-1972, משך 11 שנים, הובאו ארצה מדי שנה 2,500-3,000 חוטרי תמרים מקליפורניה (ברנשטיין, 2004). כיום, מטעי התמר נפוצים מדרום הכנרת, לאורך בקעת הירדן והערבה, ועד אילת. בשנים האחרונות, עקב ההצלחה הכלכלית, מטעי התמר מתרחבים בקצב של כ-10% בשנה. במטעים המסחריים בארץ קיימים כ-10 זנים של תמרים (ברנשטיין, 2004). הזנים הנפוצים ביותר המשמשים ליצוא הם 'מג'הול', 'דקל נור', 'חיאני' ו-'ברה'.

עבודה זאת מתמקדת בעצי הזן 'ברה'. מוצאו של הזן משאט-אל-ערב שבדרום עיראק ומקור השם 'barh' הוא - 'רוחות קיץ' המנשבות במפרץ. עצים מזן זה הוכנסו לארץ לראשונה ב-1934. עצים רבים של 'ברה' הובאו לארץ בשנות החמישים. פירות הזן 'ברה' יכולים להיאכל

במצב בוסר מאחר שכמות הטנין בציפתו נמוכה. פרי הבוסר נאכל לאחר החלפת צבע מירוק לצהוב כשאחוז הסוכר בפרי מגיע ל-20-30% (ברנשטיין, 2004). לעץ ה'ברה' נוף צפוף, בסיסי העלים רחבים, ידת האשכול ארוכה מאוד, הסנסנים קצרים והאשכול רחב. לפרי צורת ביצה, רחב יותר בכתף ובעל מרקם עדין ודבשי. ה'ברה' מבוקש מאוד על ידי האוכלוסייה הערבית, במיוחד זו של רצועת עזה. הישוב היהודי המסורתי קונה 'ברה' לראש השנה, בתקופה זו מגיע הביקוש לשיאו. גם בחו"ל קיימת אוכלוסייה אתנית המחבבת זן זה. על אף הרווחיות של הזן קצב נטיעתו מתון, מאחר והעץ מייצר מעט חוטרים. שימוש בתרבית רקמה הגביר את נטיעות 'ברה' בארץ אך כיוון שחלק ניכר מהשתילים התאפיין בבעיות של כניסה לפוריות וחנטה נמוכה, קצב נטיעת השתילים הואט (ברנשטיין, 2004; כהן וחוב', 2003; Cohen et al., 2004).

## 2.2. ריבוי התמר

התמר, כמו רוב עצי הפרי, מרובה בשיטות וגטטיביות, שכן ריבוי מיני יוצר עצים בעלי שונות גנטית ופנוטיפית רבה והפירות בדרך כלל נחותים באיכותם מפירות ההורים. ריבוי תמרים מזריעים מקובל רק למטרות נוי.

באופן מסורתי התמר מרובה באמצעות חוטרים. החוטרים צומחים בחלקו התחתון של העץ במהלך שנות חייו הראשונות. החוטרים הינם חוטרי קרקע או חוטרי אוויר שנעטפים ("מאורגזים") בשק המכיל כבול או נסורת לחה, ובה מתפתחים השורשים. החוטרים המושרשים מנותקים מעץ האם ונשתלים במטע. בשיטת ריבוי זאת נוצרים שתילים איכותיים, אך יש לה מספר חסרונות כדלקמן:

- עץ אחד מצמיח רק חוטרים בודדים, בתלות בזן (20-1), ורק חלק מהם משתרשים.
- פעמים רבות שעור קליטת החוטרים בקרקע הוא נמוך.
- הסרת החוטרים פוגעת בעץ.
- חוטרים עשויים להיות מאולחים בגורמי מחלות ומזיקים, ולכן הפצתם מוגבלת ולעיתים אסורה.
- הטיפול בחוטרים והשינוע שלהם יקרים.
- זריעים, הנובטים בסמוך לגזע האם, עלולים להיראות בטעות כחוטרים.
- החוטרים שונים בגודלם ובקצב צמיחתם, ולכן מטעים שמקורם מחוטרים אינם אחידים. בשנים האחרונות, פותחו שיטות לריבוי עצי תמר בתרבית רקמה כחלופה לריבוי בחוטרים וזאת בשל היתרונות הבאים:
- ניתן לייצר כמות רבה מאוד של שתילים בו זמנית.
- צמחי תרבית נקיים מגורמי מחלות ומזיקים.
- הקליטה בשדה כמעט מלאה.

• שתילים שמוצאם מתרבית רקמה מצטיינים באחידות רבה בגודל ובקצב הצימוח. בשיטות הריבוי בתרבית רקמה, נלקחת רקמת תאים מפקע אמירי של עץ האם או פקעים חיקיים של חוטר. הרקמה גדלה על מצע מזון בנוכחות הורמונים צמחיים ויוצרת מספר רב של צמחונים (כ-500 ויותר) שיגדלו לשתילים. לפני הנטיעה השתילים עוברים הקשחה (Zaid, 1999). קיימות שתי שיטות עיקריות לריבוי תמר בתרבית רקמה: אמבריוגנזה ואורגנוגנזה.

אמבריוגנזה: המקור הצמחי (ה-explant) הוא פקע אמירי או פקעים חיקיים של חוטר. השימוש בחוטרים מונע את חיסול עץ האם (ישראלי, 2004; Tisserat, 1979). האקספלט עובר חיטוי ובגידול על מצע מזון מתאים מביא ליצירת קלוס (רקמה אמורפית, בלתי ממוינת). כעבור כשנה בתרבית, הופך הקלוס לאמבריוגני (פריך וגרגרי). הקלוס האמבריוגני מועבר למצע ללא חומרי צמיחה ובנוכחות אור. בתנאים אלה מתמיינים עוברים סומטיים המתפתחים לצמחונים שמושרשים ומוקשחים (ישראלי, 2004).

אורגנוגנזה: בשיטה זו אזורים מריסטמיים מתפתחים ליצירת צמחונים. אין יצירת קלוס, אלא התפתחות ישירה של צמחונים. בתנאים מתאימים הרקמה משגשגת ונוצרות עליה בליטות בצבע ירקרק, דמויות עלים זעירים. קבוצות של תאי אפידרמיס על פני בליטות אלה מתפתחות למריסטמות, ויוצרות פקעים. הפקעים גדלים לנצרון זעיר עם עלים וקודקוד צמיחה וזה מתפתח לצמח צעיר (ישראלי, 2004; Kunert et al., 2003). שיטה זו הינה איטית יותר ופחות נפוצה במרבית המעבדות המסחריות בעולם (ברנשטיין, 2004).

### **2.3. מופעים חריגים של שתילי תמר מתרבית רקמה**

הריבוי בתרבית הינו ריבוי וגטיבי. לכן, העצים שמקורם בשבט (clone) אחד צפויים להיות זהים לעץ האם וזהים ביניהם (true to type). אולם, מספר רב של עצים שמקורם מתרביות ממקורות מסוימים נראים שונים (off-type) ויוצרים אי אחידות במטע, למרות שנוצרו מאותו מקור. תופעה זו של יצירת טיפוסים חריגים מתרבית ריקמה נקראת שונות סומקלונלית - somaclonal variation (Kaepler et al., 2000; Larkin and Scowcroft, 1981). המנגנון האחראי ליצירת שונות סומקלונלית אינו ברור ויכול לנבוע משינויים גנטיים (ברמת ה-DNA) או אפיגנטיים (ללא שינוי ברצף הבסיסים של ה-DNA). ריבוי תמר באמבריוגנזה מצריך שימוש בריכוזים גבוהים יחסית של אוקסין, העלולים לגרום לחוסר יציבות גנטית בצמחים (Kunert et al., 2003). תדירות הפנוטיפים החריגים הינה גבוהה יותר בעצים ממעבדות תרבית ריקמה מסוימות. עובדה זו מרמזת על השפעת פרוטוקול הכנת צמחי תרבית הריקמה על יצירת העצים החריגים (Cohen et al., 2004). הפנוטיפים הבאים נפוצים בעצי תמר שרובו בתרבית רקמה: עצים ננסיים, עצים בעלי 'חנטה לקויה' ועיוותים במבנה הפרח, עצים בעלי שונות בצורת העלים, ובעלי עלים מגוונים (עם סקטורים צהובים-

לבנים בעלים) ועצים הרגישים במיוחד לכוויה שחורה (Al Kaabi et al., 2007; Zaid and Al Kaabi, 2003). שני הפנוטיפים החריגים הנפוצים ביותר בארץ הם:

• עצים בעלי 'חנטה לקויה'

במטעי 'ברהי' ו'חלאס' שמקורם מתרבית ריקמה נמצאו עצים בעלי מופע של 'חנטה לקויה'. בתהליך ההפרייה התקין נובט גרגר האבקה על אחת הצלקות, הנחשון גדל לאורך עמוד העלי ומפרה את הביצית באחת משלוש השחלות. שחלה זו חונטת פרי, ואילו שתי השחלות האחרות מתנוונות. במקרים בהם תהליך ההפריה לא מתרחש עלול להיווצר פרי פרתנוקרפי. פרתנוקרפיה מופיעה לעיתים בשל תנאי האקלים. טמפרטורות ותנאי לחות שאינם נוחים לנביטת הנחשון מביאים ל'חנטה לקויה' וליצירת פירות פרתנוקרפיים רבים. גם באשכולות שלא הופרו, או שהאבקו באבקה בעלת חיוניות נמוכה מתקבל אחוז גבוה של פירות פרתנוקרפיים (ברנשטיין, 2004; Reuveni, 1986). בפירות אלה מתפתחות כל שלוש השחלות, ליצירת פרי "משולש" חסר זרעים, או ששתי שחלות יתנונו ואילו בשחלה השלישית שתמשיך לגדול, לא יתפתח עובר וזרע נורמאלי, אלא יוצרו פירות פרתנוקרפיים בודדים (Reuveni, 1986). במרבית זני התמר, בשלבים הראשונים של התפתחות הפרי, הפירות הפרתנוקרפיים הבודדים דומים מאוד לפירות המופרים. ואולם בשלבים מאוחרים פירות אלה הינם דקים יותר, מבשילים מאוחר יותר וצוברים פחות סוכר. בחלק מהזנים הפירות הפרתנוקרפיים המשולשים נושרים ובאחרים (כמו בזן 'ברהי') הם נוטים להישאר על הסנסנים ולהתפתח. לפירות פרתנוקרפים אלה (הבודדים או המשולשים) אין כל ערך כלכלי, הם מקטינים את כמות ואיכות היבול וסילוקם מייקר את תהליך המיון.

במיקרים רבים בעצים החריגים מתרבית רקמה הסובלים מ'חנטה לקויה', לא נצפה הניוון הנורמאלי של שתיים משלוש השחלות, ורובן מתפתחות לפרי פרתנוקרפי משולש. בנוסף, בחלק מעצים אלה נמצא ריבוי של איברים דמויי שחלות (ארבע עד שמונה שחלות בחנט המתפתח, במקום שלוש שחלות הנוצרות בפרח נורמאלי או בפרי פרתנוקרפי משולש). ה"שחלות המוספות" ממוקמות בדור חיצוני אחד או בשני דורים חצוניים לשלושת השחלות הפרתנוקרפיות (ראה איור 5 בהמשך) (Cohen et al., 2004; Djerby, Al-Wasel, 2001; 2000).

• עיכוב צימוח וננסות

במטעי 'מג'הול' שמקורם מתרבית ריקמה נמצאו עצים בעלי מופע ננסי אופייני, בעלי עלים קצרים עם הוצים (עלעלים) ארוכים ורחבים. נוף הצמח נראה מעוגל ומכונס (ברנשטיין, 2004). עצים אלה אינם מתפתחים כצפוי ונשארים קטנים מאוד. הם לא פורחים גם בשלב בו עצים נורמאליים חונטים אשכולות ראשונים. בשנים האחרונות נצפו בחלק מעצים אלה תפרחות ראשונות, ובהן, כפי שתואר בפנוטיפ 'חנטה לקויה' בעצי הזן 'ברהי', נמצאו חנטים

מרובי שחלות (כהן, תוצאות שלא פורסמו). ההערכה היא שבארץ ניטעו כ-10,000 עצי 'מג'הול' המאופיינים בעיכוב צמיחה.

תדירות גבוהה של כל הפנוטיפים הללו הביאה בשנים האחרונות לעקירה של אלפי עצים חריגים במטעי הארץ, ונשקלת האפשרות לעקור עצים נוספים שאינם מצדיקים את ההשקעה. בנוסף, מתעורר ספק באשר לכדאיות הריבוי באמצעות תרביות רקמה, למרות יתרונותיה הרבים של שיטה זו. לפתרון בעית השונות הסומקלולנית חשיבות רבה להמשך הפיתוח של ענף התמר בעולם, ומחקרים רבים מנסים לאפיין את הטיפוסים החריגים ולמצוא שיטות לזיהויים המוקדם (Al- and Zaid, 2003; Kunert *et al.*, 2003; Al Kaabi *et al.*, 2007). (Kaabi, 2003).

## 2.4. תופעות העשויות לבקר את יצירת הטיפוסים החריגים

התופעות העשויות לבקר את יצירת הטיפוסים החריגים יכולות לנבוע משינויים גנטיים, כגון מוטציות נקודתיות, אברציות כרומוזמאליות, שינויים בפלואידיות, שינויים ברמת הביטוי של גנים, או שינויים אפיגנטיים כמו שינויים במידת האצטילציה של חלבוני היסטון ושינויים בדגמי המתילציה של ההיסטונים או של ה-DNA עצמו (Kaepler *et al.*, 2000).

### 2.4.1 מתילציה של DNA

מתילציה של DNA נובעת מהוספה של קבוצת מתיל ( $\text{CH}_3$ ) לציטוזין והפיכתו ל-5-methylcytosine. בגנום הצמחים למעלה מ-20% מהציטוזינים ממותלים (Gruenbaum *et al.*, 1981). המתילציה של ציטוזין מתרחשת לאחר שכפול ה-DNA באמצעות האנזים cytosine methyltransferase ומעורבותם של אנזימים נוספים (Finnegan *et al.*, 1998); (Richards, 1997). באאוקריוטים, המתילציה עשויה למנוע קישור של חלבוני בקרה ל-DNA. מתילציה של פרומוטר או אזור מקדד של גן יכולה לפגוע בשעתוק. מתילציה של DNA מעורבת בתזמון של שכפול ה-DNA, ובבניה של כרומטין (Jost and Saluz, 1993). עיכוב פעילות המתילאז בצמח המודל ארבידופסיס השפיעה על מבנה הצמח והפרח (Finnegan *et al.*, 1996). מקובל להניח ששיעור המתילציה בגנום הנו כלי לבקרת הביטוי של גנים רבים. המנגנון האחראי למיתול בשעור שונה של אזורים שונים ב-DNA אינו ידוע די צורכו. בנוסף לבקרת הביטוי, למתילציה יש תפקיד בהגנת התא מפני DNA זר (Finnegan *et al.*, 1998). לרמת המתילציה השפעה על התפתחות הפרח ועל פוריותו. שינויים ברמת המתילציה נמצאו כגורמים לעיוותים בפרחים, לתוספת אברים בפרח (אבקנים או שחלות), ולעקרות (Richards, 1997; Kaepler, 2000). נמצא ששינויים בגן Superman (Sup) בארבידופסיס המביאים לפנוטיפ של ריבוי אבקנים ושחלות קשורים לרמת המתילציה של

ה-DNA. בצמחים טרנסגניים בהם יש ירידה ברמת המתילציה הכללית עולה דווקא רמת המתילציה הספציפית לגן Sup, ועליה זו מביאה לתופעה של יצירת איברים נוספים דמויי אבקנים או שחלות (Jacobsen and Meyerowitz, 1997). שינויים בדגם המתילציה מהווים את אחד המנגנונים ליצירת שונות סומקולונית אפיגנטית (Jost and Saluz, 1993; Kaeppler *et al.*, 2000).

#### 2.4.2 (Single Nucleotide Polymorphisms) SNPs

SNP הוא סמן בי-אללי המתבטא בשינוי של בסיס אחד. זהו הסוג הנפוץ ביותר של פולימורפיזם ב-DNA. תדירות ה-SNP באדם היא אחד לכל 1000 bp וקיימים היום סמני SNPs ידועים לזיהוי מחלות רבות (Edwards *et al.*, 2001). בצמחים נמצא ש-SNPs מתרחשים ב-DNA בגרעין ובכלורופלסט בתדירות גבוהה. בגנום החיטה נמצאה תדירות של SNP אחד כל 370-540 bp (Khlestkina *et al.*, 2006) ובגנום האורז נמצא SNP אחד בממוצע לכל 234 bp (Nasu *et al.*, 2002). ניתן להשתמש ב-SNPs לחקר שונות גנטית, לאבחנה בין זנים וככלי עזר להשבחה. לדוגמא, באורז ננסי SNP שימש כסמן של גן sd-1 המקדד לאנזים מוטנטי המעורב בסינתזת ג'יברלין. בנוסף נמצאו SNPs היכולים לשמש כסמנים לאבחנה בין שני מיני זני אורז קרובים (Nasu *et al.*, 2002). בצמחי תירס חריגים מתרבית ריקמה נמצא קשר ישיר בין חלבון וריאנטי לשינוי ברצף ה-DNA. במקרה זה נמצאו עדויות לשתי מוטציות נקודתיות בלתי תלויות בגן Adh1 (Alcohol dehydrogenase) בעקבות התמרה מורכבת (transversion) של הבסיס A לבסיס T, שגרמה לשינוי מבנה האנזים בצמח המוטנט. במקרה הראשון, החלפת בסיס יחיד באקסון מספר שש גרמה להחלפת חומצה אמינית אחת באחרת (Brettell *et al.*, 1986). במקרה השני התרחשה החלפת בסיס יחיד באקסון שגרמה להחלפת הקודון המקדד לחומצה אמינית בקודון פסק (Dennis *et al.*, 1987).

#### 2.4.3 דגם הביטוי

שינויים בדגם הביטוי של גנים על ידי "פגיעה" ישירה בגן (מתילציה או שינוי ברצף) או פגיעה בגנים רגולטורים אחרים המשפיעים על ביטוי גן זה, יכולים להביא ליצירת טיפוסים חריגים. ירידה בביטוי הגן SUP מארבידופסיס גרמה לפנוטיפ של ריבוי אבקנים ושחלות (Jacobsen and Meyerowitz, 1997). פגיעה בדגם הביטוי ברמות שונות יוצרת פנוטיפים שונים. לדוגמא, פגיעה חמורה בביטוי הגן SUP יוצרת פנוטיפ פרח ברור בעל החלפת איברים הומיאוטית, בעוד פגיעה קלה יותר בביטוי הגן יוצרת איברי ביניים. פגיעה בגן רגולטורי UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO) מארבידופסיס מפריעה להפעלת הגן APETALA3 (AP3) החיוני להתמיינות עלי הכותרת והאבקנים בפרח. במוטנט ufo נמצאה

רמה נמוכה יותר של תעתיקי הגן AP3 למרות שלא חלה בו פגיעה ישירה ובעקבות כך נוצר פנוטיפ דומה מאוד לפנוטיפ המוטנט ap3 (Jack, 2004).

## 2.5. זיהוי ואיפיון עצים חריגים מתרבית ריקמה

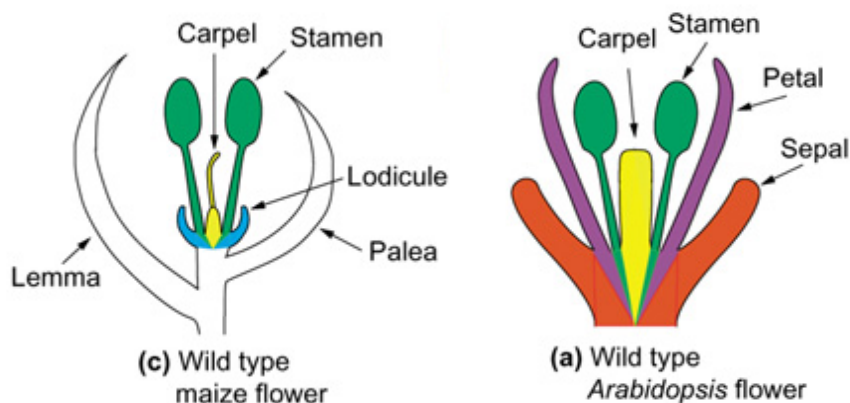
קיים קושי באפיון השונות הסומקלולולית בגידולים חקלאיים בשלב מוקדם ועם זאת יש לכך חשיבות רבה. איפיון מורפולוגי של הצמחים החריגים בשלב מוקדם הינו לרוב בלתי אפשרי מכיוון שהשונות המורפולוגית מתבטאת פעמים רבות רק בשלבי גידול מאוחרים. לכן מוקדש מאמץ מחקרי למציאת שונות ברמת ה-DNA. Saker וחבריו (2000) השתמשו באיזוזימים וב-RAPD לזיהוי עצי תמר חריגים מתרבית ריקמה, ומצאו שונות סומקלולולית בכ-4% מתוך 70 עצים מהזן 'זגלול' שמקורו בתרבית ריקמה. Gurevich וחבריו (2005) מצאו בעזרת AFLP שונות גנטית בעצי מג'הול מתרבית ריקמה אך ללא אסוציאציה לפנוטיפ הננסי החריג. בעבודתם של Oh וחבריו (2007) נמצא מקטע יחודי של DNA בעזרת Representational Difference Analysis (RDA) המבדיל בין עצי בננה חריגים מתרבית ריקמה לבין עצי בננה נורמאליים. למקטע זה יש פוטנציאל להוות כלי לזיהוי מוקדם של שונות סומקלולולית בבננה. צמח הבננה, בדומה לתמר, הינו חד-פסיגי ומרובה כיום בעיקר בתרבית ריקמה. גם בגידול זה מופיעים צמחים חריגים הגורמים לנזק כלכלי רב.

## 2.6. פרח התמר

מבנה פרח דו-פסיגי דו-מיני טיפוסי כולל ארבעה סוגי איברים יחודיים המסודרים בדורים. שני הדורים החיצוניים מכילים איברים הבונים את עלי העטיף: עלי הגביע מופיעים בדור הראשון ויוצרים את מעטפת ההגנה החיצונית של הניצן המתפתח. עלי כותרת מופיעים בדור השני. שני הדורים הפנימיים מוקדשים לאברי הרבייה - אבקנים מופיעים בדור השלישי ויוצרים את גרגרי האבקה הזיכריים. העלי מופיע במרכזו של הדור הרביעי ומורכב מעלה שחלה (carpel) אחד או ממספר עלים, וקיימים בו החלקים הבאים: שחלה (ovary) המכילה ביציות (ovules) הנושאות את הגמטות הנקביות, עמוד עלי (style) וצלקת (stigma). מבנה הפרח בצמחים חד-פסיגיים שונה לפעמים מזה של צמחים דו-פסיגיים. הפרח כולל אבקנים ועלי שחלה בהתאמה לדו-פסיגיים, אך לא תמיד ניתן להבחין בעלי גביע ועלי כותרת ברורים. מבנה הפרח של משפחת הדגניים כולל: קשקשי התפיחה (lodicule) מקבילים לעלי כותרת בדו-פסיגיים וסביבם נמצאים המוץ העליון (palea) והתחתון (lemma) המקבילים לעלי הגביע (איור 1) (Yamaguchi *et al.*, 2004).



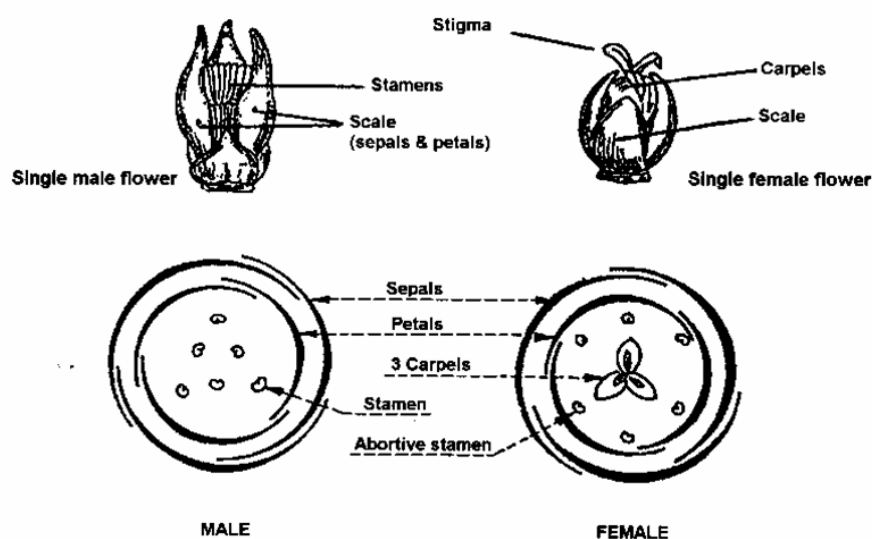
## איור 1 - מבנה פרח דו-פסיגי ופרח חד-פסיגי



מבנה פרח דו פסיגי מארבידופסיס (a) מבנה פרח חד פסיגי מתירס (c)  
 Lodicule - קשקשי תפוחה, palea - מוץ עליון, lemma - מוץ תחתון (מתוך-Irish, 2001).

פרח התמר הינו חד מיני ובעל עלי כותרת ועלי גביע דומים במראם אך שונים בגודלם. לפרח הנקבי יש שלוש שחלות ושישה אבקנים מנוונים (איור 2).

## איור 2 - מבנה פרח התמר



פרח תמר נקבי המכיל שלוש שחלות, שישה אבקנים מנוונים, עלי כותרת ועלי גביע.  
 פרח תמר זכרי מכיל שישה אבקנים, עלי כותרת ועלי גביע (מתוך Zaid, 1999).

### 2.6.1 בקרת התפתחות אברי הפרח

המעבר מצמיחה וגטטיבית לצמיחה רפרודקטיבית הוא תהליך מבוקר רב שלבי המתנהל על בסיס אינטרקציות בין גורמים חיצוניים לפנימיים. מחקרים רבים נעשו בצמחי המודל ארבידופסיס ולוע הארי על מנת להבין את המנגנון המולקולרי המבקר את תהליך הפריחה, ולזהות ולאפיין את הגנים האחראים ליצירת אברי הפרח השונים (Bommert et al., 2005).

תהליך יצירת הפרח והבקרות עליו הינם שמורים מאוד בצמחים דו-פסיגיים. בשלב הראשון מופעלים גנים הקובעים את זהות מריסטמת התפרחת ובשלב השני מופעלים גנים האחראים לזהות איברי הפרח. שלבים אלה מבוקרים גנטית (Krizek *et al.*, 2005).

הגנים העיקריים הקובעים את זהות מריסטמת התפרחת בארבידופסיס הם LEAFY (LFY) ו-APETALA1 (AP1). מוטציית חסר לשני גנים אלה מונעת התמיינות פרחים, ואילו ביטוי ביתר של שני גנים אלה גורם להתמיינות מוקדמת מאוד של פרח טרמינלי. הגן AP1 קובע את זהות מריסטמת הפרח ובנוסף מעורב בבקרה של התמיינות אברי הפרח השונים. הפרומוטור לגן AP1 מכיל רצף בסיסים אליו נקשר החלבון LFY במבחני *in vitro*. למרות שאין הוכחה *in vivo* כי רצף זה הכרחי לשעתוק AP1 על ידי LFY בצמח, ההנחה היא כי הגן LFY מבקר ישירות את הביטוי של AP1. בשלב בו נקבעת זהות מריסטמת הפרח ניתן לזהות את תעתיקי הגן AP1 בכל הרקמה, אך עם תחילת התמיינות אברי הפרח השונים ביטוי הגן AP1 מוגבל לדורים של עלי הגביע ועלי הכותרת (Jack, 2004).

המנגנון המולקולרי המבקר את פעילות הגנים האחראים לזהות אברי הפרח מודגם במודל ה-ABC (Meyerowitz *et al.*, 1991), המבוסס בעיקר על מחקרים בצמחי המודל ארבידופסיס ולוע הארי. המודל מתאר פעילות משולבת של גנים משלוש משפחות שונות – A, B, C המאפיינים את ארבעת אברי הפריחה - עלי גביע, עלי כותרת, אבקנים, ושחלות: בעלי הגביע פעילים גנים מסוג A, בעלי הכותרת פעילים גנים מסוג A ו-B, באבקנים פעילים גנים מסוג B ו-C, ובשחלות פעילים גנים מסוג C. הגנים מסוג A כוללים את AP1 ואת APETALA2 (AP2) מארבידופסיס ואת SQUAMOSA (SQUA) ו-LIPLESS (LIP1/2) מלוע הארי. הגנים מסוג B כוללים את APETALA3 (AP3) ו-PISTILLATA (PI) מארבידופסיס ואת DEFICIENS (DEF) ו-GLOBOSA (GLO) מלוע הארי. הגנים מסוג C כוללים את AGAMOUS (AG) בארבידופסיס ואת PLENA (PLE) ו-FARINELLI (FAR) מלוע הארי. לאחרונה הורחב מודל ה-ABC: גנים מסוג D, שזוהו תחילה בפטוניה, נמצאו כמבקרים את התמיינות הביציות (Jack, 2004). לאחרונה הוגדרו בארבידופסיס גנים מסוג E: SEPALLATA1/2/3/4 (SEP1, SEP2, SEP3, ו-SEP4). לגנים מסוג E השפעה על התפתחות עלי הכותרת, אבקנים, שחלות וזהות מריסטמה (Jack, 2004).

במוטנטים הפגועים בגנים השונים ממודל ה-ABC מתרחשת החלפה הומיאוטית (Homeotic Transformation) של איברי הפרח. כתוצאה מפגיעה בפעילות גן מסוים בדור ספציפי והמשך פעילות הגנים האחרים באותו דור, לא מזוהה דור האיברים כהלכה. איברי הפרח שנוצרים בדור זה מוחלפים באיברים טיפוסיים לדורים האחרים של הפרח, בהתאם לדגם ביטוי הגנים ההומאויטיים. אללים שונים של אותו גן יכולים לגרום לדרגות שונות של חומרת הפנוטיפ וליצירת איברי ביניים בעקבות החלפה המיאוטית לא מלאה של איברים.

**גנים מסוג A** - הגן AP1 הוא כאמור בעל תפקיד כפול בקביעת זהות מריסטמת הפרח ואברי הפרח השונים. במוטנט *ap1-1* רוב עלי הכותרת חסרים ובפרחים הנוצרים בשלב

מאוחר יותר אברי דורים 1 ו-2 אינם מתפתחים כלל. במוטנט של הגן AP2 מתמיינים על גבי הפרח שחלות במקום עלי גביע ואבקנים במקום עלי כותרת (Jack, 2004).

**גנים מסוג B** - חיוניים להתמיינות עלי הכותרת והאבקנים בפרח. מוטציית loss of function של גנים אלה גורמת להפיכת עלי הכותרת לעלי גביע והאבקנים הופכים לעלי שחלות (Zik and Irish, 2003). העובדה כי ביטוי הגנים AP3 ו-PI הכרחי לקבלת פנוטיפ נורמאלי, וכן הממצא לפיו במבחני *in vitro* יוצרים שני החלבונים תוצרי הגנים הטרודימר הנקשר ל-DNA, מרמזים כי גנים אלו פועלים יחדיו (Jack, 2004; Whipple *et al.*, 2004). ביטוי הגנים מסוג B בארבידופסיס ספציפי לפרחים. כאשר הקומפלקס AP1+SEP+AP3/PI מבקר התמיינות עלי כותרת והקומפלקס AG+SEP+AP3/PI מבקר התמיינות אבקנים (Jack, 2004). לא ברור עדיין מה היא הבקרה של ביטוי הגנים מסוג B, אם כי בארבידופסיס נמצא כי הגן LFY פועל יחד עם הגנים UFO ו-AP1 להפעלת הגן AP3. העובדה כי ביטוי AP3 בארבידופסיס אינו מופסק במוטנט כפול לשני גנים אלו מרמזת כי גנים נוספים מעורבים בבקרה על שיעתוק גן זה (Jack, 2005; Krizek *et al.*, 2004). באללים בעלי פנוטיפ חזק של מוטנטים מסוג B מתרחשת החלפת בסיס יחיד הגורמת להחלפת חומצה אמינית בקודון פסק. באללים המתונים יותר מתרחשת החלפת חומצה אמינית אחת באחרת (Goto and Meyerowitz, 1994).

**גנים מסוג C** - במוטנט *ag* מתפתחים עלי כותרת במקום אבקנים. במקום שחלה מתפתח במוטנט פרח משני המכיל גם הוא דור ראשון עם עלי גביע, דור שני עם עלי כותרת ודור שלישי עם עלי כותרת במקום אבקנים (Mizukami and Ma, 1995).

**גנים מסוג E** - מוטציות *sep1*, *sep2*, *sep3* ו-*sep4* בארבידופסיס גורמות ליצירת פרח הבנוי כולו מעלי גביע. אורתולוגים לגנים אלה זהו בפטוניה ועגבניה ונמצא כי הם הכרחיים להתפתחות תקינה של הפרח. גנים אלו יוצרים קומפלקס חלבוני עם גנים מסוג A, B ו-C המבקר את התמיינות עלי הכותרת, האבקנים והשחלה (Jack, 2004; Krizek *et al.*, 2005).

## 2.6.2 גנים מסוג MADS box

רוב הגנים ממודל ה-ABCDE מקודדים לחלבונים בעלי איזור ייחודי הנקרא MADS box domain, ומתפקדים כבקרי שעתוק, מלבד הגן AP2 המקודד לחלבון בעל אתר (domain) אחר. השם MADS נגזר משמותיהם של ארבעת הגנים הראשונים ששובטו ממשפחה זו: MCM1, AG, DEFA, SRF. גנים מסוג MADS box מקודדים לפקטורי שעתוק ונמצאו בצמחים, בעלי חיים, ופטירות. בצמחים פורחים (flowering plants) גנים אלו מקודדים לפקטורי שעתוק המבקרים מגוון של תהליכים התפתחותיים, החל מיצירת השורשים ועד יצירת הפרח והתפתחות הפרי. ניתוח רצף חומצות האמינו ב-MADS box domain של גנים ממגוון אורגניזמים מראה כי דופליקציה שחלה באב הקדמון המשותף לצמחים ובעלי חיים

הביאה ליצירת שתי קבוצות המכונות Type I ו-Type II, המהוות מקור לכל הגנים מסוג MADS box. במהלך הזמן, לאחר היפרדות ענפי הצמחים ובעלי החיים, הביאו תהליכי דופליקציה נוספים לחלוקות לתתי משפחות בצמחים, כאשר הגנים המבקרים את הפריחה התפתחו לפני 700-750 מליון שנה לערך (Nam *et al.*, 2003).

רוב הגנים הצמחיים ממשפחת MADS box הם מסוג Type II ומורכבים מ: אתר MADS הקושר את ה-DNA (M), ושלושה אזורים נוספים בנוסף ל-MADS domain המכונים: אתר Intervening (I), אתר דמוי קראטין (K) והקצה ה-C טרמינלי. ה-MADS box domain מורכב מכ-55 חומצות אמינו ונמצא בקצה ה-N טרמינלי של החלבון. רצף חומצות האמינו באזור זה שמור מאוד בין הגנים השונים. במרכז הגן נמצא אתר ה-K domain. אזור זה מורכב מ-70 חומצות אמינו ומשמש לקישור חלבון - חלבון ומאפשר דימריזציה של חלבונים המבטאים אזור זה עם חלבונים נוספים. בין ה-MADS box domain ל-K domain מפריד אזור I המורכב מכ-30 חומצות אמינו. הקצה ה-C טרמינלי של החלבון בעל רצף משתנה של חומצות אמינו וגודלו משתנה בין גן לגן (Nam *et al.*, 2003). גנים אלו נקראים MICK type והם ספציפיים לצמחים. גנים צמחיים ממשפחת ה-MADS box השייכים לקבוצה Type I וחסרים את אתר ה-K domain התגלו לאחרונה בארבידופסיס אולם הם אינם חלק ממשפחות הגנים ABCDE הקשורות לבקרת מבנה הפרח (Kofuji *et al.*, 2003).

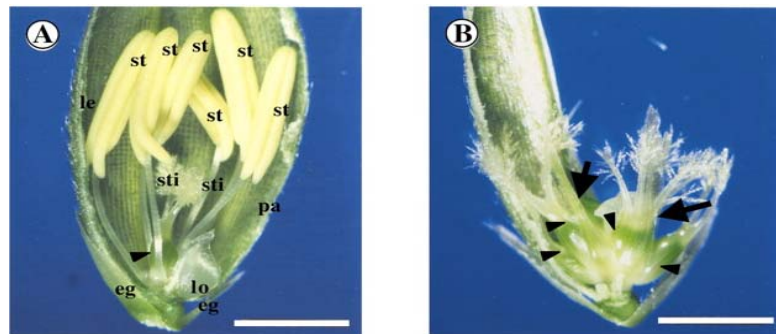
### 2.6.3 שימור גנים מסוג MADS box

במחקרים רבים נמצא שמודל ה-ABC שמור מאוד בצמחים דו-פסיגיים. בשנים האחרונות זוהו גנים הומולוגים רבים לגנים מדו-פסיגיים מסוג MADS box במגוון מינים חד-פסיגיים (Nagasawa *et al.*, 2003; Zik and Irish, 2003; Whipple *et al.*, 2004; Mena *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 1998) בהם הידע יותר מצומצם. רוב הידע הקיים על גנים אלו בצמחים חד-פסיגיים מתבסס על סדרת הדגנאים ומעט על סדרות האספרגאים, ושושנאים. נמצא שלמרות השונות במורפולוגיה, האפיונים הבסיסים של התפתחות הפרח שמורים גם בין צמחים מרוחקים מבחינה אבולוציונית. בתירס, הגן SILKY1 הינו אורתולוג של AP3 והגנים Zmm16 ו-Zmm18 אורתולוגים של PI מארבידופסיס. מוטציה בגנים אלה מביאה להחלפת אבקנים בשחלות וקשקשי התפיחה מוחלפים בחפים הדומים למוץ העליון והתחתון. פנוטיפים אלה דומים לפנוטיפ המוטנטיים בגנים האורתולוגיים מארבידופסיס. בהשוואת תיפקוד גנים מסוג B בתירס וארבידופסיס, מצאו שהחלבונים מסוג B מתירס יצרו *in vitro* הטרודימר הנקשר ל-DNA, כמו החלבונים מסוג B מארבידופסיס. בנוסף גנים אלה יכלו להשלים (complementation) מוטנטיים של ארבידופסיס מסוג B (Whipple *et al.*, 2004). בתירס אופיינו גם הגנים ZAG1 ו-ZMM2, ההומולוגים לגן AG. מוטציה בגן ZAG1 לא גורמת לפגיעה בזהות האיברים אך פוגעת בדטרמיננטיות. הגן ZAG1 בעל דפוס ביטוי דומה לגן AG, בעוד הגן ZMM2 בעל דפוס ביטוי שונה וכנראה בעל פעילות חופפת אך לא זהה

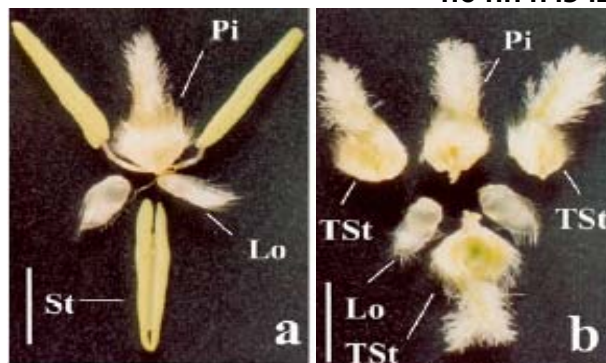
AP1 ל-ZAG1 (Mena *et al.*, 1996). בנוסף, אופיין בתירס הגן ZAP1 ההומולוג לגן AP1 מארבידופסיס. גן זה הינו בעל דפוס ביטוי דומה לגן מארבידופסיס (Schmidt *et al.*, 1993). באורז אופיינו הגנים SUPERWOMAN1 (SPW1), אורתולוג של AP3 מארבידופסיס המתבטא בפרח בלבד, והגנים OsMADS2 ו-OsMADS4 שהינם אורתולוגים ל-PI מארבידופסיס. מוטציה בגנים אלה גורמת להחלפה הומאוטית של אבקנים וקשקשי התפיחה לשחלות ולמבנים דמויי מוץ עליון בהתאמה (איור 3א') (Bommert *et al.*, 2005; loss of function בגן זה גורמת ליצירת מבנים דמויי קשקשי תפיחה בדור השלישי ובדור הרביעי, ליצירת מספר פרחים לא נורמאליים במקום שחלות. פנוטיפים אלה דומים לפנוטיפ המוטנט ag מארבידופסיס (Kang *et al.*, 1998). Yamaguchi וחבריו (2006) איפיינו גנים מסוג A מאורז הנקראים OsMADS14 ו-OsMADS15, המראים דפוס ביטוי דומים לגן AP1 מארבידופסיס.

### איור 3 - החלפת איברים הומאוטית בפרחים חד-פסיגיים

#### א. פרח האורז



#### ב. פרח החיטה



א: פרח אורז w.t. הבנוי מוץ עליון (pa) ומוץ תחתון (le), שני קשקשי תפיחה (lo), שישה אבקנים (st), עלי (מסומן בחץ) המכיל שתי צלקות (sti) ושתי גלומות (eg). B- פרח מוטנט spw1 בו האבקנים וקשקשי התפיחה הופכים לשחלות (חץ גדול) ולאיברים דמויי מוץ עליון (חץ קטן) בהתאמה (מתוך Nagasawa *et al.*, 2003).  
 ב: a - אברי פרח נורמאלי של חיטה. שלושה אבקנים (st) עלי (pi) וקשקשי תפיחה (lo). b- אברי פרח חיטה אלופלסמית (alloplasmic), המכילה ציטופלסמה של מין בר קרוב משפחה, שלושת האבקנים הופכים לאברים דמויי שחלות (TSt) (מתוך- Hama *et al.*, 2004).

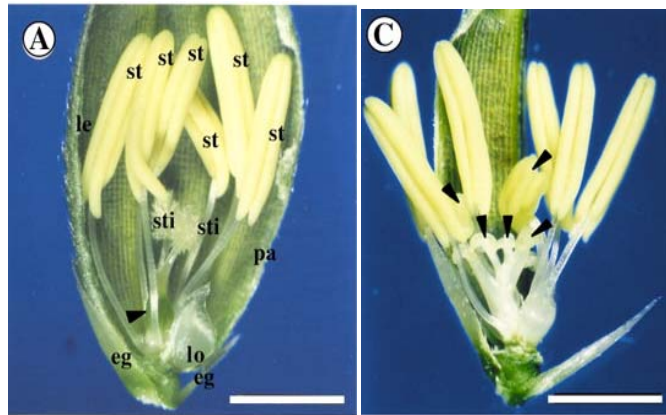
בחיטת הלחם (*Triticum aestivum*) אופיינו הגנים WAP1 ו-WAP12 האורתולוגים ל-PI מארבידופסיס והגן WAP3 האורתולוג לגן AP3 מארבידופסיס. בקווי חיטת לחם אלופלסמית (alloplasmic), המכילים ציטופלסמה של מין בר קרוב משפחה, נצפתה בעקבות פגיעה בגנים אלו החלפה הומיאוטית של אבקנים לאברים דמויי שחלות ללא שינוי בקשקשי התפיחה (איור 3ב') (Hama *et al.*, 2004).

#### 2.6.4 גנים שאינם מסוג MADS BOX המשפיעים על התפתחות אברי הפרח

נמצאו גנים נוספים שאינם חלק ממודל ה-ABC המשפיעים על התפתחות אברי הפרח הפנימיים לשחלות ולאבקנים. בין גנים אלה יש לציין את הגן SUPERMAN (SUP) בארבידופסיס, האחראי על יצירת הגבול בין אבקנים לשחלות, כנראה ע"י בקרה של חלוקת תאים. מוטציה בגן זה גורמת לפנוטיפ של ריבוי אבקנים על חשבון שחלות. צמחי ארבידופסיס בעלי ביטוי יתר של SUP הינם ננסיים - עובדה המרמזת על תפקוד הגן SUP בבקרת חלוקת תאים. ביטוי יתר של הגן SUP מארבידופסיס באורז גרם גם לירידה במספר האבקנים וליצירת איברים מאוחים אבקן-שחלה (Nandi *et al.*, 2000). במוטציות ובצמחים מותמרים בהם חלה ירידה כללית במתילציה בגנום, נראתה עליה משמעותית במתילציה של הגן SUP שגרמה להשתקו ולעליה במספר האבקנים (Jacobsen *et al.*, 2000).

הגן CRABS CLAW (CRC) מארבידופסיס שייך לגנים בעלי איזור YABBY ומשפיע על התפתחות השחלה ועל התפתחות הצוף בפרח (Bowman and Smyth, 1999). גן דומה זוהה גם בחד-פסיגיים ונקרא באורז Drooping leaf (DL). לחלבון זה שני תפקידים: בניית העורק הראשי בעלה ובקרת התפתחות השחלה. פרחים עם מוטציית loss of function בגן זה הינם בעלי אבקנים מרובים על חשבון השחלות (איור 4). פנוטיפ זה דומה לפנוטיפ של מוטציית SUPERMAN בארבידופסיס (Yamaguchi *et al.*, 2004). בפרחים עם אלל בעל פנוטיפ חלש יותר ישנה עליה במספר האבקנים, והשחלות מפגינות לפעמים מבנים ורקמות המאפיינים אבקנים. בצמחים דו-פסיגיים לא נמצאו מוטציות פליאוטרופיות דומות המשפיעות בו זמנית על עורק העלה ועל התפתחות השחלות, יתכן שלגן DL תפקיד ייחודי בצמחים חד-פסיגיים (Nagasaw *et al.*, 2003).

#### איור 4 - החלפת איברים הומאטית במוטנט dl-sup1



A - פרח אורז w.t המכיל שישה אבקנים (st), מוץ עליון (le), מוץ תחתון (pa), שני קשקשי תפיחה (lo) ועלי אחד (מסומן בראש חץ). C - פרח dl-sup1 - עלי השחלה הופכים לאבקנים (מסומן בראשי חץ) (מתוך - Nagasawa *et al.*, 2003).

גן נוסף הינו הגן CLAVATA (CLV) מארבידופסיס החשוב לקביעת זהות וגודל המריסטמה. מוטציות בגן זה מגדילות את המריסטמה ומביאות לעליה במספר האיברים. המוטנטים *clv1*, *clv2* ו-*clv3* גורמים להצטברות תאים במריסטמת הנצר והפרח, כתוצאה מהגדלת המריסטמה נוצרים איברי פרח עודפים (Clark *et al.*, 1993). באורז זוהה גן אורתולוגי ל-*CLV1* בשם FLORAL ORGAN NUMBER1 (FON). מוטציה בגן גורמת להגדלת מריסטמת התפרחת ולעליה במספר אברי הפרח (Suzaki *et al.*, 2004). גן נוסף בעל תפקיד ידוע המבקר את מיבנה התפרחת והפרח הוא FILAMENTOUS FLOWER (FIL). לגן זה שלושה תפקידים במהלך התפתחות הפרח - ביסוס גנים שתפקידם לקבוע את זהות מריסטמת הפרח, עידוד יצירת הפרח ומיסוד דפוס ביטוי הגנים בתוך הפרח המתפתח. FIL דרוש לפעילות מרחבית נכונה של הגנים AG, AP3, PI ו-SUP. מוטנט *fil* יוצר פרח עם מספר לא תקין ולא מאורגן של איברי פרח ואבקנים לא מפותחים (Sawa *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999). ההומולוג לגן FIL באורז הינו OsYAB1. ביטוי יתר של הגן גורם ליצירת פרח לא נורמאלי המכיל מספר רב של אבקנים ושחלות (Jang *et al.*, 2004).

### 2.7. עצי תמר חריגים מתרבית ריקמה בעלי 'חנטה לקויה' ו'ריבוי שחלות'

חלק גדול מעצי התמר מהזן 'ברהי' (ומזנים נוספים) שמקורם מתרבית רקמה מאופייניים ב'חנטה לקויה'. בארץ ניטעו כ-1500 עצים כאלה מהזן 'ברהי' (כ-50% מעצי ה'ברהי' מתרבית ריקמה שנטעו עד היום בארץ) וכמה מאות עצים דומים מהזן 'חלאס' (Cohen *et al.*, 2004). הבעיה מקיפה אלפים רבים של עצים בעולם. בערב הסעודית, ניטעו כ-100,000 עצים בעלי פנוטיפ דומה (Al-Wasel, 2001; Djerby, 2000). בעצים חריגים אלה מתפתחים החנטים לפירות פרתנוקרפיים משולשים או לפירות מרובי שחלות (איור 5) (Al-

הפירות (Wasel, 2001; Zaid and Al-Kaabi, 2003; Cohen *et al.*, 2004). הפרתנוקרפיים המתפתחים מפרחים אלה הינם חסרי ערך כלכלי (Cohen *et al.*, 2004); (McCubbin, 2000; Zaid, 1999). בהסתכלות מיקרוסקופית נמצא (בעיקר בפרחים מרובי שחלות, אבל גם בחלק מהפרחים בעלי שלוש שחלות בעצים בעלי 'חנטה לקויה') בנוסף עיוותים במבנה השחלות והצלקות. ככל הנראה עיוותים אלה מונעים את צמיחת נחשוני גרגרי האבקה לעומק הצלקת ובשחלה (Cohen *et al.*, 2004).

איור 5 - 'ריבוי שחלות' בפרי תמר מהזן 'ברהי'



A: 1 - חנט שהופרה באופן תקין, 2 - פרי פרתנוקרפי יחיד בו שתיים משלושת השחלות התנוונו, 3 - פרי פרתנוקרפי משולש. B, C - ריבוי איברים דמויי שחלות בחנטים פרתנוקרפים משולשים. החצים מצביעים על שחלות מוספות (מתוך- Cohen *et al.*, 2004).

הפנוטיפי החריג של עצי הזן 'ברהי' מתרבית ריקמה מתבטא ב'חנטה לקויה' וב'ריבוי שחלות' אולם, אחוז גבוה של 'חנטה לקויה' בעץ לא מחייב גם אחוז גבוה של 'ריבוי שחלות'. בעבודה זאת הגדרנו 'פנוטיפ חמור' שכלל עצים בעלי 'חנטה לקויה' המתבטאת בכ-30-65% פירות פרתנוקרפיים בהם מתפתחות כל שלוש השחלות ומעל-15% פירות 'מרובי שחלות', ו'פנוטיפ חלש' שכלל עצים בעלי 'חנטה לקויה' המתבטאת בכ-30-65% פירות פרתנוקרפיים בהם מתפתחות כל שלוש השחלות וכ-0-5% חנטים 'מרובי שחלות' (בחלק מהעצים לקויי החנטה לא נמצאו כלל חנטים מרובי שחלות).

בעצי תמר חריגים שרובו בתרבית ריקמה התגלתה שונות רבה בחומרת הפנוטיפ בין מטעים שונים בני אותו גיל (אפילו עם מקור התרבית הוא דומה), בין עצים שונים בחלקה ואף בין



אשכולות שונים על אותו עץ. במרבית העצים החריגים התגלה שיפור של רמות החנטה, וירידה ברמת הפירות המשולשים והפירות מרובי השחלות עם הזמן. בעצים אלה תופעת 'ריבוי השחלות' נעלמת באופן הדרגתי לפני תופעת 'החנטה הלקויה'. בהשוואה של עצים מגילאים שונים שמוצאם באותה מעבדה של תרבות ריקמה, עולה כי שעור החנטה בעצים בני 4-5 שנים נע בין 0-20%, בעצים בני 6-7 שנים כ-70% מהעצים חונטים ובעצים רבים שגילם מעל 10 שנים החנטה מלאה (Cohen et al., 2004). יחד עם זאת, העבודה הקודמת שנעשתה אינה פוסלת את האפשרות שבין העצים החריגים ישנם גם עצים שהפנוטיפ שלהם אינו משתפר כלל.

## 2.8. 'Mantled' - מופע חריג של דקל השמן

תופעה דומה לבעיות החנטה ו'ריבוי השחלות' בעצי התמר התגלתה גם בעצי דקל השמן (*Elaeis guineensis* Jacq.) שנוצרו בתרבות ריקמה (Corley et al., 1986). דקל השמן שייך למשפחת הדקליים והינו קרוב בוטנית לתמר. כ-5% מעצי דקל השמן שנוצרו בשיטה של אמבריוגנזה הם בעלי פנוטיפ ייחודי - 'Mantled'. פנוטיפ זה מתאפיין בשיעורי חנטה נמוכים מאוד וב'ריבוי שחלות'. ברוב העצים התופעה מתמתנת במהלך ההתבגרות, ולאחר מספר שנים במטע העצים הופכים לנורמאליים (Rival et al., 1998b). בפנוטיפ ה-'Mantled' מתרחשת בפרחים הנקביים החלפה הומיאוטית של אבקנים מנוונים למבנים דמויי שחלה, בעוד שבדורים החיצוניים לא ניכרים שינויים. במיקרוסקופ אלקטרוני לא נצפו הבדלים בין פרח חריג לפרח נורמאלי בשלבים ראשוניים של התפתחות הפרח, אך בשלב מאוחר של ההתפתחות היה ניתן להבחין באיברים דמויי שחלות המתפתחים במקום האבקנים המנוונים (Adam et al., 2005). השוואת הפנוטיפ 'Mantled' לפנוטיפ ה'חנטה הלקויה' ו'ריבוי השחלות' בתמר מוצגת בטבלה 1.

באפיון מולקולארי של עצי 'Mantled' לא נמצאו שינויים ברצף ה-DNA באסוציאציה לפנוטיפ זה (Rival et al., 1998a). ואולם נמצא שה-DNA של עצי 'Mantled' ממותל בשעור נמוך יותר של 0.5-2.5% בהשוואה לעצים הנורמאליים (Jaligot et al., 2000). בנוסף, נמצאו הבדלים בדגמי המתילציה בין עצי 'Mantled' לעצים נורמאליים מאותו מקור גנטי (clone), אולם אלה לא אפיינו את כלל העצים החריגים מקלונים אחרים (Jaligot et al., 2004). תוצאות אלה מצביעות על כך שפנוטיפ 'Mantled' קשור ככל הנראה לשונות אפיגנטית המתבטאת ברמת ובדפוס המתילציה של ה-DNA (ולא ברצף הבסיסים). נמצא קשר בין הפנוטיפ החריג 'Mantled' בעצי דקל השמן מתרבות ריקמה לתהליך יצור צמחי תרבות הריקמה. תדירות פנוטיפ זה מושפעת כנראה מהיחס בין ההורמונים אוקסין וציטוקינין במצע הגידול ומתדירות החלפת המצע (Eeuwens et al., 2002).

טבלה 1 - השוואת הפנוטיפ 'Mantled' בדקל השמן לפנוטיפ החריג בזן 'ברהי'

תכונה	'Mantled' דקל שמן	'חנטה לקויה' ב'ברהי'
יצירת איברים מרובים דמויי שחלות	+	+
עקרות חלקית או מלאה של פרחים	+	+
תדירות	תדירות של כ-5% מהעצים שנוצרו באמבריוגנזה. נפוץ מאוד בתרביות רקמה ממקורות או קלונים מסוימים.	תדירות של כ-5% מהעצים שנוצרו באמבריוגנזה. נפוץ מאוד בתרביות רקמה ממקורות או קלונים מסוימים.
שונות גנטית	לא נמצאה שונות גנטית בקורלציה עם הפנוטיפ	לא נמצאה שונות גנטית בקורלציה עם הפנוטיפ
שיפור המופע עם הזמן	ב'פנוטיפ החלש' 100% מהעצים חוזרים להיות נורמאליים תוך 9 שנים מנטיעה. ב'פנוטיפ החמור': 50% חוזרים להיות נורמאליים תוך 9 שנים מנטיעה.	ב'פנוטיפ החמור' לאחר עשר שנים מנטיעה יותר מ-50% מהעצים החריגים חוזרים לפנוטיפ נורמאלי.

מקורות: דקל השמן - Matthes *et al.*, 2001; Eeuwens *et al.*, 2002; 2002; Jaligot *et al.*, 2000; 2002; 'ברהי'- כהן וחוב' 2003; 2004; Cohen *et al.*.

### 2.8.1 איפיון גנים מבקרי פריחה בדקל השמן

Adam וחובריו (2006) זיהו בדקל השמן 13 גנים מסוג MADS box השייכים לחמש תת משפחות:

**תת קבוצה SQUAMOSA:** זוהו שלושה גנים EgSQUA1, EgSQUA2 ו-EgSQUA3 בעלי הומולוגיה של כ-55% ברמת החלבון ל-AP1 מארבידופסיס. EgSQUA1 מתבטא בתפרחות בלבד בניגוד ל-EgSQUA2 ו-EgSQUA3 המתבטאים גם בחלקים וגטיביים. EgSQUA1 מתבטא ברמה קבועה במהלך כל שלבי התפתחות הפרח.

**תת קבוצה GLOBOSA:** זוהו שני גנים EgGLO1 ו-EgGLO2 בעלי הומולוגיה של כ-60% לחלבון PI מארבידופסיס ובעלי הומולוגיה של 70% לחלבון OsmADS2 מאורז (Adam *et al.*, 2005). הגן EgGLO1 משלים (complementation) את המוטנט pi בארבידופסיס (Alwee *et al.*, 2006).

**תת קבוצה DEFICIENS:** זוהה גן אחד, EgDEF1, בעל הומולוגיה של כ-53% לחלבון AP3 מארבידופסיס ובעל הומולוגיה של כ-70% לחלבון OsMADS16 מאורז. EgDEF1 מיתבטא כבר בשלבים מוקדמים בהתפתחות התפרחת הנקבית.

**תת קבוצה AGAMOUS:** זוהו שני גנים EgAG1, EgAG2 בעלי הומולוגיה של כ-60% לחלבון AG מארבידופסיס ובעלי הומולוגיה של 70% לחלבון OsMADS3 מאורז.

**תת קבוצה AGAMOUS-like2:** זוהו חמישה גנים: EgAGL2-1, EgAGL2-2, ו-EgAGL2-3 הם בעלי הומולוגיה גבוהה של כ-70% ברמת החלבון ל-SEP3 מארבידופסיס. הגנים EgAGL2-4 ו-EgAGL2-5 דומים לחלבון OsMADS34 מאורז.

### 2.8.2 גנים בעלי דפוסי ביטוי שונים באסוציאציה לפנוטיפ 'Mantled'

פנוטיפ ה-'Mantled' הינו בעל מופע מוגדר מאוד ומכאן יתכן שמדובר ב"פגיעה" במספר קטן של גנים ספציפיים (או גן יחיד). גישת הגנים המועמדים מאפשרת לבחון גנים מועמדים המעורבים ביצירת הפנוטיפ על פי ידע מוקדם. בגישה זו השתמשו בהצלחה בבני אדם, בבעלי חיים ובצמחים (Pflieger *et al.*, 2001). הדמיון בין הפנוטיפ של צמחים הפגועים בגנים מסוג B כגון AP3 ו-PI מארבידופסיס ו-SPW1, OsMADS2 ו-OsMADS4 מאורז לפנוטיפ ריבוי השחלות בתמר ובדקל השמן, וקיומה של החלפת איברים הומאוסית של אבקנים מנוונים לשחלות מרמזים שיתכן וגנים מסוג B מעורבים גם ביצירת הפנוטיפים החריגים בתמר ובדקל השמן.

Adam וחבריו (2007) השוו את רמות הביטוי של מספר גנים המבקרים את התפתחות הפרח בין תפרחות מעצים נורמאליים לבין תפרחות מעצים חריגים ('Mantled') בדקל השמן. רמת הביטוי של גנים מסוג A, B, C, ו-E נבדקה בחמישה שלבי התפתחות שונים של הפרח השלם בשיטה של semi-quantitative RT-PCR. בשיטה זו נמצאה ירידה ברמת הביטוי של גנים מסוג B, C, ו-E בתפרחת הנקבית החריגה. ביטוי הגנים EgGLO2, EgAGL2-1 ו-EgAG2 בתפרחת החריגה היה נמוך יותר כבר בשלב ראשוני בהתפתחות הפרח. הירידה החדה ביותר בביטוי התקבלה בגן EgDEF1 בתפרחת הנקבית החריגה. ביטוי EgDEF1 בתפרחת החריגה היה נמוך באופן משמעותי כבר מהשלב המוקדם של יצירת עלי העטיף ועד שלב מתקדם של התפתחות הפרח.

גן נוסף שהראה דפוסי ביטוי שונים באסוציאציה לפנוטיפ 'Mantled' הוא הגן EGAD1. EGAD1 מקודד לחלבון בעל 77 חומצות אמינו המראות דמיון גבוה לחלבונים מסוג defensin, כמו PTT מפטוניה. לחלבונים אלה תפקיד בהגנה על הצמח בתנאי עקה שונים. מערכות ההגנה יכולות להיות מופעלות בתגובה לתנאי עקה הנוצרים בתרבית הרקמה או בהשפעות חומרי צמיחה המוספים לתרבית. יתכן שתנאי עקה אלה אחראים לחלק מהשונות הסומקולונית בצמחי תרבית רקמה. בשלבים מוקדמים של ההתפתחות בקאלוס נמצאה עליה בביטוי הגן EGAD1 באסוציאציה עם פנוטיפ 'Mantled', לעומת ביטוי חלש של הגן

בקאלוס נורמאלי. בשלבים המאוחרים של התפתחות קאלוס מצמח 'Mantled' רמת הביטוי של הגן הייתה נמוכה מאוד. לא נמצאו הבדלים ברמת הביטוי בשלב התפרחות בין עץ נורמאלי לעץ חריג (Tregear *et al.*, 2002).

שני גנים נוספים בהם נמצאו דפוסי ביטוי שונים באסוציאציה לפנוטיפ 'Mantled' הם EglAA1 ו-EgM39A. נמצאה עלייה בביטוי הגנים EglAA1 ו-EgM39A בקאלוסים מעצים חריגים ('Mantled') לעומת קאלוסים מעצים נורמאליים. EglAA1 מקדד לחלבון הדומה לגן מארבידופסיס הקשור לתגובה מוקדמת לאוקסין, והגן EgM39A מקדד לחלבון בעל תפקוד לא ידוע. בהשוואת ביטוי הגן EgM39A בין קאלוס נורמאלי לבין קאלוס מצמח 'Mantled' ובין תפרחת נורמאלית לחריגה נמצא שביטוי הגן גבוה יותר בקאלוס החריג לעומת הקאלוס הנורמאלי ואולם לא נמצאו הבדלים בביטוי הגן בין תפרחות נורמאליות לתפרחות חריגות (Morcillo *et al.*, 2006).

## **2.9. מטרות העבודה**

מטרת העבודה היא בידוד ואפיון גנים מועמדים המבקרים את התפתחות אברי הפרח בתמר ובחינת מעורבותם ביצירת פנוטיפ ה'חנטה הלקויה' ו'ריבוי השחלות'.  
פירוט המטרות:

1. זיהוי ואפיון גנים המבקרים את התפתחות אברי הפרח בתמר על בסיס הומולוגיה של גנים אורתולוגים ממינים אחרים.
2. השוואת דגם המתילציה בגנים המבקרים את התפתחות אברי הפרח בתמר בין עצים חריגים לעצים נורמאליים.
3. השוואת רצף הבסיסים בגנים המבקרים את התפתחות אברי הפרח בתמר בין עצים חריגים לעצים נורמאליים.
4. השוואת רמות הביטוי של גנים המבקרים את התפתחות אברי הפרח בפרחי תמר בין עצים חריגים לעצים נורמאליים.

### 3. חומרים ושיטות

#### 3.1. חומר צמחי

החומר הצמחי כלל עצי תמר מהזן 'ברה' ממטעים שונים, שרובו מחוטרים או בתרבית ריקמה. נבדקו עצים נורמאליים ועצים חריגים בעלי פנוטיפ של 'חנטה לקויה' ו'ריבוי שחלות'. העלעלים (הוצים) של עלים צעירים נשטפו במים, נחתכו לגזרים קטנים והוקפאו ב-80 °C. התפרחות של עצי הנקבה הוסרו במצב של טרום-פתיחה (לפני שהמתחלים נבקעו) והועברו בקירור למעבדה, בה הפרחים הופרדו מהסנסנים והוקפאו ב-80 °C. העצים הנורמאליים והעצים החריגים מתרבית הרקמה, ששימשו לאנליזת דגמי המתילציה ורצף הבסיסים, מתוארים בטבלה 2. פירוט העצים ששימשו לבדיקת דגם הביטוי מופיעים בטבלה 3.

#### טבלה 2 - עצים ששימשו לאנליזות דגמי המתילציה ורצף הבסיסים

שם העץ	מקור ריבוי	מטע	שנת נטיעה	פנוטיפ	האנליזה*
A1	חוטר	יבניאל	2002	נורמאלי	2
A3	חוטר	יבניאל	2002	נורמאלי	2
A4	חוטר	בית זרע	1992	נורמאלי	2
A5	חוטר	בית זרע	1992	נורמאלי	2
A7	חוטר	יטבתה	1992	נורמאלי	1+2
A20	תרבית רקמה	בית זרע	1999	נורמאלי	2
A22	תרבית רקמה	בית זרע	2000	נורמאלי	2
A23	תרבית רקמה	בית זרע	2000	נורמאלי	2
א	תרבית רקמה	צמח	1999	נורמאלי	2
ג	תרבית רקמה	יטבתה	1998	חנטה לקויה וריבוי שחלות	1+2
ד	תרבית רקמה	יטבתה	1998	חנטה לקויה וריבוי שחלות	2
ה	תרבית רקמה	יטבתה	1998	חנטה לקויה וריבוי שחלות	2
ו	תרבית רקמה	יטבתה	1998	חנטה לקויה וריבוי שחלות	2
ז	תרבית רקמה	יטבתה	1998	חנטה לקויה וריבוי שחלות	2
ח	תרבית רקמה	יטבתה	1998	חנטה לקויה וריבוי שחלות	2

\* 1- אנליזה של דגמי מתילציה, 2- אנליזה של רצף הבסיסים

### טבלה 3 - עצים ששימשו לבדיקת דגם הביטוי

שם	מטע	מקור ריבוי	פרי נורמאלי (%)	מספר שחלות פרתנוקרפיות						
				1	2	3	4	5	6	
*J	יטבתה	תרבית רקמה	0.6	0.7	0.0	65.0	12.0	2.0	1.0	15.0
*K	יטבתה	תרבית רקמה	7.0	2.0	0.0	48.0	8.0	5.0	3.0	16.0
*G	יטבתה	תרבית רקמה	4.3	2.5	0.5	31.0	19.0	11.0	15.0	45.0
**9	יטבתה	תרבית רקמה	12.0	2.0	0.8	53.0	2.0	0.0	0.0	2.0
**10	יטבתה	תרבית רקמה	13.0	1.0	0.0	27.0	0.5	0.0	0.0	0.5
**11	יטבתה	תרבית רקמה	13.0	4.0	0.4	47.0	5.0	0.4	0.0	5.4
**12	יטבתה	תרבית רקמה	1.3	0.8	0.4	66.0	2.0	0.0	0.0	2.0
**13	יטבתה	תרבית רקמה	9.0	0.5	0.0	72.0	0.0	0.0	0.0	0.0
**14	יטבתה	תרבית רקמה	12.0	3.0	0.4	41.0	3.0	0.4	0.0	3.4
**16	יטבתה	תרבית רקמה	7.0	1.0	2.0	39.0	3.0	0.0	0.0	3.0
*E	יטבתה	חומר	60-75	***הערכה						
*M	יטבתה	חומר	65.0	2.5	0.0	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0
*N	יטבתה	חומר	72.0	1.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
**1	יטבתה	חומר	60-75	***הערכה						
**2	יטבתה	חומר	78.0	0.0	0.4	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0
**4	יטבתה	חומר	65.0	3.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
**5	יטבתה	חומר	66.0	8.4	0.7	2.1	0.0	0.0	0.0	0.0
**6	יטבתה	חומר	65.0	0.8	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0
**7	יטבתה	חומר	60-75	***הערכה						
**8	בית זרע	חומר	60-75	***הערכה						

שעור חנטה ומספר השחלות נקבעו בעבודה קודמת (Cohen et al., 2004). הערכים המספריים בטבלה מבטאים אחוז מסך כל החנטים שנבדקו בעצים מזן 'ברה' להם היו פירות נורמאליים מופרים, פירות פרתנוקרפיים בודדים (בעלי שחלה אחת), פירות פרתנוקרפיים בהם מתפתחות שתי שחלות, פירות פרתנוקרפיים בהם מתפתחות כל שלוש השחלות, פירות פרתנוקרפיים המכילים מספר רב (4-6) של איברים דמויי שחלות.

<sup>1</sup> סה"כ מספר איברים דמויי שחלות (ריבוי שחלות נחשב מעל 4 שחלות פרתנוקרפיות). \* עצים בעלי "פנוטיפ חמור" ששימשו לניסוי הראשון \*\* עצים עם "פנוטיפ חלש" ששימשו לניסוי השני (ראה פרוט בתוצאות).

\*\*\* עבור חלק מהחוטרים לא בוצעה בדיקת נתוני שעור חנטה ומספר שחלות, לכן שעור החנטה הוערך בכ-60% 70%, שעור הפירות הפרתנוקרפיים הוערך בכ-10%. לא זוהו בחוטרים אלה חנטים מרובי שחלות. הטבלה לא כוללת את נתוני אחוז החנטים שנשרו לפני ביצוע הבדיקה.

### 3.2. הפקת DNA גנומי

DNA גנומי הופק מעלי תמר לפי השיטה של Aitchitt וחבריו (1993) בשינויים כדלקמן: כשלושה גרם של רקמה (עלים), נכתשו בחנקן נוזלי. החומר הכתוש הורחף ב-15 מ"ל בופר מיצוי (ראה הרכב הבופר בהמשך) והודגר משך 30 דקות ב-65 °C תוך ערבוב. המיצוי הראשון נעשה ע"י הוספת 15 מ"ל כלורופורם/איזואמיל-אלכוהול ביחס של 1:24 וסירכוז במשך 7 דקות ב-8,000 g. הפזה המימית הופרדה ועברה מיצוי נוסף ע"י הוספת נפח אחד של כלורופורם/איזואמיל-אלכוהול (1/24) וסירכוז באותם תנאים. לפאזה העליונה הוסף נפח אחד של איזופרופנול ונעשה סירכוז במשך 20 דקות ב-16,500 g. המשקע נשטף ב-20 מ"ל אתנול 70% וסורכז משך 10 דקות ב-16,500 g. המשקע יובש, הורחף בשלושה מ"ל מים מזוקקים וטופל ב-RNase A 1 µl (סיגמה) משך 30 דקות ב-37 °C. חומצות הגרעין הושקעו ב-2.5 נפחים של אתנול (100%) לאחר הוספת Na-Acetate לריכוז סופי של 0.3 M ושיקוע למשך

10 דקות ב-16,500 g. המשקע נשטף ב-20 מ"ל אתנול 70% וסורכז במשך 10 דקות ב-16,500 g. המשקע יובש והורחף ב-400 µm מים מזוקקים. ריכוז ואיכות של ה-DNA הוערכו באמצעות הפרדה על גל אגרוז 1% והשוואה עם כמות ידועה של סמן גודל (Lambda DNA/EcoRI+HindIII). איכות ה-DNA הוערכה גם ע"י יחס בליעת האור באורכי גל של 260 ו-280 ננומטר.

בופר מיצוי:

3% w/v CTAB (Hexadecyl Trimethyl-Ammonium Bromide)

1% v/v β-mercaptoethanol

1.4 M NaCl

20 mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)

100 mM Tris pH 8.0

### 3.3 הפקת Total RNA

הפקת Total RNA נעשתה בשיטת CTAB (Chang *et al.*, 1993) בשינויים כדלקמן: כ-3 גרם של רקמה (פרחים), נכתשו בחנקן נוזלי. החומר הכתוש הורחף ב-20 מ"ל בופר מיצוי (ראה הרכב הבופר בהמשך) והודגר משך 10 דקות ב-65 °C תוך ערבוב. המיצוי נעשה פעמים בנפח אחד של כלורופורם/איזואמיל-אלכוהול (1/24), הדוגמאות עורבבו משך 5 דקות וסורכזו 7 דקות ב-8,000 g. לפאזה העליונה הוסף 1/3 נפח 10 M LiCl, המבחנות עורבבו היטב והודגרו למשך הלילה ב-4 °C. הדוגמאות שוקעו משך 25 דקות ב-7,500 g ב-4 °C. למשקע הוספו 1 מ"ל SSTE ו-1 מ"ל כלורופורם/איזואמיל-אלכוהול (1/24). הדוגמאות הורחפו, הועברו למבחנות 2 מ"ל ושוקעו 5 דקות ב-10,500 g. הפזה המימית מוצתה שנית ב-כלורופורם/איזואמיל-אלכוהול (1/24). ה-RNA הושקע לאחר חלוקת הפזה המימית לשתי מבחנות שבכל אחת כ-400 µm והוספת 133 µm של 10 M Amonium acetate ו-1,330 µm אתנול (100%). המבחנות עורבבו היטב והודגרו למשך לילה ב-20 °C. הדוגמאות סורכזו 15 דקות ב-18,000 g. המשקע נשטף ב-1 מ"ל אתנול 70%, סורכז 5 דקות ב-18,000 g, יובש והורחף ב-30 µm מים שעברו טיפול ב-DEPC (Diethylpyrocarbonate) והתרחיף (שתי המבחנות של אותה דוגמא) אוחד. ריכוז ואיכות ה-RNA הוערכו באמצעות הפרדה על גל אגרוז 2% ועל פי יחס בליעת האור באורכי גל של 260 ו-280 ננומטר.

הרכב התמיסות ששימשו בהפקה:

(1) בופר מיצוי:

0.1 M Tris-Cl pH 8.0  
0.025 M EDTA pH 8.0  
2 M NaCl  
2% w/v CTAB  
2% w/v Polyvinylpyrrolidone (PVP)  
0.2% v/v  $\beta$ -Mercaptoethanol

(2) SSTE:

0.5% w/v SDS  
1 M NaCl  
0.01 M Tris-Cl pH 8.0  
1mM EDTA pH 8.0

### **3.4. טיפול ב-DNase**

ל-30  $\mu$ g של Total RNA הוסף:

8  $\mu$ l 10 x DNase Buffer  
1  $\mu$ l RNase inhibitor (40 U/  $\mu$ l) (Fermentas, Irvine, USA)  
1  $\mu$ l RNase free DNase (1 U/  $\mu$ l) (Promega, Madison, WI, USA)

נפח הריאקציה הושלם ל-40  $\mu$ l ע"י מים שעברו טיפול ב-DEPC. הדוגמאות הודגרו במשך חצי שעה ב-37 °C ולאחר מכן מוצו בפנול/כלורופורם (1:1), שוקעו באיזופרופנול והורחפו ב-30  $\mu$ l מים שעברו טיפול ב-DEPC.

### **3.5. יצירת cDNA**

#### **3.5.1 סינתזת הגדיל הראשון של cDNA**

הגדיל הראשון של cDNA סונתז כדלקמן:  
ל-1-5  $\mu$ g של total RNA הוסף:

2.5  $\mu$ l Oligo dT(100 pmole/  $\mu$ l)  
מים עד נפח 12.5  $\mu$ l

התמיסה הודגרה 5 דקות ב 70 °C והועברה במהירות לקרח.



למבחנת הריאקציה הוספו:

- 4  $\mu$ l 5X M-MLV RT buffer (Fermentas, Irvine, USA)
- 2  $\mu$ l 10 mM dNTP
- 0.5  $\mu$ l RNase inhibitor (40 U/  $\mu$ l) (Fermentas, Irvine, USA)
- 1  $\mu$ l M-MLV RT enzyme (200 U/  $\mu$ l) (Fermentas, Irvine, USA)

המבחנה הודגרה במשך שעה ב- $42^{\circ}\text{C}$ . הריאקציה הסתיימה בהדגרה למשך 10 דקות ב- $70^{\circ}\text{C}$ .

### 3.6. איתור גנים מועמדים (candidate genes)

האיתור נעשה על ידי חיפוש במאגר המידע של NCBI. באמצעות תוכנת BLAST (Altschul *et al.*, 1997), זוהו גנים אורתולוגים לגנים מבקרי פריחה במינים שונים של צמחים חד-ודו-פסיגיים (המפורטים בטבלה 8). בכל אחד מגנים אלה זוהו אזורים שמורים בעלי הומוולוגיה גבוהה במגוון הצמחים בעזרת התוכנות DNAMAN (Lynnon BioSoft) ו-BLAST. על בסיס מידע זה, עוצבו תחלים דגנרטיביים לאזורים השמורים, ואלה שימשו להגברה של מקטעי הגנים האורתולוגיים מ-DNA גנומי שהופק מעלי תמר ומ-cDNA שהופק מפרחי תמר מזן 'ברה'.

### 3.7. בידוד גנים אורתולוגים מתמר

cDNA מתפרחות ו-DNA גנומי מעלי תמר מהזן 'ברה' שימשו לריאקצית PCR עם תחלים שתוכננו עבור כל גן (טבלה 4) וסונתזו על ידי IDT (Coralville, IA USA). הריאקציה בנפח כולל של  $25\ \mu$ l הכילה  $20\ \mu\text{mol}/\mu\text{l}$  dNTP,  $0.5\ \mu$ l 10x PCR buffer,  $2.5\ \mu$ l (המכיל 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , Taq polymerase  $1\ \mu$ l (בריכוז של  $5\ \text{U}/\mu\text{l}$ ), או  $0.5\ \mu$ l לכל אחד מזוג התחלים (בריכוז של  $20\ \mu\text{mol}/\mu\text{l}$ ), ו-cDNA  $10\ \mu$ l (שהופק מ-50 ng total RNA) או  $1\ \mu$ l DNA גנומי (25ng). נפח הריאקציה הושלם ל- $25\ \mu$ l עם מים מזוקקים פעמים (ddH<sub>2</sub>O). מטופלים ב-DEPC. תנאי ריאקציית ה-PCR: 5 דקות ראשונות ב- $95^{\circ}\text{C}$ , 40 מחזורים של דקה אחת ב- $94^{\circ}\text{C}$ , דקה אחת בטמפרטורות משתנות (גרדיאנט) לקביעת הטמפרטורה המתאימה לכל זוג תחלים, דקה אחת ב- $72^{\circ}\text{C}$  ו-10 דקות אחרונות ב- $72^{\circ}\text{C}$ . תוצרי ה-PCR הופרדו בגלים של אגרוז בריכוזים של 1%-2%.

טבלה 4 - רצף התחלים ששימשו לבידוד גנים

טמפי החיבור	רצף התחל 3 → 5	שם התחל <sup>1</sup>	שם הגן
49	CTCTGYTAYGTSCAHTGCAACT	AFOF	<b>ABNORMAL FLORAL ORGANS</b>
	CAYGAGBCCRAARTGDATG	AFOR	
58	CCCGGTAGCAGTTTGTTCOA	AFO1cF	
	TGTGGGTGATGTCCGGATT	AFO1cR	
58	GCAGTGCTGAAAGCTTCCCT	AFO2cF3	
	TGTCCCAGGCAACAATTTG	AFO2cR3	
55	GGATAGAGAACACGACCAACCG	AG1F1	<b>AGAMOUS</b>
	TGGCATTTCAGCTCCAC	AG1R2	
55	GGCTCTATGAGCCCTAGGGACC	AG1F3	
	GAGTCGCTGCTGCTGATGAGA	AG1R4	
56	GGAGCTGAAGAGGATCGAGAA	AGL2-3F	<b>AGAMOUS- LIKE2-3</b>
	GGCATGTAATTACTCACGCTAGG	AGL2-3R	
56	AAGGGTGGAGCTGAAGAGGAT	AGL2-4F	<b>AGAMOUS- LIKE2-4</b>
	CATGCAGGAAGGTAGCCATT	AGL2-4R	
53	AACATMATCGGNAARGG	EgCLV1F	<b>CLAVATA</b>
	ATGTAKCCRTARGAKCCAG	EgCLV1R	
53	TGATGGACACCGTGACCGTGAA	DLF	<b>DROOPING LEAF</b>
	GAGGAAATACAGCGTATCAA	DLR	
48	TGHTGGATACNGTGACNGTGAA	DL2F	
	TTTGATDCGYTGTATCTCMTC	DL2R	
59	GGCGAATGCTTCCAGCTATC	EGAD1F1	<b>EGAD1</b>
	TAGCAAAGCCTGGTGCAAAAGC	EGAD1R2	
55	TCAAGCGAATCGAGAACTC	MADS4Fsf	<b>MADS4</b>
	CAAGAAGGAAAATGATAACA	MADS4Rsf	
53	ATYAAGMGVATCGAGAACTC	OsMADS4sfF	
	TGCATRTTRTCATTTTCYTTCTT	OsMADS4sfR	
56	TGAGGCGGATCGAGAACA	SQUA1F1	<b>SQUAMOSA</b>
	GCCTGCTGGTTTAGTGCCCTT	SQUA1R2	
56	TGGCAAACCTCAAAGCTAAGGTTG	SQUA1F3	
	AAGTGGCTAAGCATCCAAGGTG	SQUA1R4	
55	ATGGGGAGAGGVAAGATHGAGAT	SPW1F	<b>SUPERWOMAN</b>
	TTTTGCTCAAGRCCGCGCAGBTC	SPW1R	

הגנים בטבלה מסודרים לפי סדר האלפבית.  
<sup>1</sup>F מייצג את התחל forward, R מייצג את התחל reverse. אותיות הקוד לצרופי הבסיסים השונים:

I	Y	S	K	R	M	W	H	B	D	V	N	אותיות קוד בסיסים
Inosine	C,T	G,C	G,T	A,G	A,C	A,T	A,T,C	G,T,C	G,A,T	G,A,C	A,C,G,T	

### 3.8. בדיקת איכות וריכוז תוצרי ה-PCR

תוצרי PCR הופרדו על גבי ג'ל אגרוז בריכוז של 1%-2%. ההרצה נעשתה במתקן אלקטרופורזה אופקי שהכיל בופר הרצה 1xTAE ובמתח של 100 V. כל דוגמא הכילה בופר הטענה (6x Loading Dye Solution), בנפח של 1/6 מכלל הדוגמא. Lambda DNA/EcoRI+HindIII ו-GeneRuler (Fermentas Hanover, MD, U.S.A) שימשו כסמני גודל. הגלים צולמו במכשיר מסוג Fluorchem 8800 של חברת Alpha Innotech. אנליזת ריכוז התוצרים נעשתה באמצעות התוכנה AlphaEase FC. במידה והתקבל יותר מתוצר אחד, נבחר התוצר בגודל הצפוי. במידה ולא היה מידע מתאים, נבחרו מספר תוצרים פוטנציאליים. תוצרי ה-PCR הופקו מהג'ל באמצעות NORGEN DNA Gel Extraction Kit (Ontario, Canada) בהתאם להוראות היצרן.

### 3.9. קביעת רצף ואנליזה של תוצרי ה-PCR

נעשה על ידי חברת MACROGEN (Korea), או על ידי מעבדות חי בע"מ ישראל. אנליזת הרצף נעשתה בעזרת ABI View ותוכנת BioEdit. ההומולוגיה של התוצרים נבדקה בעזרת התוכנות BioEdit ו-BLAST.

### 3.10. עצים פילוגנטיים

המרחקים הגנטיים בין הפרטים השונים נקבעו בעזרת PHYLIP (חבילה של תוכנות פילוגנטיות) בשיטת NEIGHBOR (Felsenstein, 1999), והוצגו בעזרת התוכנה TREEVIEW (Page, 2000). המובהקות של המרחקים הגנטיים נבחנו בעזרת ערכי Bootstrap. ניבנו 100 מטריצות שונות בתוכנת Seqboot ובתוכנה Consense נבנה עץ כללי המאחד את כל המטריצות וקובע את ערכי ה-Bootstrap לכל נקודת פיצול. ערכי Bootstrap המופיעים בנקודות ההתפצלות בעצים מציינים את מידת המובהקות הסטטיסטית של ההתפצלות. רק ערכים מובהקים (הגבוהים מ-70) מוצגים בעצים הפילוגנטיים.

### 3.11. דגם המתילציה של ה-DNA

נעשתה השוואה של דגם המתילציה במקטעי הגנים שזוהו בין עץ 'ברהי' נורמאלי מחוטר, ובעץ 'ברהי' חריג שרובה בתרבית רקמה. ה-DNA נחתך על ידי שני איזוסכיזומרים, HpaII ו-MspI, המזהים את אותו אתר חיתוך אך הינם בעלי רגישות שונה למתילציה של אתר זה (Madlung et al., 2002) (ראה טבלה 5). כל דוגמת DNA נחתכה בנפרד על ידי האנזימים HpaII ו-MspI. תוצרי החיתוך הוגברו ב-PCR עם תחלים מתאימים ליצירת שני מקטעים של כ-400 bp.

החובקים את האתרים של *HpaII/MspI* (טבלה 6). בגנים בהם לא כל אתרי החיתוך ממותלים יחתך ה-DNA באיזור שבין התחלים, ולכן בריאקציה ה-PCR לא יתקבל התוצר.

**טבלה 5 - איפיון דגמי מתילציה באמצעות אנזימי הרסטריקציה *MspI/HpaII***

נוכחות/העדר תוצר לאחר הגברה <sup>2</sup>		חיתוך ה-DNA הגנומי באתר על ידי האנזים <sup>1</sup>		מצב מתילציה באתר החיתוך	
<i>MspI</i>	<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>	<i>HpaII</i>		
-	-	+	+	C C G G G G C C	העדר מתילציה
+	+	-	-	<sup>m</sup> C C G G G G C C <sup>m</sup>	מתילציה של ציטוזין חיצוני בשני הגדילים
-	+	+	-	C <sup>m</sup> C G G G G C <sup>m</sup> C	מתילציה של ציטוזין פנימי בשני הגדילים
+	-	-	+	<sup>m</sup> C C G G G G C C	המי-מתילציה (רק בגדיל אחד) של ציטוזין חיצוני

<sup>1</sup> +. האנזים חותך באתר הרסטריקציה CCGG, -. האנזים אינו חותך באתר.  
<sup>2</sup> בהנחה שכל האתרים במקטע ממותלים באותו אופן ושהחיתוך היה מלא בהתאם לדפוס המתילציה.  
 -אין תוצר, +. יש תוצר

**3.12 איתור SNPs**

האנליזה נעשתה על DNA גנומי או על cDNA (במיקרים שלא היה בידינו מקטע גנומי). בשלב ראשון נבדקו מספר גנים בשלוש תערובות DNA (DNA pools): (1) שישה עצים שרובו מחוטרם, (2) שישה עצים חריגים שרובו מתרבית ריקמה, (3) שישה עצים נורמאליים שרובו מתרבית ריקמה. נעשתה הגברה ב-PCR על תבנית התערובות באמצעות מספר זוגות תחלים (טבלה 6) ליצירת מקטעים בגודל מתאים לריצוף של כ-400 bp. בשלב השני נעשה ריצוף של DNA או cDNA מפרטים בודדים בעזרת תחלים המפורטים בטבלה 4. ריכוז ה-DNA בדגימות הוערך על גל אגרוז והשווה על ידי שימוש בתוכנה AlphaEase FC. הקטע הנבחן הוגבר ב-PCR באמצעות תחלים יחודיים והתוצרים רוצפו. אנליזת הרצפים נעשתה בעזרת תוכנות BLAST, BioEdit ו-ABI View.

## טבלה 6 - תחלים ששימשו לאנליזת דגם המתילציה וליתור SNPs בתערובת DNA

שם תחל <sup>1</sup>	שם הגן	רצף התחל 3 → 5	טמפ' החיבור
DL1#F	PdDL	ATGCGGCCATTGCAACCATC	60
		GCTCGCTTGATATCGATGAA	
DL2#R		60	
DL3#F			AAATGATCCCCAAAGCATCA
DL4#R	TCATGAAGCGATTGTAAGCTG		
MADS4F#1	PdMADS4	CGGCAGGTGACCTTCTTCAA	58
MADS4R#2		AGCTGGTACTTCTCCAGCATCCT	
MADS4F#3		58	CCCACCACGTATCACCTCC
MADS4R#4			TTCTTCTTGATCCGGTCGA
SPWF1#	PdSPW1	ATGGGGAGAGGAAAGATTGAGATC	55
SPWR2#		TTTAGAAGCAAAAGGGAGAGCAAG	
SPWF3#		55	GCAGCACCAAGAGGATATTTGAT
SPWR4#			GGTCGTTGATGTCCAACCAT

הגנים בטבלה מסודרים לפי סדר האלפבית.  
<sup>1</sup>F מייצג את התחל forward, R מייצג את התחל reverse.

### 3.13 איפיון דגם השעתוק באמצעות Real-Time RT-PCR

שיטה זאת מאפשרת לעקוב ולהעריך את כמות תוצר ה-PCR בכל מחזור ובכך לקבוע את הכמות ההתחלתית היחסית של ה-Template הספציפי בריקמה. עיצוב התחלים נעשה בתוכנת Primer Express. זוגות התחלים נבחרו כך שתוצר ה-PCR יהיה באורך של 100-200 בסיסים. טמפרטורת ה-Annealing תוכננה ל-60-59 °C לכל זוג תחלים. התחלים לא הכילו יותר מארבעה בסיסים זהים ברצף. התחלים נבדקו ב-PCR כדי לקבוע את טמפרטורת הריאקציה האופטימלית, וכדי לוודא את היצירה של תוצר יחיד. ראה פירוט התחלים בטבלה 7. לסינתזת הגדיל הראשון של cDNA שימשו 2.5 µg של Total RNA (כמפורט בסעיף 3.5). בכל ריאקציות PCR כמותי נעשה שימוש ב-cDNA שהופק מ-250 ng Total RNA.

הריאקציה נעשתה במכשיר ABI Prism 7700 והרכבה היה כדלקמן:

- 10 µl AB gene QPCR SYBER green ROX mix (ABgene,UK)
- 3 µl Primer Forward/Reverse (2 µM)
- מים מזוקקים פעמים 5 µl
- 2 µl cDNA

תנאי ה-PCR היו: שתי דקות ב-50 °C, 15 דקות ב-95 °C, 40 מחזורים של 15 שניות ב-95 °C, ודקה ב-59/60 °C.

טבלה 7 - תחלים ששימשו לריאקציות Real time RT-PCR

רצף (5'-3')	שם התחל <sup>1</sup>	שם הגן
AGATAACGTGCCACCACCA	RT2AFO1 F	<b>ABNORMAL FLORAL ORGANS1</b>
GGTCTGTTGACAACCTGGAGTCTGA	RT2AFO1 R	
CATGAGTGGTTTGCTTCAAACAGT	RT2AFO2 F	<b>ABNORMAL FLORAL ORGANS2</b>
TTGCTGTTGATCATTGAGCATTG	RT2AFO2 R	
AATTTCCCGTTCTGCAGTGGTA	ACTRT F	<b>ACTIN</b>
CCTCATGCCATCCTTCGTTT	ACTRT R	
ATTATTGGCAGGAAGTTCCTTGAAT	RTAG F	<b>AGAMOUS</b>
AAAGGGAGTTGGAGCTGCAA	RTAG R	
AATCCATCTCCCTGTGGTTGTG	RTAGL2-3 F	<b>AGAMOUS-LIKE2-3</b>
AACGAAGGGAACAAATGCTCTGT	RTAGL2-3 R	
AAAGACGCAGTTCATGCTTGATC	RTAGL2-4 F	<b>AGAMOUS-LIKE2-4</b>
ACCATTGCCACCACCATTTATC	RTAGL2-4 R	
CACCGGCACATCGTGAGAC	RT2CLV1 F	<b>CLAVATA</b>
ATCTTATACCTGGTGTCCCATTGC	RT2CLV1 R	
TGACCACCAGATGGCATTTC	DLRT F	<b>DROOPING LEAF</b>
AAGCTGATGGAAGTCGGTGTTT	DLRT R	
CCGGCACACCTCCTTGG	RT1EGAD F	<b>EGAD</b>
ATCCTCAGAGATGGGAACGAAG	RT1EGAD R	
CACCGGGCAAGTAACCTTCTC	RT3M4 F	<b>MADS4</b>
CGGAGGAGCTGCAGTACTCG	RT3M4 R	
TTGCTCTAATTGCTGGAGTTCTTTG	RTSQUA1 F	<b>SQUAMOSA</b>
AGTCTCGTCTGGTCCAGAATCG	RTSQUA1 R	
CATGAAGAAGGCTAAGGAGCTGAC	RT3SPW F	<b>SUPERWOMAN</b>
ATCCCGGAGACTTGCTGGTAG	RT3SPW R	

התחלים תוכננו בתוכנת Primer Express. הגנים מסודרים לפי סדר האלפבית.  
F<sup>1</sup> מייצג את התחל forward, R מייצג את התחל reverse

קשירת החומר הפלורוסנטי Syber-green ל-DNA דו-גדילי שנוצר במהלך ריאקציה ה-PCR מאפשר לכמת את קצב היווצרות ה-DNA באמצעות מדידת הפלורוסנציה, ומכאן לקבוע את הכמות ההתחלתית של Template שהיתה בריאקציה. בשלב ראשון נערכו ניסויים לקביעת ריכוז אופטימלי לכל זוג תחלים, כאשר הפרמטר המנחה הוא קבלת תוצר יחיד שאינו מגביל את התקדמות הריאקציה. על בסיס זה נבחר ריכוז תחלים של 300 nM לכלל הריאקציות. בשלב הבא נבחנה יעילות כל זוג תחלים ע"י עקומות כיול בהן נבדקו ערכי Ct (Threshold Cycle) שהתקבלו עבור מיהולים שונים של cDNA בשלוש חזרות (1, 1:5, 1:25, 1:125 ו-1:625). הערך Ct מייצג את מספר המחזורים של ריאקציה ה-PCR בהם נמדדה כמות התוצר הגבוהה מרמת סף שנקבעה (Threshold). רמת הסף נקבעת כך שעקומת הכיול של הגן הנבדק וגן הביקורת יהיו בתחילת השלב הלוגריטמי/אקספוננציאלי של הריאקציה. לבניית עקומת כיול לינארית חושבו ערכי log<sub>10</sub> לכל מיהול. הריכוז הנמוך של cDNA התקבל ממיהול של 1:625 וקיבל ערך של 0.4, ולמיהול בו הריכוז הגבוה ביותר של cDNA חושב ערך log של 250. בעבודה זו שימש אקטין (Actin) כגן הביקורת. במקביל לכיול ובדיקה של כל גן נבדק

וכויל גם הגן אקטין ששימש כמקור יחוס. חישוב ערכי Relative Expression (RE) נעשה על ידי הצבת ערכי Ct שהתקבלו בריאקציה ה-Real-Time PCR במשוואת עקומת הכיול הספציפית לכל גן וממנה חולץ ריכוז ה-cDNA היחסי.

ה-RE חושב על ידי חלוקת הערך של ריכוז ה-cDNA היחסי עבור הגן הנבדק, בריכוז ה-cDNA היחסי שהתקבל מגן הביקורת אקטין מאותה דוגמת cDNA. ערך RE מייצג לכן את רמת הביטוי של הגן יחסית לביטוי גן הביקורת אקטין, בהנחה שרמת הביטוי של אקטין קבועה בדוגמאות השונות. הערך המנורמל של RE חושב על ידי חלוקת ממוצע ערך ה-RE של העצים החריגים בממוצע ערך ה-RE של העצים הנורמאליים. אנליזת התוצאות נעשתה בתוכנת אקסל.

## 4. תוצאות

במטרה להבין את המנגנון ליצירת מופע עצי התמר החריגים המאופיינים ב'חנטה לקויה' וב'ריבוי שחלות', נקטנו בגישה של איתור ואנליזה של גנים מועמדים (candidate genes). התמקדנו בבידוד של גנים מתמר המבקרים את התפתחות אברי הפרח. העובדה שמרבית גנים אלו הינם שמורים במידה רבה בין מינים שונים מאפשרת את בידודם מתמר ובחינת מעורבותם ביצירת הפנוטיפ. הנחת העבודה היתה שהמופע של עצי התמר החריגים עשוי לנבוע משינויים בגנים מסויימים. לכן ערכתי השוואה של גנים אלה בין עצים נורמאליים לעצים חריגים בשלושה היבטים: (1) בדפוס המתילציה (2) ברצף הבסיסים (3) בדגם הביטוי.

### 4.1. זיהוי גנים מתמר המבקרים את התפתחות הפרח

ביצעתי חיפוש במאגרי המידע כדי לאתר גנים המבקרים את תהליך יצירת הפרח, תוך התמקדות בגנים מצמחים חד-פסיגיים. חיפשתי גנים אשר מוטציה בהם גורמת לפנוטיפים דומים לפנוטיפ 'החנטה הלקויה' ו'ריבוי השחלות' בתמר, וגנים נוספים בעלי תפקיד מפתח בהתפתחות הפרח. הגנים המועמדים שבחרתי מפורטים בטבלה 8.

טבלה 8 - גנים המבקרים את מבנה הפרח

שם הגן	מקור	תפקיד	גנים אורתולוגים מצמחים חד פסיגיים
<b>AGAMOUS (AG)</b>	ארבידופסיס	מוטציה בגן גורמת להפיכת אבקנים לעלי כותרת. (Mizukami and Ma, 1995). גן מסוג C, מכיל MADS-box domain.	ZMM2, ZAG1, מתירס. מוטציה בגן ZAG1 לא גורמת לפגיעה בזהות האיברים, יתכן ובגלל פעילות מפצה של ZMM2. (Mena et al., 1996).
<b>APETALA1 (AP1)</b>	ארבידופסיס	מוטציה בגן גורמת להפיכה חלקית של פרחים לתפרחת גבעולית ולפגיעה במבנה עלי הכותרת והגביע. גן מסוג A. מפעיל גנים ממודל ABCDE, בעיקר את הגנים מסוג B. מכיל MADS-box domain. (Mandel et al., 1992).	OsMADS14 מאורז. ביטוי אקוטיפי של הגן גרם להתפתחות פרח מנצרים (Yamaguchi and Hirano, 2006).
<b>APETALA3 (AP3)</b>	ארבידופסיס	מוטציה בגן גורמת להפיכת עלי הכותרת לעלי גביע והאבקנים הופכים לעלי שחלות (Zik and Irish, 2003), גן מסוג B. מכיל MADS-box domain.	SILKY מתירס (Whipple et al., 2004). SUPERWOMAN מאורז (Nagasawa et al., 2003). מוטציה בגנים אלו גורמת לפנוטיפ דומה למוטנט מארבידופסיס.



שם הגן	מקור	תפקיד	גנים אורתולוגים מצמחים חד פסיגיים
<b>CLAVATA (CLV)</b>	ארבידופסיס	מוטציה בגן גורמת להצטברות תאים לא ממוינים במריסטמת הפרח ובנצרים. המריסטמה המוגדלת יוצרת עודף של איברים בפרח (Clark <i>et al.</i> , 1993).	FON1 מאורז. מוטציה בגן גורמת להגדלת מריסטמת התפרחת ולעליה במספר אברי הפרח (Suzaki <i>et al.</i> , 2004).
<b>DROOPING LEAF (DL)</b>	אורז	הגן אחראי לבניית העורק הראשי בעלה ובקרת התפתחות השחלה. מוטציה בגן גורמת לאבקנים מרובים. הומולוגי לגן CRABS CLAW (CRC) מארבידופסיס (Yamaguchi <i>et al.</i> , 2004). מכיל YABBY domain.	הגן DROOPING LEAF בודד מאורז.
<b>EGAD1</b>	דקל השמן	EGAD אינו גן המבקר את מבנה הפרח, אולם בדקל השמן תוצרי הגן מצטברים בקאלוס בתרבית ריקמה באסוציאציה לפנוטיפ 'Mantled'. EGAD הומולוגי לגן PPT מפטוניה ולגנים מסוג defensin (Tregear <i>et al.</i> , 2002).	הגן EGAD1 בודד מדקל השמן.
<b>FILAMENTOUS FLOWER (FIL)</b>	ארבידופסיס	מוטציה בגן גורמת למספר לא תקין של איברי פרח. הגן אחראי לבקרת גודל הפרח (Chen <i>et al.</i> , 1999). מכיל YABBY domain.	OsYAB1 מאורז. ביטוי יתר של הגן גורם למבנה פרח לא נורמאלי שהכיל מספר רב של אבקנים ושחלות (Jang <i>et al.</i> , 2004).
<b>FLORAL BINDING PROTEIN (FBP11)</b>	פטוניה	מהווה תוספת D למודל ה-ABC. מוטציה בגן גורמת לשחלות לא מפותחות ומחלפות במבנים דמויי שחלות. מכיל MADS-box domain (Colombo <i>et al.</i> , 1995).	TaAGL11 מחיטה.
<b>FRUITFULL (FUL)</b>	ארבידופסיס	מוטציה בגן גורמת לאי חלוקת תאי הקירות הפריפריאליים של השחלה. מכיל MADS-box domain (Gu <i>et al.</i> , 1998).	MADS18 מאורז (Fornara <i>et al.</i> , 2004).
<b>LEAFY (LFY)</b>	ארבידופסיס	הגן אחראי למעבר מצמיחה וגטטיבית לצמיחה רפרודוקטיבית. מבקר את הגנים ממודל ה-ABC. מוטציה בגן גורמת למעבר מפרח לאיברים דמויי עלה (Weigel <i>et al.</i> , 1992).	RFL מאורז (Kyojuka <i>et al.</i> , 1998).
<b>PISTILLATA (PI)</b>	ארבידופסיס	מוטציה בגן גורמת להפיכת עלי הכותרת לעלי גביע והאבקנים הופכים לעלי שחלות (Zik and Irish, 2003). גן מסוג B. מכיל MADS-box domain.	OsMADS2, OsMADS4 מאורז (Lee <i>et al.</i> , 2003). מוטציה בגנים אלה גורמת לפנוטיפ דומה למוטנט מארבידופסיס.

שם הגן	מקור	תפקיד	גנים אורתולוגים מצמחים חד פסיגיים
<b>SEPALLATA (SEP)</b> נקרא גם <b>AGAMOUS-LIKE</b>	ארבידופסיס	מהווה תוספת E למודל ה-ABC. בארבידופסיס נמצאו 4 גנים הומולוגיים. מוטציה בארבעתם ( <i>sep1, sep2, sep3, sep4</i> ) גורמת ליצירת פרח הבנוי רק מעלי גביע ( <i>Pelaz et al., 2000</i> ;) מפעיל גנים מסוג B ו-C. מכיל אזור MADS-box domain.	OsMADS1 מאורז. מוטציה בגן גורמת לשינויים במבנה המוץ וקשקשי התפיחה, לירידה במספר האבקנים ולעליה במספר השחלות ( <i>Pelucchi et al., 2002</i> ).
<b>SUPERMAN (SUP)</b>	ארבידופסיס	הגן אחראי ליצירת הגבול בין אבקנים לשחלות. מוטציה בגן גורמת לריבוי אבקנים על חשבון שחלות ( <i>Bowman et al., 1992</i> ).	–
<b>TERMINAL FLOWER1(TFL1)</b>	ארבידופסיס	מוטציה בגן גורמת למריסטמת התפרחת להתפתח לפרח טרמינלי. מעכב את הגן AP1 המעורב ביצירת מריסטמת הפרח ( <i>Jack, 2004</i> ).	OsCEN מאורז ( <i>Zhang et al., 2005</i> ).
<b>UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO)</b>	ארבידופסיס	מוטציה בגן גורמת לאבקנים ועלי כותרת להתחלף באיברים כימריים המורכבים מעלי כותרת, עלי גביע ושחלות. מפעיל גנים מסוג B ( <i>Ingram et al., 1995</i> ).	Fimbriata מאורז.
<b>WUSCHEL(WUS)</b>	ארבידופסיס	מוטציה בגן גורמת לרוב ליצירת פרח עם אבקן מרכזי אחד במקום שחלות ואבקנים ( <i>Laux et al., 1996</i> ).	OsWUS מאורז ( <i>Nagasaki et al., 2005</i> ).

רשימת הגנים מסודרת לפי סדר האלפבית.

בגנים CLV, DL, AP3, FIL ו-PI זיהיתי אזורים שמורים בעלי הומולוגיה גבוהה במגוון מיני צמחים חד-פסיגיים (ולעיתים גם דו-פסיגיים) בעזרת התוכנות DNAMAN ו-BLAST, תיכננתי תחלים דגנרטיביים לאזורים השמורים ובעזרתם בודדתי מקטעים מגנים אלה מתמר. דוגמה לתהליך הזיהוי, והאפיון של מקטעי הגנים מתמר מתוארת לגבי הגן SUPERWOMAN1 (SPW1): נעשתה השוואה של רצף האזור המקודד של הגן SPW1 מאורז באמצעות תוכנת BLAST למציאת גנים הומולוגים במגוון של מיני צמחים, ונבחרו גנים מצמחים חד-פסיגיים בעלי הומולוגיה הגבוהה ביותר. נעשתה השוואה (multiple alignment) של הרצף המקודד בעזרת התוכנות DNAMAN ו-BioEdit ואותרו האזורים השמורים ביותר ברצף המקודד של הגנים (איור 6). האזורים השמורים שימשו כתבנית לעיצוב תחלים דגנרטיביים (איור 7) ואלה שימשו להגברה של מקטעי הגנים האורתולוגיים מתמר. במהלך ניסויים לאיתור הגנים: AG, AGL2-3, AGL2-4, EGAD1 ו-SQUA1 מתמר, התפרסמו רצפי הגנים הנ"ל בדקל השמן (*Adam et al., 2006; Tregear et al., 2002*).

מידע זה שימש כתבנית לעיצוב התחלים ללא צורך בתכנון תחלים דגנרטיבים. את הגן ההומולוגי ל-EGAD (PdDIF) בחרתי לבדוד, למרות שאינו גן מבקר פריחה, בעקבות אסוציאציה שנמצאה בדקל השמן בין דפוס ביטוי הגן EGAD לפנוטיפ 'Mantled' (Tregear *et al.*, 2002).

**איור 6 - השוואת רצף של גנים אורתולוגיים ל-SPW1**  
**א. האזור השמור לפיו תוכן התחל הדגנרטיבי Forward**

oryza_SPW1	ATGGGGAGGGGCAAGATCGAGATCAAGCGGATCAAGAACGCGACCAACAGGCAG
Eupomatia_APETALA3-like	ATGGGGAGAGGAAAGATCGAGATCAAAAAGGATAGAGAATTCCACTAACAGACAL
Asparagus_AODEF	ATGGGTAGAGGAAAGATCGAGATCAAGAAGATAGAGAACCACCAACAAACAGGCAG
Hemerocallis_MADS1	ATGGGCAGAGGAAAGATTGAGATCAAGAAGATTGAGAACTCAACGAACAGGCAG
Lilium_regale_LRDEF	ATGGGGCGGGGAAAGATCGAGATCAAGAAGATCGAAAACCTCGACGAATCGACAG
Tulipa_TGDEFB	ATGGGCCGTGGCAAGATCGAGATCAAGAAGATTGAGAACTCAACCAACCGTCAAG
Triticum_APETALA3-like	ATGGGGCGGGGAAAGATCGAGATCAAGCGGATCGAGAACGCCACCAACAGGCAG
Tradescantia_TRDEF	ATGGGTAGAGGAAAGATTGAGATCAAGAAGATTGAGAATCCAACCAATAGGCAL
Triticum-TaMADS#51	ATGGGGCGGGGAAAGATTGAGATCAAGCGGATCGAGAACGCCACCAACAGGCAG
Zea_mays_silky1	ATGGGGCGGGCAAGATCGAGATCAAGCGGATCGAGAACGCCACCAACCGGCCAG
Eupomatia_APETALA3-like	ATGGGGAGAGGAAAGATCGAGATCAAAAAGGATAGAGAATTCCACTAACAGACAL
Hordeum_APETALA3-like	ATGGGGCGGGGAAAGATCGAGATCAAGCGGATCGAGAACGCCACCAACAGGCAG
Magnolia_MADS7	ATGGGAAGAGGAAAGATAGAGATCAAAAAGATTAGAGAATTCCACTAACAGGCAL
Lilium_MADS1	ATGGGGCGGGGAAAGATCGAGATCAAGAAGATCGAGAACTCGACGAATCGGCAG
Tulipa_gesneriana_TGDEFA	ATGGGTCTGTGGCAAGATCGAGATCAAGAAGATCGAGAACTCAACCAACCGTCAAG
Consensus	atggg g gg aagat gagat aa at a aa c ac aa g ca

**ב. האזור השמור לפיו תוכן התחל הדגנרטיבי Reverse**

oryza_SPW1	CTGCGCGGTCTTGAGCAAAAATGTCGATGCCGCCCTCAAGGAGGTTCCGCCACAG
Eupomatia_APETALA3-like	CTGCGCGGTCTTGAGCAAAAATCTGGAGGATTCTATCAAAATTTGTTTCGTGAGAG
Asparagus_AODEF	CTGCGCGGTCTTGAGCAAAAATCTGGATGAAGCTATAAAAGCTTGTTCGTACCCG
Hemerocallis_MADS1	CTGCGCGGTCTTGAGCAAAAATCTGGATGAAGCTTTGAAGAGTGTTCGCGCTAG
Lilium_regale_LRDEF	CTGCGCGGTCTTGAGCAAAAATTTGGACGAGGCGCTCAAGCTCGTTTCGTACAG
Tulipa_TGDEFB	CTGCGCGGTCTTGAGCAAAAATTTGGAGGCGGCTTTGAAGCTTGTTCGTGGGAG
Triticum_APETALA3-like	CTGCGCGACCTTGAGCAAAAATGTCGATGCCGCTCTCAAGGAGGTTCCGCCAGAG
Tradescantia_TRDEF	TTGCGCGGTCTTGAGCAAAAATTTGCATGATTCTGTGAAGGCTGTTTCGTGAAAAG
Triticum-TaMADS#51	CTGCGCGACCTTGAACAAAATGTCGATGCCGCTCTCAAGGAGGTTCCGCCAGAG
Zea_mays_silky1	CTGCGCGGCTCGAGCAAAAATGTCGACGCGGCTCTCAAGGAGGTTCCGCCATAG
Eupomatia_APETALA3-like	CTGCGCGGTCTTGAGCAAAAATCTGGACGATTCTATCAAAATTTGTTTCGTGAGAG
Hordeum_APETALA3-like	CTGCGGGGCTTGAACAAAATGTCGATGCCGCTCTCAAGGAGGTTCCGCCAGAG
Magnolia_MADS7	CTGCGCGGTCTTGAGCAAAAATTTAGAAAATTCTATCAAAAGTAGTTTCGTGACAG
Lilium_MADS1	CTGCGCGGTCTTGAGCAAAAATTTGGACGAAGCGCTCAAGCTCGTTTCGTACCCG
Tulipa_gesneriana_TGDEFA	CTGCGCGGTCTTGAGCAAAAATTTGGAGGAGGCTTTGAAGATTGTTTCGTGGGAG
Consensus	tgcg g ct ga caaaa t a c t aa gt cg g

השוואה (multiple alignment) של הרצף המקדד מהגן SPW1 מאורז לגנים מצמחים שונים נעשתה בעזרת התוכנה DNAMAN. האזורים השמורים ביותר זוהו (מסומנים באדום).

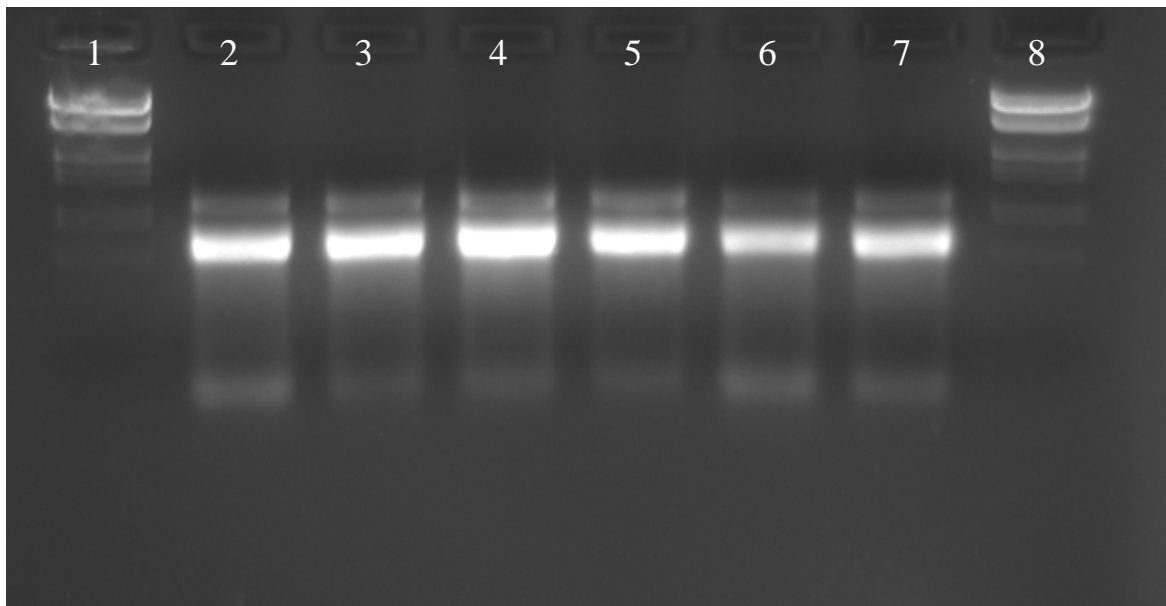
## איור 7 - רצף התחלים הדגנרטיביים לגן SPW1

Forward: 5'ATGGGGAGAGGVAAGATHGAGAT3'  
Reverse: 5'TTTTGCTCAAGRCCGCGCAGBTC3'

הפריימרים הדגנרטיביים של הגן SPW1 שתוכננו על פי האזורים השמורים באיור 6. האותיות: B, R, H, V מציינות מגוון בסיסים כמתואר בטבלה 4.

כדי לבדוד מקטעים של גנים מתמר בעזרת התחלים הנ"ל השתמשתי בשתי תבניות: (1) DNA גנומי שהופק מעלים מעצי 'ברהי' נורמאליים (2) cDNA שהופק מ-RNA של פרחי תמר, מעצי 'ברהי' נורמאליים (ראה חומרים ושיטות). חומצות הגרעין היו בעלות יחס בליעת אור באורכי גל של 260 ו-280 ננומטר בטווח בין 1.7 ל-2. ג'ל מייצג של Total RNA מוצג באיור 8.

## איור 8 - TOTAL RNA מפרחים של עצי תמר מזן 'ברהי'

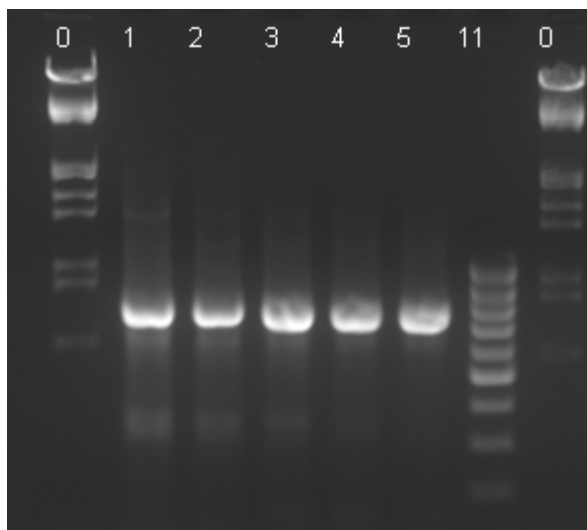


הדוגמאות הורצו בגל 2% אגרוז שנצבע ב-EtBr. בארות 2-7: דוגמאות RNA שהופקו מפרחים מעצים שונים של הזן 'ברהי'. בארות 1, 8 - סמן גודל Lambda DNA/EcoRI+HindIII. ראה תיאור החומר הצמחי ופרוט שיטת ההפקה והבדיקה בפרק חומרים ושיטות.

התחלים הדגנרטיביים שימשו לריאקציות PCR עם DNA גנומי או cDNA מפרחים של תמר. טמפרטורת החיבור (annealing) נקבעה ב-PCR בתנאי גרדיאנט טמפרטורות. תוצרי הריאקציה הורצו בג'ל. במידה והתקבל יותר מתוצר אחד, התוצר הרצוי נבחר בגודל הצפוי. במידה ולא היה מידע מתאים, נבחרו מספר תוצרים פוטנציאליים. התוצרים שבודדו מהג'ל

נשלחו לריצוף. ג'ל מייצג של תוצרי PCR שהתקבלו משימוש בתחלים הדגנרטיבים של הגן SPW1 על תבנית DNA גנומי מוצג באיור 9.

#### איור 9 - תוצרי PCR של הגן SPW1



הדוגמאות הורצו בגל 2% אגרוז שנצבע ב-EtBr. תוצר PCR שהתקבל משימוש בתחלים הדגנרטיבים של הגן SPW1 על תבנית DNA גנומי מהזן 'ברהי' (באות 1-5) בגרדיאנט של טמפ' annealing. בארות: 1 - 45 °C; 2 - 47 °C; 3 - 50 °C; 4 - 53 °C; 5 - 55 °C. 0 - סמן גודל Lambda DNA/EcoRI+HindIII. 11 - סמן גודל GeneRuler. ראה פירוט בחומרים ושיטות.

במיקרים בהם לא התקבל תוצר מ-DNA גנומי, התחלים נבדקו על תבנית cDNA. כך נבחנה האפשרות שלא התקבל תוצר ב-DNA הגנומי עקב קיומו של אינטרון בין התחלים. תוצר שהתקבל על תבנית cDNA הושווה לרצף הגנומי של גנים אורתולוגיים במינים חד-פסיגיים אחרים לאיתור אזורי אינטרון - אקסון ותחלים חדשים עוצבו בהתאם. נבדקה רמת ההומולוגיה של התוצר לגנים האורתולוגיים ממינים שונים. שמו של כל גן מתמר נבחר לפי שם הגן האורתולוגי מצמחי המקור ומתחילת שמו הלטיני של התמר המצוי (*Phoenix* L *dactylifera*), לדוגמא מקטע הגן SPW1 מתמר נקרא PdSPW1.

בבדיקת מקטע ה-cDNA שהתקבל משימוש בתחלים הדגנרטיבים של SPW1 בתוכנה ClustalW נמצאה הומולוגיה גבוהה לגן DEFICIENS מדקל השמן (*Elaeis guineensis*) (ההומולוגי לגן AP3 מארבידופסיס), לגן AP3-like מהצמח החד-פסיגי אלפיניה (*Alpinia hainanensis*) והומולוגיה נמוכה יותר לגנים ממיני צמחים חד-פסיגיים נוספים כמו לגן AP3-like מסחלב (*Dendrobium crumenatum*), לגן AP3-like מהצמח כרכום הגינה (*Crocus sativus*), לגן DEFICIENS מהצמח אספרג רפואי (*Asparagus officinalis*), לגן DEFICIENS מהצמח שושן המלכים (*Lilium regale*), לגנים הומולוגים לגן AP3 מהדגניים חיטה, אורז, ותירס (איור 10) ולגנים אורתולוגיים נוספים כמו הגן DEFICIENS מצמח החד פסיגי כדן (*Muscari armeniacum*).

## איור 10 - השוואת רצף cDNA של הגן PdSPW1 במינים שונים

<b>PdSPW1</b>	TCCTACTAACC	GGCAGGTCACCTACTCCAAGAGGAGGACGGGGATCATGAAGAAGGCTAA	67
<i>Elaeis</i> DEF1	TCCTACCAAC	AGGCAGGTGACCTACTCCAAGAGGAGGACGGGGATCATGAAGAAGGCTAA	132
<i>Dendrobium</i> AP3L	CCCTACGAACC	GGCAGGTTACTTACTCTAAGAGGAGGGCTGGGATCATGAAGAAGGCCAA	126
<i>Crocus</i> AP3L	TGCGACCAACC	GTCAAGTGACCTACTCCAAGAGGAGGCTGGGATCATGAAGAAGGCCAA	192
<i>Alpinia</i> AP3L	CCCAACCAAC	CAGGTCAGCTTATTCCTAAGAGGAGGTCAGGGATCATGAAGAAGGCGAG	74
<i>Asparagus</i> AODEF	CCCAACAAAC	CAGGTCAGCTTATTCCTAAGAGGAGGTCAGGGATCATGAAGAAGGCCAA	240
<i>Lilium</i> LRDEF	CTCGACGAAT	CGACAGGTCACTTACTCGAAGCGCCGGACCGGAATCATCAAGAAGGCGAC	107
<i>Triticum</i> MADS51	CGCCACCAAC	CAGGTCAGCTACTCCAAGCGCCGGTCGGGGATCATGAAGAAGGCGCG	106
<i>Zea silky1</i>	CGCCACCAACC	GCCAGGTCAGCTACTCCAAGCGCCGGACGGGGATCATGAAGAAGGCACG	98
<i>Oryza</i> SPW1	CGCGACCAAC	CAGGTCAGCTACTCGAAGCGCCGACGGGGATCATGAAGAAGGCCAG	163
	* * * *	* *	
<b>PdSPW1</b>	GGAGCTGACGGT	GCTTTGCGATGCGGAGGTCTCGCTTATCATGTTCTCCAGCACCCGGCAA	127
<i>Elaeis</i> DEF1	GGAGCTGACGGT	GCTTTGCGATGCTGAGGTCTCGCTTATCATGTTCTCCAGCACCCGGCAA	192
<i>Dendrobium</i> AP3L	CGAGTTGACAGT	TCTGTGCGACGCTCAGCTCTCACTTGTAAATGTTCTCGAGCACCCGGCAA	186
<i>Crocus</i> AP3L	GGAGCTCACCGT	CCTCTGCGATGCCGAGGTTTCTATTTATCATGCTCTCCAGCACCCGGAAA	252
<i>Alpinia</i> AP3L	GGAGCTCACCGT	GCTGTGCGATGCTGAGGTCTCCATCATCATGTTCTCCAGCACCCGGCAA	134
<i>Asparagus</i> AODEF	GGAACCTCACT	GTCCTTTGCGATGCTCAGGTTTCCCTTATTTATGTTCTCTAGCACCCGGCAA	300
<i>Lilium</i> LRDEF	TGAGCTCACT	GTCCTGTGATGCCGAGGTCTCTCTCCTTATGTTCTCCAGCACCCGGGAA	167
<i>Triticum</i> MADS51	GGAGCTCACCGT	GCTCTGCGACGCCAGGTCGCCATCATCATGTTCTCCTCCACCACCCGGCAA	166
<i>Zea Silky1</i>	GGAGCTCACCGT	GCTCTGCGACGCCAGGTCGCCATCATCATGTTCTCCTCCACCACCCGGCAA	158
<i>Oryza</i> SPW1	GGAGCTCACCGT	GCTCTGCGACGCCAGGTCGCCATCATCATGTTCTCCTCCACCACCCGGCAA	223
	** * * * *	** *	
<b>PdSPW1</b>	GTTCTCCGAGT	ACTGCAGCCCTCAACCGACACCAAGAGGATATTTGATCGCTACCAGCA	187
<i>Elaeis</i> DEF1	GTTCTCCGAGT	ATTGCAGCCCTTTCCGACACCAAGACCATATTTGATCGCTACCAGCA	252
<i>Dendrobium</i> AP3L	GTTCTCTGAGT	ATTGTAGCCCGTCCACTGACACGAAGATATATATGATCGTTACCAGCA	246
<i>Crocus</i> AP3L	GTTCTGCTGAGT	ACTGCAGCCCTACCACCGACCTCAAGAAGGTTGTCGATCGTTACCAACA	312
<i>Alpinia</i> AP3L	GTTCTCTGATT	ACTGCAGCCCTTCTACTAACACCAAAAAGTATCTTTGATCGTTATCAACA	194
<i>Asparagus</i> AODEF	GTTTCTGAGT	ACTGCAGCCCTGGATCTGACACCAAGGCCATATTTGATCGTTATCAGCA	360
<i>Lilium</i> LRDEF	GCTGTCAGAGT	TCTGCAGCCCTCCACAGACACGAAGAAGATCTTCGACCCGCTACCAGCA	227
<i>Triticum</i> MADS51	GTACCACGAGT	TCTGCAGCACCCGGCACCCGACATCAAGGGGATCTTTGACCCGCTACCAGCA	226
<i>Zea Silky1</i>	GTACCACGAGT	TCTGCAGCCCGGAACCGACATCAAGACCATCTTTGACCCGCTACCAGCA	218
<i>Oryza</i> SPW1	GTACCACGAGT	TCTGCAGCCCTTCCACCGACATCAAGGGGATCTTTGACCCGCTACCAGCA	283
	*	** *	

.BLAST של מקטע cDNA מהגן PdSPW1 מתמר לגנים ההומולוגים ביותר שהתקבלו ב-  
 ה-Multiple Alignment נעשה בתוכנה ClustalW.  
 \* - נוקלאוטיד שמור בכל הפרטים הנבדקים

מקטע ה-cDNA של הגן PdSPW1 תורגם לחלבון בעזרת התוכנות DNAMAN ו-BioEdit.  
 רצף חומצות האמינו המקודדות במקטע נבדק ב-BlastX ובתוכנת ClustalW, ונמצאה  
 הומולוגיה גבוהה לגן DEFICIENS מדקל השמן ולגן DEFICIENS מצמח החד פסיגי כדן  
 (*Muscari armeniacum*) (איור 11).

## איור 11 - השוואת רצף חומצות אמינו בין אורתולוגים של הגן PdSPW1

```

EgDEF1      MGRGKIEIKKIENPTNRQVTYSKRRTGIMKKAKELTVLCAEVSLIMFSSTGKFSEYCS 60
Muscaridef  MGRGKIEIKKIENPTNRQVTYSKRRTGIMKKAKELTVLCAEVSLVMFSSTGKFSEYCS 60
PdSPW1      -----QNPTNRQVTYSKRRTGIMKKAKELTVLCAEVSLIMFSSTGKFSEYCS 49
              :*****:*****:*****:
EgDEF1      LSDTKTIFDRYQQVSGINLWSAQYEKMQNTLNHLREINQNLRRREIRQRMGEDLD 120
Muscaridef  GTDTKTIFDRYQQVTGINLWSAQYEKMQSTLNHLKDIHNLRRKEIRQRMGEELDGLDI 120
PdSPW1      STDTKRIFDRYQQVSGINLWGAQYRKCKIL----- 79
              :*** *****:*****.***.* :
    
```

Multiple Alignment בתוכנה ClustalW של מקטע cDNA מהגן PdSPW1 שתורגם לחלבון, ותרגומי הגנים DEFICIENS מדקל השמן (EgDEF1) ומדן (*Muscaric armeniacum*).  
 \* - נ.אמינית זהה בכל הפרטים הנבדקים. : - נ.אמינו דומות. - .נ.אמינו דומות חלקית

## 4.2. איפיון גנים מבקרי פריחה מתמר

בעבודה זו זוהו ובודדו 11 מקטעי גנים מתמר בעלי הומוולוגיה גבוהה לגנים המבקרים התפתחות הפרח במיני צמחים שונים, כמפורט בטבלה 9. גנים אלו בודדו מ-DNA גנומי ומ-cDNA כפי שתואר לעיל בדומה לזיהוי הגן SPW1. בשאר הגנים המועמדים שבחרתי - LFY, TFL1, FUL, WUS, FBP11, SUP, ו-UFO (ראה טבלה 8), לא אותרו אזורים שמורים מספיק לתכנון תחלים, או שלמרות מספר ניסיונות לא התקבל תוצר הומוולוגי מתמר. מקטעי DNA גנומי שבודדו היו בגדלים שונים הנעים בין 200 קב מהמקטע שבודד מהגן PdAG ועד מקטע של 790 קב מהגן PdMADS4. לא אותרו מקטעים גנומיים לגנים PdSQUA1, PdAFO1 ו-PdAFO2. מקטעים מרצפי cDNA בודדו מ-RNA מפרחי 'ברהי'. טווח הגדלים של מקטעים אלה היה בין 123 קב מהגן PdDIF ועד 648 קב מהגן PdAGL2-3. טבלה 9 מסכמת את מקטעי הגנים שבודדו ואת רמות ההומוולוגיה שלהם לגנים אורתולוגים ממינים אחרים, כפי שנמצא ב-BLAST ברמת ה-cDNA וברמת התרגום לחלבון. מידת ההומוולוגיה ברמת ה-cDNA לגנים האורתולוגים נעה בין 71%-ל-96%. גנים מדקל השמן הראו הומוולוגיה גבוהה ביותר של בין 96%-90% (למעט הגן PdCLV, בו ההומוולוגיה היתה 81%).

טבלה 9 - אפיון מקטעי גנים אורתולוגים מתמר לגנים מבקרי התפתחות הפרח

שעור ההומולוגיה ברמת החלבון לגנים האורתולוגים		גנים אורתולוגים ברמת החלבון	מספר חומצות אמינו	שעור ההומולוגיה ברמת ה-cDNA לגנים האורתולוגים		גנים אורתולוגים	אורך מקטע מרוצף (bps)		שם הגן
אחוז הומולוגיה	אורך מקטע (aa)			אחוז הומולוגיה	אורך מקטע (bps)		cDNA	DNA גנומי	
95	215	<i>Elaeis guineensis</i> AGL2-3	216	96	643	<i>Elaeis guineensis</i> AGL2-3	648	230	<b>PdAGAMOUS-LIKE2-3 (PdAGL2-3)</b>
83	214	<i>Musa acuminata</i> MADS3		82	648	<i>Musa acuminata</i> MADS3			
90	160	<i>Elaeis guineensis</i> SQUA1	168	93	492	<i>Elaeis guineensis</i> SQUA1	504	-	<b>PdSQUAMOSA1 (PdSQUA1)</b>
90	160	<i>Elaeis guineensis</i> FUL-like		92	495	<i>Elaeis guineensis</i> FUL-like			
68	156	<i>Oryza sativa</i> AP1-like MADS box		80	449	<i>Oryza sativa</i> FDRMADS3			
70	168	<i>Elaeis guineensis</i> AGL2-4	176	93	366	<i>Elaeis guineensis</i> AGL2-5	528	472	<b>PdAGAMOUS-LIKE2-4 (PdAGL2-4)</b>
68	168	<i>Prunus persica</i> MADS2		86	522	<i>Elaeis guineensis</i> AGL2-4			
89	192	<i>Elaeis guineensis</i> AG2	196	93	581	<i>Elaeis guineensis</i> AG2	588	200	<b>PdAGAMOUS (PdAG)</b>
88	192	<i>Elaeis guineensis</i> AG1		80	579	<i>Asparagus virgatus</i> AVAG1			
92	75	<i>Elaeis guineensis</i> DEF1	79	92	235	<i>Elaeis guineensis</i> DEF1	237	747	<b>PdSUPERWOMAN1 (PdSPW1)</b>
89	75	<i>Muscari armeniacum</i> DEF		81	146	<i>Oryza sativa</i> SPW1			
86	75	<i>Asparagus officinalis</i> DEF		77	221	<i>Zea mays</i> SILKY1			

שעור ההומולוגיה ברמת ה-cDNA וברמת החלבון של המקטעים מגנים מבקרי פריחה מתמר לגנים אורתולוגים במינים אחרים נקבעה באמצעות BLAST. הגן האורתולוגי הראשון ברשימה עבור כל גן מתמר הוא הגן בעל ההומולוגיה הגבוהה ביותר. הגנים מסודרים בסדר יורד של שעור ההומולוגיה ברמת ה-cDNA. אורך המקטע המרוצף מתייחס רק לרצף איכותי ואמין. מקטע ה-cDNA של הגן תורגם לחלבון בעזרת התוכנת DNAMAN. שעור ההומולוגיה ברמת החלבון מתייחס לחומצות אמינו זהות (Identities).



טבלה 9 – המשך

שעור ההומולוגיה ברמת החלבון לגנים האורתולוגים		גנים אורתולוגים ברמת החלבון	מספר חומצות אמינו	שעור ההומולוגיה ברמת ה-cDNA לגנים האורתולוגים		גנים אורתולוגים	אורך מקטע מרוצף (bps)		שם הגן
אחוז הומולוגיה	אורך מקטע (aa)			אחוז הומולוגיה	אורך מקטע (bps)		cDNA	DNA גנומי	
88	70	<i>Alstroemeria ligtu</i> GLO	84	90	252	<i>Elaeis guineensis</i> GLO1	252	790	<b>PdMADS4</b>
84	84	<i>Elaeis guineensis</i> GLO1		86	249	<i>Musa acuminata</i> MADS1			
65	38	<i>Nelumbo nucifera</i> defensin	41	90	123	<i>Elaeis guineensis</i> defensin EGAD1	123	359	<b>PdDIF</b>
60	33	<i>Elaeis guineensis</i> EGAD1		85	89	<i>Helianthus annuus</i> defensin			
70	148	<i>Antirrhinum majus</i> YABBY-like GRAMINIFOLIA	148	88	116	<i>Triticum aestivum</i> YABBY protein (YAB1)	444	-	<b>PdABNORMAL FLORAL ORGANS (PdAFO1)</b>
64	148	<i>Amborella trichopoda</i> filamentous flower like		87	154	<i>Zea mays</i> yabby10			
71	112	<i>Ruscus aculeatus</i> YABBY2 like protein	126	84	131	<i>Oryza sativa</i> FIL2	378	-	<b>PdABNORMAL FLORAL ORGANS (PdAFO2)</b>
58	115	<i>Oryza sativa</i> YABBY2 protein		83	143	<i>Arabidopsis thaliana</i> YABBY2			

שעור ההומולוגיה ברמת ה-cDNA וברמת החלבון של המקטעים מגנים מבקרי פריחה מתמר לגנים אורתולוגים במינים אחרים נקבעה באמצעות BLAST. הגן האורתולוגי הראשון ברשימה עבור כל גן מתמר הוא הגן בעל ההומולוגיה הגבוהה ביותר. הגנים מסודרים בסדר יורד של שעור הומולוגיה ברמת ה-cDNA. אורך המקטע המרוצף מתייחס רק לרצף איכותי ואמין. מקטע ה-cDNA של הגן תורגם לחלבון בעזרת התוכנת DNAMAN. שעור ההומולוגיה ברמת החלבון מתייחס לחומצות אמינו זהות (Identities).

טבלה 9 – המשך

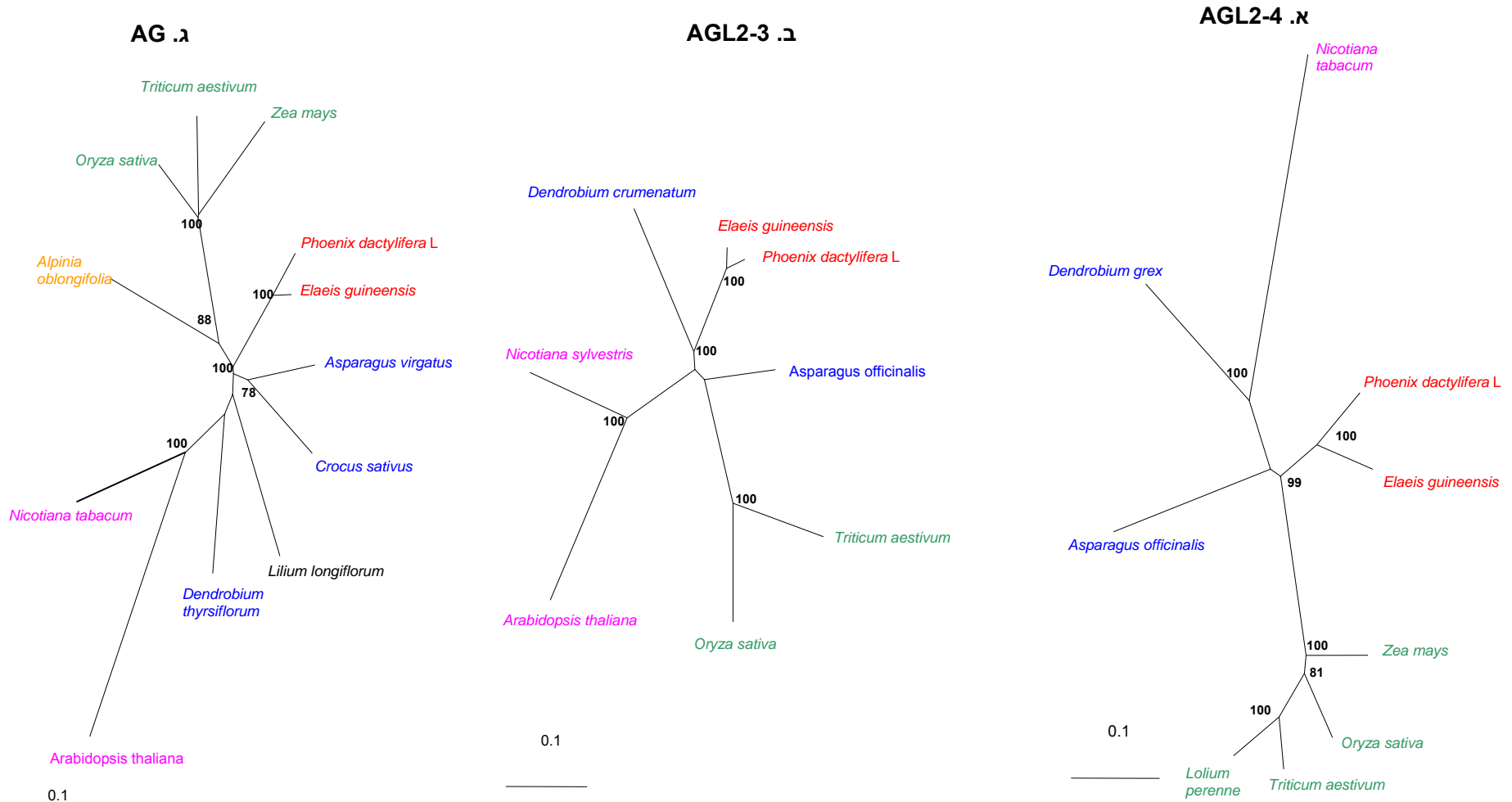
שעור ההומולוגיה ברמת החלבון לגנים האורתולוגים		גנים אורתולוגים ברמת החלבון	מספר חומצות אמינו	שעור ההומולוגיה ברמת ה-cDNA לגנים האורתולוגים		גנים אורתולוגים	אורך מקטע מרוצף (bps)		שם הגן
אחוז הומולוגיה	אורך מקטע (aa)			אחוז הומולוגיה	אורך מקטע (bps)		cDNA	DNA גנומי	
70	87	<i>Oryza sativa</i> Drooping leaf	87	83	143	<i>Gossypium hirsutum</i> CRABS CLAW	261	640	<b>PdDROOPING LEAF (PdDL)</b>
65	87	<i>Triticum aestivum</i> CRC		71	252	<i>Oryza sativa</i> drooping leaf (DL)			
88	90	<i>Glycine max</i> receptor-like kinase	90	81	270	<i>Elaeis guineensis</i> Rlk-OPsc	272	480	<b>PdCLAVATA (PdCLV)</b>
85	90	<i>Oryza sativa</i> receptor-like kinase		78	242	<i>Glycine max</i> receptor-like protein kinase 1 (RLK1)			
85	90	<i>Elaeis guineensis</i> receptor-like kinase		73	186	<i>Arabidopsis thaliana</i> CLV			

שעור ההומולוגיה ברמת ה-cDNA וברמת החלבון של המקטעים מגנים מבקרי פריחה מתמר לגנים אורתולוגים במינים אחרים נקבעה באמצעות BLAST. הגן האורתולוגי הראשון ברשימה עבור כל גן מתמר הוא הגן בעל ההומולוגיה הגבוהה ביותר. הגנים מסודרים בסדר יורד של שעור הומולוגיה ברמת ה-cDNA. אורך המקטע המרוצף מתייחס רק לרצף איכותי ואמין. מקטע ה-cDNA של הגן תורגם לחלבון בעזרת התוכנת DNAMAN. שעור ההומולוגיה ברמת החלבון מתייחס לחומצות אמינו זהות (Identities).

כדי לבחון את המרחק הגנטי בין המינים השונים נבנו עצים פילוגנטיים על בסיס מקטעי ששת הגנים המכילים MADS box domain (PdAG), PdSPW1, PdSQUA1, PdMADS4, PdAGL2-3 ו-PdAGL2-4). לבניית העצים נבחרו גנים אורתולוגיים מדקל השמן שהינו המין הקרוב ביותר לתמר בו יש רצפים ידועים, מהצמחים המוכרים ביותר המייצגים את משפחת הדגניים - אורז, חיטה, תירס וזון, וכן מצמחים חד-פסיגיים נוספים שנתנו הומולוגיה גבוהה לתמר (לא פחות מ-75%) לפחות בשלושה גנים - כגון אספרג רפואי (*Asparagus officinalis*) סחלב (*Dendrobium crumenatum*), שושן המלכים (*Lilium regale*), כרום הגינה (*Crocus sativus*) ואלפיניה (*Alpinia hainanensis*). בנוסף נבחרו גנים ממספר צמחי מודל דו-פסיגיים - ארבידופסיס, לוע הארי וטבק. העצים נבנו לפי האזורים השמורים של הגן ולא כל מיני הצמחים מופיעים בכל עץ. ערכי Bootstrap מציינים את מידת המובהקות הסטטיסטית של ההתפצלות ואינם מתייחסים למרחקים הגנטיים. העצים מוצגים באיור 12.

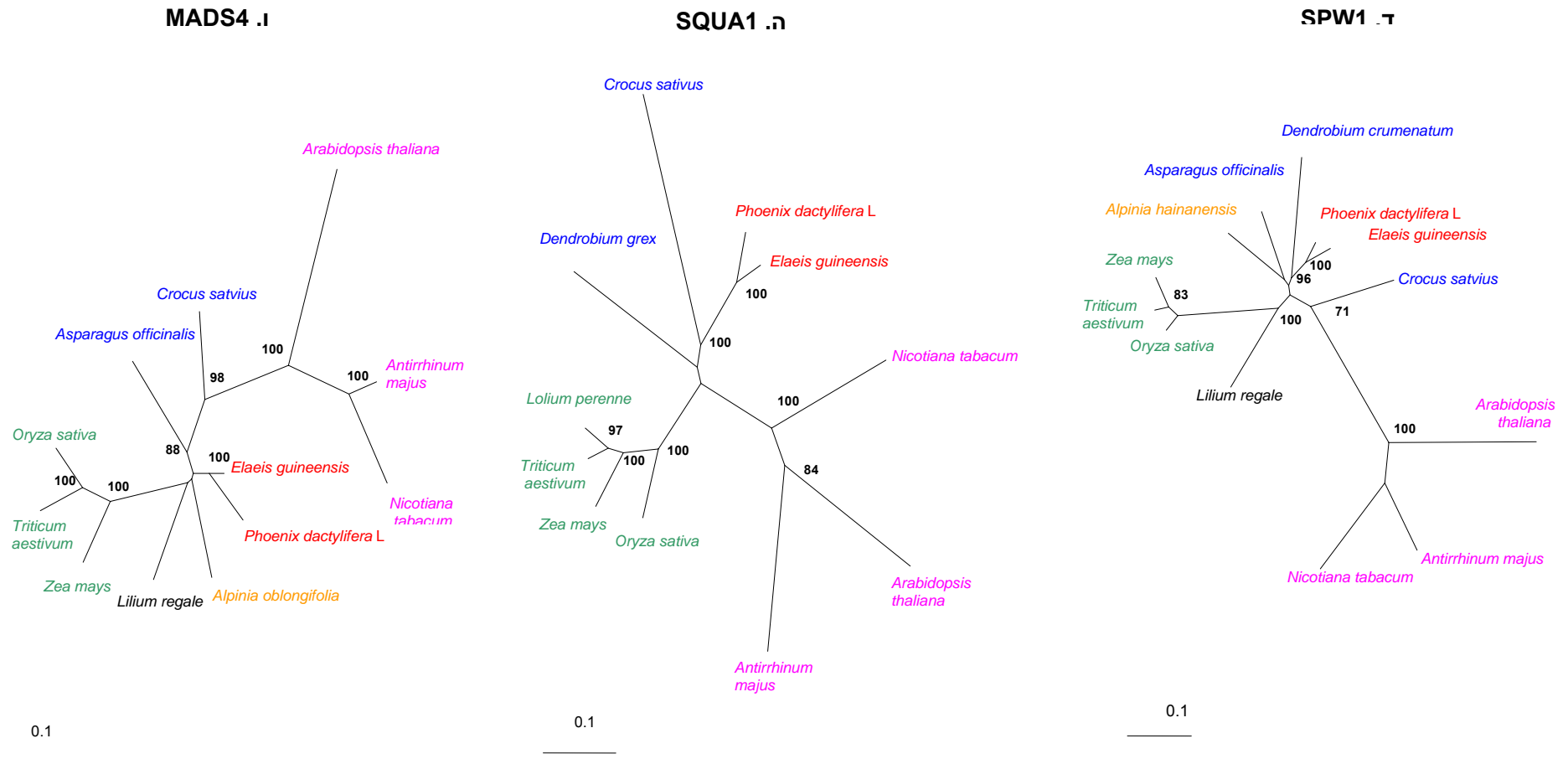
דקל השמן הוא הקרוב ביותר מבחינה בוטנית לדקל התמר (שניהם ממשפחת הדקליים), ולכן בעצים שהתקבלו דקל השמן הינו הקרוב ביותר לתמר. כצפוי בכל העצים הצמחים הדו-פסיגיים התקבצו לקבוצה אחת שהיתה המרוחקת ביותר מבחינה פילוגנטית מתמר. הצמחים מסדרת הדגנאים הופיעו תמיד בקבוצה אחת. אספרג כרום וסחלב השייכים לסדרת האספרגאים, לא תמיד התקבצו לקבוצה אחת. בגלל מיעוט אינפורמציה במאגרי המידע על מיני הצמחים השונים לא נבנו עצים פילוגנטיים עבור הגנים שאינם שייכים למשפחת ה-MADS box.

איור 12 - עצים פילוגנטיים על בסיס הרצף של גנים מסוג MADS box



העצים הפילוגנטיים מבוססים על מקטעי cDNA הומולוגיים למקטע שבודד מהגן מתמר. העצים נבנו בעזרת התוכנה PHYLIP בשיטת NEIGHBOR (Felsenstein, 1999), והוצגו בעזרת התוכנה TREEVIEW (Page, 2000). ערכי Bootstrap הגבוהים מ-70 שחשבו בעזרת התוכנות Seqboot ו-Consense מוצגים במקומות הפיצול ומציינים את מידת המובהקות הסטטיסטית של ההתפצלות. הצבעים מסמלים את הסדרות השונות: אדום- סדרת הדקלאיים, ירוק- סדרת הדגנאים, כחול- סדרת האספרגאים, כתום- סדרת הזנגבילאים, ורוד- סדרת הסולנאים והצלפאים, שחור- סדרת השושנאים.

איור 12 - עצים פילוגנטיים על בסיס הרצף של גנים מסוג MADS box



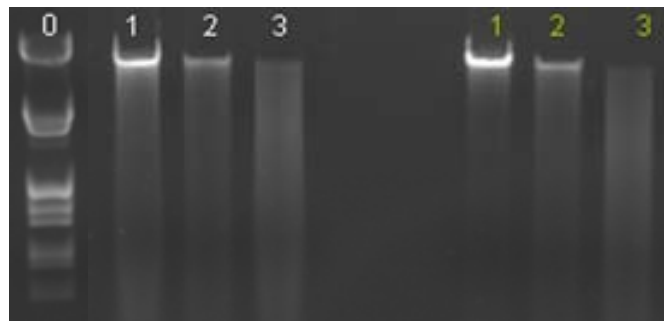
העצים הפילוגנטיים מבוססים על מקטעי cDNA הומולוגיים למקטע שבודד מהגן מתמר. העצים נבנו בעזרת התוכנה PHYLIP בשיטת NEIGHBOR (Felsenstein, 1999), והוצגו בעזרת התוכנה TREEVIEW (Page, 2000). ערכי Bootstrap הגבוהים מ-70 שחושבו בעזרת התוכנות Seqboot ו-Consense מוצגים במקומות הפיצול ומציינים את מידת המובהקות הסטטיסטית של ההתפצלות. הצבעים מסמלים את הסדרות השונות: אדום- סדרת הדקלאיים, ירוק- סדרת הדגנאים, כחול- סדרת האספרגאים, כתום- סדרת הזנגבילאים, ורוד- סדרת הסולנאים והצלפאים, שחור- סדרת השושנאים.

### 4.3. איפיון דגמי מתילציה

בחינה ראשונית של דגמי מתילציה נעשתה בשניים ממקטעי הגנים שבודדו: PdMADS4, PdSPW1. ההשוואה נעשתה בין DNA גנומי שהופק מעץ 'ברהי' נורמאלי שרובה מחוטר, ל-DNA גנומי שהופק מעץ 'ברהי' חריג שרובה בתרבית רקמה. ה-DNA נחתך על ידי שני איזוסוכיזומרים, *HpaII* ו-*MspI* (איור 13) המזהים את אותו אתר חיתוך מבחינת רצף הבסיסים אך בעלי רגישות שונה למתילציה של אתר זה. נמצא שחלק מה-DNA לא נחתך על ידי *HpaII* ונשאר כפרגמנטים גדולים מאוד (איור 13).

#### איור 13 - חיתוך DNA גנומי מתמר באנזימים *HpaII* ו-*MspI*

'ברהי' חריג                      'ברהי' נורמאלי

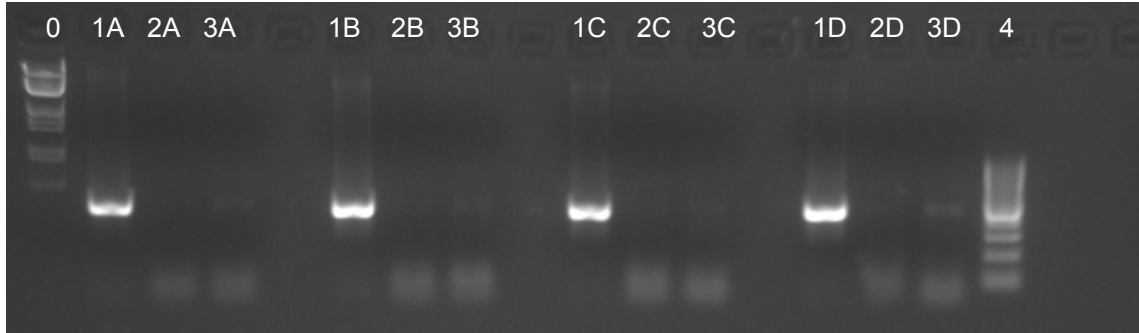


דוגמאות ה-DNA הורצו בגל 2% אגרוז שנצבע ב-EtBr. כל דוגמת DNA מ'ברהי' נורמאלי וחריג נחתכה בנפרד על ידי האנזימים *HpaII* ו-*MspI*. בארות: 1 - ביקורת DNA לא חתוך, 2 - DNA חתוך ב-*HpaII*, 3 - DNA חתוך ב-*MspI*. 0 - מן גודל  $\lambda$  DNA/EcoRI+HindIII.

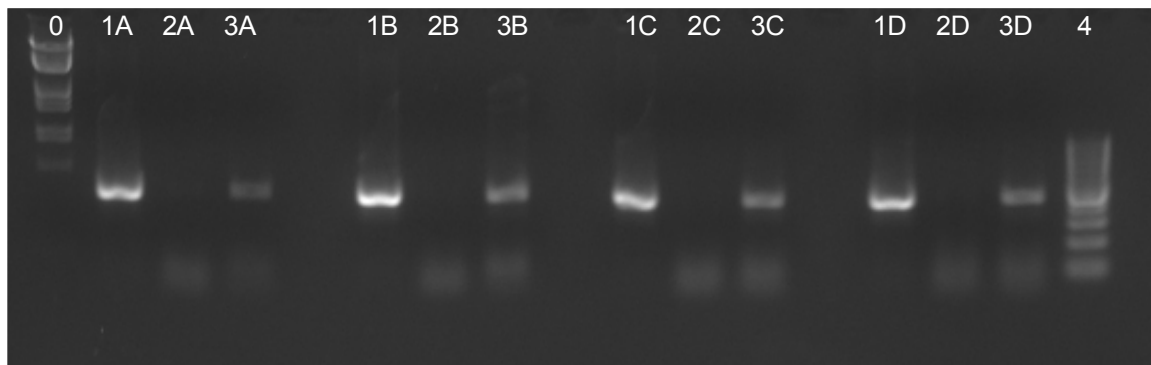
לשני הגנים PdMADS4 ו-PdSPW1 תוכננו תחלים ליצירת שני מקטעים של כ-400 bp החובקים את האתרים של *HpaII/MspI* (טבלה 6 בפרק חומרים ושיטות). בגן PdSPW1 מקטע אחד (A) הכיל שלושה אתרי חיתוך של *HpaII/MspI* והמקטע השני (B) הכיל אתר חיתוך אחד של *HpaII/MspI*. בגן PdMADS4 מקטע אחד (A) הכיל שני אתרי חיתוך של *HpaII/MspI* והמקטע השני (B) הכיל אתר חיתוך אחד של *HpaII/MspI*. כדי לבדוק את שיעור האתרים הממותלים נעשה Semi-Quantitative PCR. ערכנו השוואה בין DNA לא חתוך (ביקורת) עם DNA חתוך ב-*HpaII* ו-DNA חתוך ב-*MspI* לאחר מספר שונה של מחזורים ב-PCR. עבור מקטע B בשני הגנים לא התקבל כל תוצר ב-DNA החתוך באנזימי הרסטריקציה. עבור מקטע A בשני הגנים לא התקבל כל תוצר ב-DNA מהעץ הנורמאלי החתוך ב-*HpaII* וב-*MspI*, וב-DNA מהעץ החריג החתוך ב-*HpaII*. כלומר תבנית ה-DNA נחתכה באתרים הנבדקים שלא היו ממותלים. אולם ב-DNA של שני הגנים מהעץ החריג שנחתכו ב-*MspI* התקבל לעיתים תוצר חלש מאוד (איור 14) שיכול לנבוע משאריות DNA לא חתוך עקב פעילות לא מלאה של האנזים (יכול לנבוע מהבדלים ברמת נקיון ה-DNA) (ראה איור 13) או ממתילציה ברמה נמוכה.

איור 14 - Semi-Quantitative PCR לאפיון רמות המתילציה של אתרי *HpaII*/*MspI* בגנים מועמדים

א- תוצרי PCR מתחלי הגן PdSPW1 על תבנית DNA גנומי מעץ נורמאלי



ב- תוצרי PCR מתחלי הגן PdSPW1 על תבנית DNA גנומי מעץ חריג



תוצרי semi quantitative PCR מתחלי מקטע A של הגן PdSPW1 על תבנית DNA גנומי מעץ נורמאלי (א) ומעץ חריג (ב). בארות: 1 – DNA לא חתוך, 2 – DNA חתוך ב-*HpaII*, 3 – DNA חתוך ב-*MspI*. קבוצה A – לאחר 28 מחזורים, קבוצה B – לאחר 32 מחזורים, קבוצה C – לאחר 36 מחזורים, קבוצה D – לאחר 40 מחזורים. 0 – סמן גודל *Lambda DNA/EcoRI+HindIII*. 4 – סמן גודל GeneRuler.

רמת המתילציה הוערכה על ידי השוואת עוצמת הפס ב-DNA החתוך מחולק בעוצמת הפס ב-DNA הלא חתוך (בריאקציה בה נראו תוצרים ברורים במספר המחזורים הנמוך ביותר). עצמת הפס חושבה בעזרת התוכנה AlphaEase FC. בגן PdSPW1 בעץ נורמאלי לא נוצר תוצר כלל, כלומר ה-DNA נחתך באתרים הספציפים אותם בדקנו. בעץ החריג (בתנאי ריאקציה של 28 מחזורים) לא נוצר תוצר ב-DNA החתוך ב-*HpaII*, אך ב-DNA החתוך על ידי *MspI* נמצא כ-12% תוצר בהשוואה ל-DNA הלא חתוך. בגן PdMADS4 בעץ נורמאלי לא נוצר תוצר כלל, כלומר ה-DNA נחתך כולו באתרים הספציפים אותם בדקנו. בעץ החריג לא נוצר תוצר ב-DNA החתוך על ידי *HpaII*, אך ב-DNA החתוך על ידי *MspI* נמצא כ-5% תוצר יחסית ל-DNA הלא חתוך (טבלה 10). יתכן שתוצרים אלה נובעים מאחוז מסוים של אתרים ממותלים בגנים הנבדקים, אך השיטה אינה רגישה מספיק כדי להבדיל בין הסבר זה לבין חיתוך לא מלא של *MspI* הנובע מסיבה אחרת.

#### טבלה 10 - חיתוך DNA על ידי HpaII/MspI

שם הגן	פנוטיפ העץ ושמו	עוצמת תוצר ה-PCR על DNA תבנית לא חתוך	עוצמת תוצר ה-PCR על DNA תבנית חתוך HpaII	עוצמת תוצר ה-PCR על DNA תבנית חתוך MspI	אחוז התוצר שלא נחתך ע"י MspI	אחוז התוצר שלא נחתך ע"י HpaII
PdSPW1	נורמאלי A7	6350	0	0	0.0	0.0
	חריג ג	8394	0	1024	12.2	0.0
PdMADS4	נורמאלי A7	4327	0	0	0.0	0.0
	חריג ג	10390	0	537	5.2	0.0

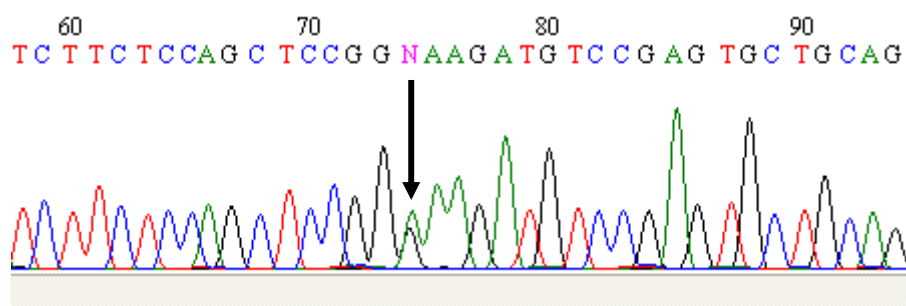
בחינת המתילציה ב-DNA גנומי נעשתה בשיטת Semi-Quantitative PCR. נעשתה השוואה של DNA לא חתוך (ביקורת) עם DNA חתוך ב-HpaII ו-DNA חתוך ב-MspI מעץ נורמאלי (A7) ומעץ חריג (ג) בריאקציה בה זוהו תוצרים ברורים במספר המחזורים הנמוך ביותר. עוצמת כל פס נקבעה לפי קריאה ממוצעת, לאחר הפחתת קריאת הרקע. אחוז תוצר לא חתוך חושב על ידי חלוקת עוצמת הפס שהתקבל מ-DNA חתוך בעוצמת התוצר שהתקבלה מ-DNA לא חתוך. עוצמת הפסים חושבה בעזרת התוכנה AlphaEase FC.

#### 4.4. השוואת רצפים

השוואת רצף הגנים בין עצי 'ברהי' נורמאליים שרובו מחוטרים, ועצי 'ברהי' חריגים ונורמאליים שרובו בתרבית רקמה נעשתה על DNA גנומי או על cDNA מפרחים (במיקרים בהם לא היה בידי מקטע גנומי). איתור SNPs נעשה בשלב הראשון בגנים PdSPW1, PdMADS4 ו-PdDL בשלוש תערובות DNA (DNA pools): (1) שישה עצים שרובו מחוטרים, (2) שישה עצים חריגים שרובו מתרבית ריקמה, (3) שישה עצים נורמאליים שרובו מתרבית ריקמה. נעשתה הגברה ב-PCR על תבנית התערובות באמצעות מספר זוגות תחלים ליצירת מקטעים בגודל מתאים לריצוף של כ-400 bp (טבלה 6 בפרק חומרים ושיטות). התוצרים רוצפו והושוו. בהשוואות אלה לא אותרו SNPs או הבדלים אחרים בגנים אלה. בשלב הבא של העבודה נעשתה בדיקה שהתבססה על ריצוף של הגנים הנ"ל בפרטים בודדים. בכל הגנים האחרים הסריקה נעשתה בפרטים בודדים בלבד (ולא ב-DNA pools). תוצרי PCR של מקטעי הגנים שנוצרו על תבניות של DNA גנומי או cDNA מעץ נורמאלי אחד שרובה מחוטרים ומעץ חריג אחד שרובה בתרבית ריקמה, רוצפו והושוו. בוצעה סריקה לאיתור SNPs במצב הומוזיגוטי (בכל אתר יהיה בסיס יחיד) או במצב הטרוזיגוטי (האתר יכול תערובת של שני בסיסים באותו מיקום) (איור 15) המבדילים בין הפנוטיפ החריג לפנוטיפ הנורמאלי. במידה וזוהו מצב הטרוזיגוטי בוצע ריצוף חוזר על מנת לפסול את האפשרות של בעיה טכנית בריצוף. במיקרים בהם נמצאו הבדלים כנ"ל בין הרצפים נבדקו רצפי גנים אלה בפרטים נורמאליים וחריגים נוספים לצורך אימות הקשר בין הפנוטיפ והשינוי בבסיס. סיכום תוצאות תוצאות האנליזה מפורט בטבלה 11.



### איור 15 - מצב הטרוזיגוטי בגן PdMADS4

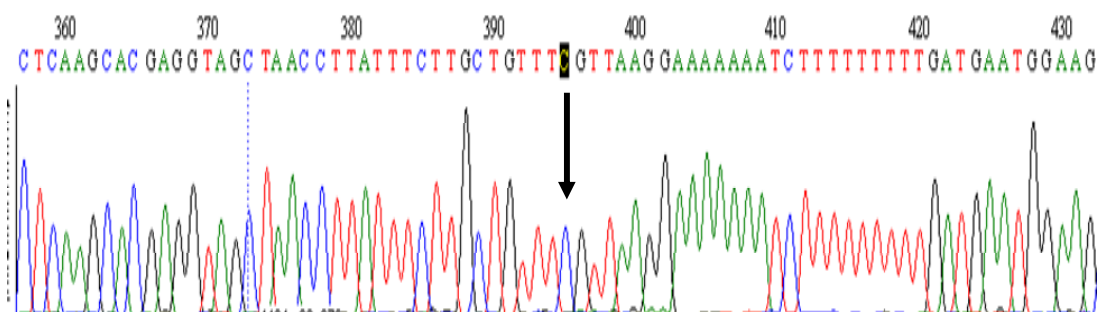


מקטע גנומי של הגן PdMADS4 מעץ חריג. בבסיס מספר 74 (מסומן בחץ) מופיעה תערובת של שני הבסיסים G ו-A.

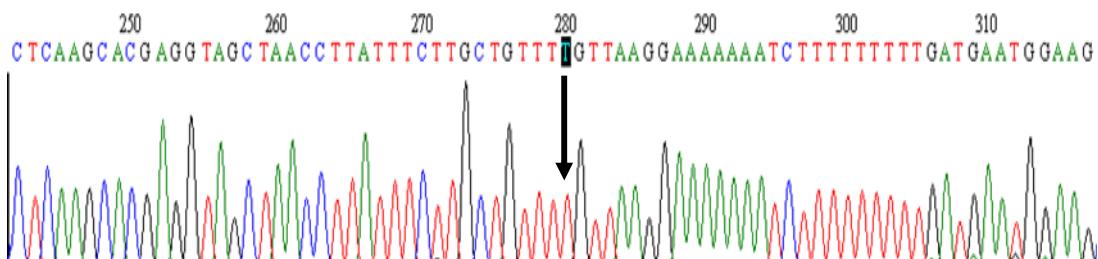
בגן PdMADS4 זוהה SNP במצב הומוזיגוטי T/T בפרט החריג ובמצב הומוזיגוטי C/C בפרט הנורמאלי (איור 16). השוואת רצף המקטע הגנומי לרצף מקטע ה-cDNA של אותו גן הראתה שה-SNP התרחש באינטרון. SNP זה לא נמצא בין עצים נורמאליים לעצים חריגים נוספים, כאשר בכלום נמצא הנוקלאוטיד T. כלומר ה-SNP אינו מבדיל את הפנוטיפ החריג מהפנוטיפ הנורמאלי אלא נמצא רק בעץ נורמאלי מסויים.

### איור 16 - השוואת רצף של הגן PdMADS4

#### א. מקטע PdMADS4 מעץ נורמאלי



#### ב. מקטע PdMADS4 מעץ חריג



השוואת הרצף של מקטע גנומי מהגן PdMADS4 מעץ נורמאלי (א) ומעץ חריג מסוים (ב) בתוכנת Bioedit. הבסיס בו מצוי ה-SNP מסומן בחץ שחור.

בנוסף מצאתי מספר SNPs באזור המקדד בגנים PdAGL2-3, PdSQUA, PdMADS4 ו-PdDL: בגן PdMADS4 מצאנו SNP הטרוזיגוטי (A/G) בעץ החריג לעומת מצב הומוזיגוטי (A/A) בעץ נורמאלי אחד. בגן PdAGL2-3 מצאנו SNP הטרוזיגוטי (A/G) בעץ חריג אחד לעומת מצב הומוזיגוטי (A/A) בעץ נורמאלי אחד. הבדלים אלה ברצף הבסיסים לא גרמו להחלפה של חומצה אמינית.

**טבלה 11 - סיכום הניסויים לאיתור SNPs בין עצי תמר נורמאליים וחריגים**

מספר פרטים שנבדקו	הרצף הנבדק		איפיון SNPs	שם הגן
	חוטרים	עצים חריגים		
1	1	+		PdAFO1 לא נמצאו הבדלים ברצף
1	1	+		PdAFO2 לא נמצאו הבדלים ברצף
1	1	+	+	PdAG לא נמצאו הבדלים ברצף
2	2	+		PdAGL2-3 בעץ נורמאלי אחד נמצא גנוטיפ A/A לעומת גנוטיפ G/A בעץ החריג. SNP זה לא גרם להחלפת חומצה אמינית. הבדל זה לא חזר בפרט נוסף שנבדק.
1	1	+		PdAGL2-4 לא נמצאו הבדלים ברצף
1	1		+	PdCLV לא נמצאו הבדלים ברצף
1	1		+	PdDIF לא נמצאו הבדלים ברצף
2	2		+	PdDL בעץ נורמאלי אחד נמצא גנוטיפ C/G לעומת גנוטיפ G/G בעץ החריג. SNP זה גרם להחלפת חומצה אמינית סרין לטריפטופן. הבדל זה לא חזר בפרט נוסף שנבדק.
3	3		+	PdMADS4 הנוקלאוטיד T נמצא בעץ החריג והנוקלאוטיד C מופיע בעץ הנורמאלי (התרחש באינטרון). בבדיקת הרצף בעצים נורמאליים וחריגים נוספים הופיע רק הנוקלאוטיד T. בעץ חריג אחד נמצא גנוטיפ A/G לעומת גנוטיפ A/A בעץ הנורמאלי. SNP זה לא גרם להחלפת חומצה אמינית. בפרטים נוספים שנבדקו הגנוטיפ A/G חזר בכל העצים החריגים והנורמאליים.
2	2	+		PdSQUA1 בעץ חריג אחד נמצא גנוטיפ C/T לעומת גנוטיפ T/T בעץ הנורמאלי. SNP זה גרם להחלפת חומצה אמינית סרין לפרולין. הבדל זה לא חזר בפרט נוסף שנבדק.
1	1	+	+	PdSPW1 לא נמצאו הבדלים ברצף

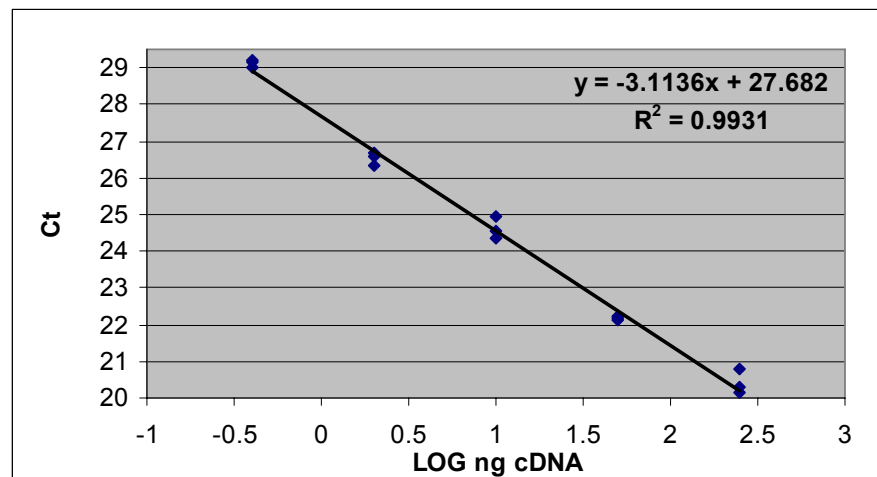
רשימת הגנים מסודרת לפי סדר האלפבית.

בגן PdDL מצאתי SNP הטרוזיגוטי (C/G) בעץ נורמאלי אחד לעומת מצב הומוזיגוטי (G/G) בעץ חריג אחד. שינוי זה מביא להחלפת חומצה אמינית סרין לטריפטופן בעץ הנורמאלי. בגן PdSQUA מצאתי SNP הטרוזיגוטי (C/T) בעץ חריג אחד לעומת מצב הומוזיגוטי (T/T) בעץ נורמאלי אחד. SNP זה גורם להחלפה של חומצה אמינית סרין בפרולין בעץ החריג. בבדיקת עצים נורמאליים ועצים חריגים נוספים, הבדלים אלה לא חזרו על עצמם. סיכום התוצאות מוצג בטבלה 11.

#### 4.5. איפיון דגם הביטוי

קביעה כמותית של רמת הביטוי של הגנים השונים התבססה על שימוש בטכנולוגית Quantitative RT-PCR. כלל ה-RNA הופק מתפרחות נורמאליות במצב של טרום-פתיחה בעצי נקבה בעלי פנוטיפ נורמאלי ומתפרחות דומות מעצים חריגים. ה-RNA שימש כתבנית להכנת cDNA. תוכנו תחלים ייחודיים לגנים בעזרת התוכנה Primer express (טבלה 7 בפרק חומרים ושיטות). במקביל לכיול ולבדיקה של רמות הביטוי של כל גן, נבדקה גם רמת הביטוי של הגן אקטין ששימש לצורך יחוס והשוואה (ראה חומרים ושיטות). בשלב ראשון נבנתה עבור כל גן עקומת כיול לינארית של ערך הסף (Ct) ללוגריתם כמות ה-cDNA בריאקציה (איור 17).

איור 17 - עקומת כיול של הגן PdSPW1 באנליזת Real-Time RT PCR



עקומת כיול (Standard Curve) של ערכי Ct לעומת ערכי LOG של כמות ה-cDNA ההתחלתית בריאקציה (כמות התחלתית בחמישה מיהולי cDNA שונים, לכל מיהול נעשו שלוש חזרות - ראה חומרים ושיטות). הערך Ct מייצג את מספר המחזורים של ריאקציה ה-PCR בהם נמדדה כמות תוצר גבוהה מרמת הסף (Threshold) שנקבעה.

ערך RE (Relative Expression) מייצג את רמת הביטוי של הגן יחסית לביטוי גן הביקורת אקטין וחושב על ידי חלוקת הערך של ריכוז ה-cDNA היחסי עבור הגן הנבדק בריכוז היחסי

של האקטין. ערך ה-Normalized Relative Expression Ratio התקבל על ידי חלוקת ממוצע ערך ה-RE מהעצים החריגים השונים בממוצע ערך ה-RE מהעצים הנורמאליים. בעבודה זאת הגדרנו 'פנוטיפ חמור' כעצים בעלי 'חנטה לקויה' המתבטאת בכ-30-65% פירות פרתנוקרפיים בהם מתפתחות כל שלוש השחלות ומעל-15% 'ריבוי שחלות'. ה'פנוטיפ החלש' הוגדר כעצים בעלי 'חנטה לקויה' המתבטאת בכ-30-65% פירות פרתנוקרפיים בהם מתפתחות כל שלוש השחלות וכ-0-5% חנטים 'מרובי שחלות' (נבדקו גם עצים בהם לא נמצאו כלל חנטים מרובי שחלות) (טבלה 3 בפרק חומרים ושיטות).

בשלב הראשון נבדק דגם הביטוי במספר קטן של עצים בהנחה ששינוי משמעותי בביטוי גן מסויים המצוי באסוציאציה לפנוטיפ יופיע באופן ברור גם במספר מצומצם של פרטים. בגנים בהם נמצא שינוי משמעותי בביטוי הגן, נבדק דגם הביטוי בהמשך במספר עצים נוספים כדי לאמת את התוצאות.

בניסוי הראשון ערכנו השוואה של רמת הביטוי של כל אחד מהגנים על בסיס הממוצע של שלושה עצים חריגים בעלי 'פנוטיפ חמור' בהשוואה לשלושה עצים נורמאליים. במספר גנים אותרו הבדלים של פי 2.5 ומעלה ברמת הביטוי בין עצים חריגים לנורמאליים: בגן PdDIF נמצא יחס RE מנורמל של 0.20, כלומר ביטוי הגן בעצים החריגים היה נמוך פי חמש לעומת העצים הנורמאליים. בגן PdSPW1 התקבל יחס RE מנורמל של 0.33, כלומר ביטוי הגן בעצים החריגים היה נמוך פי שלושה לעומת העצים הנורמאליים. בגן PdCLV התקבל יחס RE מנורמל של 2.6, כלומר ביטוי הגן בעצים החריגים גבוה פי 2.6 לעומת העצים הנורמאליים, בגן PdMADS4 התקבל יחס RE מנורמל של 0.31, כלומר ביטוי הגן בעצים החריגים נמוך פי שלושה לעומת העצים הנורמאליים. בשאר הגנים ההבדלים בין העצים החריגים לנורמאליים היו קטנים יותר, ביחס של פי שתיים או פחות בין העצים החריגים לעצים הנורמאליים. היחס נע בין RE מנורמל של 0.46 בגן PdAFO1 ל-RE של 1.7 בגן PdAGL2-4 (טבלה 12).

טבלה 12 - רמות ביטוי של גנים בעצים נורמאליים ועצים בעלי 'פנוטיפ חמור'

RE מנורמל	מס' עצים שנבדקו		שם הגן
	חריגים**	נורמאליים*	
2.6	3	3	PdCLV
1.7	3	3	PdAGL2-4
1.14	3	3	PdAG
1.02	2	2	PdSQUA1
0.75	3	3	PdDL
0.72	3	3	PdAGL2-3
0.59	3	3	PdAFO2
0.46	3	3	PdAFO1
0.33	3	3	PdSPW1
0.31	3	3	PdMADS4
0.20	3	3	PdDIF

RE מנורמל חושב על ידי חלוקת ממוצע ערך ה-RE של העצים החריגים בממוצע ערך ה-RE של העצים הנורמאליים (לפירוט חומרת הפנוטיפ של העצים ראה טבלה 3 בחומרים ושיטות). הגנים בטבלה מסודרים לפי ערכי RE מנורמלים יורדים. גנים עם ערכי RE מנורמל הגדולים מ-2.5 או הקטנים מ-0.4 מודגשים (על בסיס המקובל בסיפורות-2002, Bustin).

\* העצים הנורמאליים בניסוי זה הם M, E ו-N.  
\*\* העצים החריגים בעלי 'הפנוטיפ החמור' בניסוי זה הם J, K, ו-G.

בהמשך ערכנו ניסוי שני בו בדקנו את ביטוי הגנים PdCLV, PdDIF, PdSPW1 ו-PdMADS4 בעוד שבעה עצים חריגים נוספים בעלי 'פנוטיפ חלש', ושישה עד שבעה עצים נורמאליים נוספים (ראה טבלה 3 בחומרים ושיטות). בניסוי זה ההבדלים בין ממוצע העצים החריגים לממוצע העצים הנורמאליים היו ביחסים הבאים: בגן PdDIF התקבל יחס RE מנורמל של 1.58, בגן PdSPW1 התקבל יחס RE מנורמל של 0.79, בגן PdCLV התקבל יחס RE מנורמל של 1.55, בגן PdMADS4 התקבל יחס RE מנורמל של 1.02 (טבלה 13).

טבלה 13 - דגם ביטוי של הגנים PdCLV, PdSPW1, PdMADS4 ו-PdDIF בעצים בעלי 'פנוטיפ חלש' ובעצים נורמאליים

RE מנורמל	מס' פרטים שנבדקו*		שם הגן
	חריגים (בעלי 'פנוטיפ חלש')	נורמאליים	
1.58	7	7	PdDIF
1.55	7	7	PdCLV
1.02	7	7	PdMADS4
0.79	7	6	PdSPW1

RE מנורמל חושב על ידי חלוקת ממוצע ערך ה-RE של העצים החריגים בממוצע ערך ה-RE של העצים הנורמאליים. הגנים בטבלה מסודרים לפי ערכי RE מנורמלים יורדים.

\* בניסוי זה הפרטים הנורמאליים הם- 1,2,4,5,6,7,8 והפרטים החריגים (בעלי 'פנוטיפ חלש') הם- 9,10,11,12,13,14,16 (פירוט הפנוטיפ של העצים השונים בטבלה 3 בחומרים ושיטות).

מכיוון שבניסוי הראשון נבחנו עצים בעלי 'פנוטיפ חמור', יתכן שההבדלים בביטוי מאפיינים רק פנוטיפים קיצוניים (טבלה 12). לכן נבחנו שנית את רמות הביטוי של הגנים PdDIF,

PdMADS4, PdCLV, PdSPW1 ו-PdMADS4 בעצים אלה. בצענו שלוש חזרות נוספות (שנעשו ב-cDNA שהופק מ-RNA חדש מאותן תפרחות של עצים חריגים מאוד) של הניסוי הראשון. חלק מהתוצאות היו בלתי הדירות, ולכן התייחסנו רק לתוצאות שחזרו על עצמן בהפרשים של עד 30%. בבדיקת דגם הביטוי של הגנים PdCLV ו-PdMADS4 התוצאות הראשוניות לא היו הדירות והתקבלו התוצאות הבאות: בגן PdCLV התקבל יחס RE מנורמל של 0.79 (ממוצע שתי חזרות) ובגן PdMADS4 התקבל יחס RE מנורמל של 0.76 (ממוצע שתי חזרות). ההבדלים המשמעותיים ברמת הביטוי בין העצים החריגים בעלי 'פנוטיפ חמור' לעצים הנורמאליים חזרו בשני הגנים PdDIF ו-PdSPW1. בגן PdSPW1 התקבל יחס RE מנורמל של 0.30 (ממוצע שתי חזרות) ובגן PdDIF התקבל יחס RE מנורמל של 0.33 (ממוצע שתי חזרות) כלומר, ביטוי שני הגנים בעצים החריגים במיוחד נמוך פי שלושה לעומת העצים הנורמאליים (טבלה 14). ההבדלים בביטוי שני הגנים אלה בין ממוצע העצים בעלי 'פנוטיפ חלש' לממוצע העצים הנורמאליים לא היה מובהק ובעקבות כך שילוב התוצאות עבור כלל העצים (תוצאות כל הניסויים בפרחים מהעצים עם 'פנוטיפים חלשים' או 'חמורים') לא מצביע על הבדלים משמעותיים ברמת הביטוי: בגן PdDIF התקבל יחס RE מנורמל של 0.59 ובגן PdSPW1 התקבל יחס RE מנורמל של 0.97.

טבלה 14 - דגם הביטוי של הגנים PdDIF ו-PdSPW1 בעצים בעלי 'פנוטיפ חמור'

RE מנורמל	RE				שם העץ	פנוטיפ	שם הגן
	ממוצע RE ממוצע של העצים לפי פנוטיפ	ממוצע חזרות	חזרה 2	חזרה 1			
0.33	0.029	0.018	0.017	0.018	J	חריג	PdDIF
		0.051	0.043	0.058	K	חריג	
		0.018	0.018	0.018	G	חריג	
	0.088	0.078	0.075	0.081	M	נורמאלי	
		0.097	0.092	0.102	N	נורמאלי	
0.30	0.389	0.199	0.21	0.185	J	חריג	PdSPW1
		0.357	0.396	0.318	K	חריג	
		0.611	0.564	0.658	G	חריג	
	1.311	1.49	1.45	1.54	M	נורמאלי	
		1.12	1.14	1.1	N	נורמאלי	

הגנים בטבלה מסודרים לפי סדר האלפבית. תוצאות החזרות 1 ו-2 חושבו על ידי חלוקת הערך של ריכוז ה-cDNA היחסי עבור הגן הנבדק בריכוז ה-cDNA היחסי של האקטין עבור כל עץ. החזרות התקבלו מהפקת RNA חדשה ומהפקות cDNA נפרדות מאותם פרחים. ממוצע ערך RE של העצים לפי פנוטיפ: ממוצע RE של עצים בעלי 'פנוטיפ חמור' (J, K ו-G) וממוצע RE של עצים נורמאליים (M, N). RE מנורמל חושב על ידי חלוקת ממוצע ערך ה-RE של העצים החריגים בממוצע ערך ה-RE של העצים הנורמאליים.

## 5. דיון

ריבוי עצי תמר בתרבית ריקמה הוא תהליך ארוך הנמשך כ-10-8 שנים מייסוד התרבית ועד להתבססות העצים במטע, פריחתם וקבלת היבול הראשון. בנוסף, נדרשות מספר שנים נוספות עד לקבלת יבול מסחרי מלא. הבעיה העיקרית בריבוי בתרבית היא היווצרותם של עצים רבים בעלי מופע חריג המתגלים רק לאחר מספר שנים במטע. תופעה זאת גורמת לנזק כלכלי קשה למגדלים ולחוסר אמון בשיטות הריבוי בתרביות ריקמה. באופן מסורתי, עץ התמר מרובה וגטטיבית מחוטרים, אולם תהליך זה מוגבל מאוד בכמות השתילים, והשתילים הנוצרים אינם אחידים בגודלם. בנוסף על יתרונותיה במספר השתילים ואחידותם, שיטת תרבית הריקמה מאפשרת אינטרודוקציה של זנים חדשים, השבחה מהירה יחסית ויצירת חומר צמחי נקי ממחלות ומזיקים. לכן, לפתרון בעיית השונות הסומקלונלית חשיבות רבה להמשך הפיתוח של ענף התמר בעולם. המופע החריג של 'חנטה לקויה' בזן 'ברה' גורם לאובדן יבול ולנזק כלכלי כבד. פנוטיפ חריג זה נתגלה בקרב כ-2000 עצים בארץ ובהיקף גדול הרבה יותר בעולם (כ-100,000 עצים בערב הסעודית) (Al Wasel *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 2004).

סביר להניח שכתוצאה מחשיפת הרקמה לתנאי "עקה" בתרבית, יכולים להתרחש ב-DNA שינויים שעלולים לגרום לשונות סומקלונלית. שינויים אלה יכולים להיות גנטיים, כגון מוטציות נקודתיות, אברציות כרומוזומאליות, או שינויים בפלואידיות. שינויים אלה יכולים גם להיות אפיגנטיים כמו שינויים במידת האצטילציה של חלבוני היסטון, ושינויים בדגם המתילציה (Kaeppler *et al.*, 2000). היפוטזת המחקר בעבודה זו היא שהשונות במבנה הפרח והחנטים נובעת משינוי גנטי או אפיגנטי באחד מהגנים מבקרי התפתחות הפרח. לחילופין, יתכן שהשינוי הסיבתי לא התרחש בגנים המועמדים עצמם, אלא בגנים המבקרים את פעילותם. כתוצאה מכך משתנה דפוס הביטוי של גנים אלה ובעקבותיו מתרחשת בפרח החריג החלפה הומיאוטית של אבקנים מנוונים לאיברים דמויי שחלה.

### 5.1. השיטה

בעבודה זאת התמקדנו בבידוד גנים מועמדים מתמר המבקרים את התפתחות אברי הפרח. מרבית גנים אלה שמורים במידה רבה בין מינים שונים. האזורים השמורים של גנים אלה שימשו ככלי לבידוד הגנים האורתולוגיים מתמר. גישת הגנים המועמדים (Candidate genes) היא שיטה מתאימה לניתוח תהליכים פיסולוגיים שמורים כמו תהליך התפתחות הפרח. גישה זאת מתבססת על קיומם של גנים שפגיעה בהם גורמת לפנוטיפים דומים במינים אחרים. חסרונה של גישה זו היא בהתמקדות בגנים ספציפים ובהנחה שהם האחראים לפנוטיפ, בעוד שיתכן שגנים המבקרים תהליכים שונים במעלה הזרם (upstream) או גנים ממסלולים שונים הם הגנים ששינוי בהם מעורב ביצירת הפנוטיפ.

שלבי העבודה היו: א. בידוד גנים מועמדים מתמר ב. אנליזה השוואתית של גנים אלה בין עצים נורמאליים לעצים חריגים. האנליזה השוואתית של הגנים המועמדים נעשתה בשלושה היבטים: (1) בדפוס המתילציה (2) ברצף הבסיסים (3) בדגם הביטוי. השונות בדגם המתילציה בין עצים חריגים ועצים נורמאליים נבדקה בעזרת שילוב של חיתוך ה-DNA בשני האיזוסכיזומרים *HpaII* ו-*MspI* והגברה של מקטע DNA החובק אתרים אלה ב-PCR. השונות ברמת הרצף נבדקה על ידי השוואת רצפי מקטעי הגנים בין עצים חריגים ועצים נורמאליים בחיפוש אחר SNPs (במצב הומוזיגוטי או במצב הטרוזיגוטי) המצויים באסוציאציה לפנוטיפ. הבדלים בדגם ביטוי הגנים בין עצים חריגים ועצים נורמאליים נבדקו באמצעות Quantitative RT-PCR.

## 5.2. אימות התוצאות

בכל אחת מההשוואות בוצעה האנליזה בשלב ראשון על מספר קטן של פרטים. במידה ונמצא הבדל בין העצים החריגים והעצים הנורמאליים הוגדל המדגם כדי לאמת אסוציאציה של הבדל זה לפנוטיפ. מכיוון שאין בתמר מערכת של טרנספורמציה, מספר העצים הנבדקים הוא כלי עיקרי לאימות התוצאות. ככל שהמדגם גדול יותר הביטחון בקיום האסוציאציה הנ"ל הוא רב יותר. יחד עם זאת הגדלת המדגם עלולה לגרום להכנסת "רעש" למערכת כתוצאה מהשונות הפנוטיפית הגדולה הקיימת בין העצים החריגים. ידוע שבעצים החריגים קיימת שונות רבה בחומרת הפנוטיפ קרי, במספר הפירות המשולשים, במספר פירות מרובי השחלות ובאחוזי החנטה של הפירות הנורמאליים. במרבית העצים מתרחש שיפור בסימפטומים החריגים עם הזמן (Cohen *et al.*, 2004). יתר על כן, חשוב לציין שקיימת שונות גנטית (ובמידה מסוימת גם פנוטיפית) גם בין עצי תמר שרובו באמצעות חוטרים (Corniquel and Mercier, 1994; Devanand and Chao, 2003; Gurevich *et al.*, 2004). על הבדלים אלה ניתן להתגבר ע"י הגדלת מספר הפרטים הנורמאליים. זיהוי הגנים בתמר התמקד במקטע מסויים בלבד מכל גן (באיזור השמור שלו), ולא בגן כולו. לכן איפיון הגנים ברמת הרצף ובדגם המתילציה היה מוגבל. התמקדות באזורים מצומצמים בלבד לא איפשרה בחינת הרצף המקדד המלא של הגן, בחינת האזורים הלא מתורגמים של ה-RNA (UTRs), רצפי הפרומוטור, ורצפי אינטרונים. רצפים אלה יכולים לעבור שינויים בדגם המתילציה וברצף הבסיסים ולגרום לשינויים משמעותיים בדפוס הביטוי של הגנים. יחד עם זאת התמקדות באזורים מסוימים בכל גן לא הגבילה את איפיון דפוס הביטוי מכיוון שהמקטע המייצג שבודד מספיק לאנליזה זו. בחרנו לבדוק את הגנים בעצים חריגים מתרבית ריקמה לעומת עצים נורמאליים שרובו מחוטרים (למעט באנליזת ה-SNPs בה נבדקו גם עצים נורמאליים שנוצרו מתרבית ריקמה).



במחשבה נוספת יתכן שראוי היה להשוות גם בין עצים חריגים לעצים נורמאליים שנוצרו מתרבית בכל האנליזות כדי לאתר שינויים שנוצרו באופן ספציפי כתוצאה מתנאי התרבית.

### 5.3. בידוד ואיפיון גנים אורתולוגים המבקרים את התפתחות אברי הפרח

#### בתמר

מבנה הפרח והפרי בעצי 'ברה' חריגים הוביל להשערה ששינויים בפעילות גנים מסוג MADS box, הקשורים לקביעת זהות מבנה השחלות והאבקנים, עשויים לבקר את היווצרות הפנוטיפ החריג. למוטנטים שונים הפגועים בגנים מסוג B פנוטיפ דומה של החלפת אבקנים בשחלות, עיוותים מבניים בשחלות (Nagasawa *et al.*, 2003; Zik and Irish, 2003; Whipple *et al.*, 2004). בנוסף נבחרו גנים נוספים שאינם מסוג MADS box אשר מוטציות בהם גורמים לפנוטיפים דומים (Clark *et al.*, 1999; Sawa *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 1992; Bowman *et al.*, 1993; *al.*, 1993). וגנים נוספים המבקרים את מודל ה-ABC (Ingram *et al.*, 1992; Mandel *et al.*, 1992; *al.*, 1995). בעבודה זו התמקדנו בשבעה גנים מסוג MADS box, שמונה גנים נוספים הידועים כמבקרי התפתחות הפרח במינים שונים ובגן האורתולוגי ל-EGAD מדקל השמן שנבחר בעקבות עבודתם של Tregear וחבריו (2002), בה נמצאה אסוציאציה בין דפוס ביטוי גן זה לפנוטיפ 'Mantled' מדקל השמן, הדומה לפנוטיפ החריג בתמר. מתוך 16 הגנים שנבחרו זהו ובודדו 11 מקטעים של גנים מתמר. חמישה מקטעים (PdAG, PdDIF, PdAGL2-3, PdAGL2-4 ו-PdSQUA1) בודדו על פי רצפי הגנים שבודדו מדקל השמן עם תחלים המתאימים לחלוטין לרצף הגן (ביטוי לרמת השימור הגבוהה ברצף בין דקל התמר ודקל השמן השייכים שניהם למשפחת הדיקליים). שישה מקטעים מגנים נוספים (PdSPW1, PdMADS4, PdCLV, PdAFO1, PdAFO2 ו-PdDL) אותרו על בסיס איזורים שמורים בעלי הומולוגיה גבוהה במגוון מיני צמחים, בעיקר מינים חד-פסיגיים. גנים אלה בודדו על בסיס תחלים דגנרטיביים ובידודם דרש ניסויים רבים יותר. המידע על אזורים שמורים בגנים האחרים בצמחים חד-פסיגיים, היה מועט והנסיבות לזהותם בתמר לא צלחו.

הערכת המרחק הגנטי בין מיני צמחים שונים על בסיס גנים אלה נעשתה באמצעות עצים פילוגנטיים לשישה מהגנים המכילים אזור MADS box domain. גנים אלה נבחרו מכיוון שקיים לגביהם מידע רב במגוון רחב של קבוצות צמחים. העצים הפילוגנטיים כוללים מינים חד-פסיגיים. מינים אלה בעלי הומולוגיה גבוהה לרצף מתמר ואינם מייצגים את כלל קבוצות החד-פסיגיים. בנוסף נבדקו גם גנים אורתולוגיים ממספר צמחי מודל דו-פסיגיים. העצים נבנו לפי האזורים המקדדים השמורים של הגן באורכים של בין 240 bp ל-600 bp. עבור הגנים האחרים לא היה קיים מידע במגוון מספיק של קבוצות צמחים חד-פסיגיים ולכן לא נבנו להם עצים פילוגנטיים.

מיקום הרצפים מתמר בכל העצים הפילוגנטיים המכילים MADS box domain מראה התאמה כללית בין העצים השונים והתאמה למודלים פילוגנטיים שנבנו לפי גנים גרעיניים וגנים אורגנליים (Savolainen and Chase, 2003). לפי מיון זה, הדקלאים (Arecales) מקובצים יחד עם סדרת הזנגבילאים (Zingiberales) עם סדרת הקומלינאים (Commelinid) ועם סדרת הדגנאים (Poales) ליצירת קבוצת אחות (sister clade) לסדרת האספרגאים (Asparagales) (Savolainen and Chase, 2003). לסדרת הזנגבילאים היה נציג אחד בגנים PdMADS, PdSPW, ו-PdAG אשר בכל עץ היה במיקום שונה עם ערכי Bootstrap נמוכים. בכל העצים הפילוגנטיים דקל השמן נמצא הקרוב ביותר לתמר, והם יצרו קבוצה פילוגנטית עצמאית עם ערכי Bootstraps גבוהים. בכל הניתוחים קבוצת הצמחים הדו-פסיגיים היתה כצפוי המרוחקת ביותר מהתמר. הדגנאים יצרו קבוצה נפרדת בכל העצים עם ערכי Bootstrap גבוהים. הצמחים מסדרת השושנאים ואספרגאים לא יצרו קבוצות ברורות ובכל עץ היו במיקום שונה עם ערכי Bootstrap נמוכים. מכל סדרה נבחרו מספר מועט של נציגים שאינם מייצגים בהכרח את הטקסון. העצים הפילוגנטיים נבנו על בסיס רצפים קצרים המבוססים על איזורים שמורים מאד. לכן, השונות הכללית בין הרצפים נמוכה יחסית וכל שינוי קטן ברצף הבסיסים משנה את מקומות הפיצול באופן משמעותי. ריצוף מלא של כל הרצף המקדד יאפשר השוואה פילוגנטית נכונה יותר, סביר להניח שהשונות ברצף תהיה גדולה יותר ולכן ה"פיצולים" בעצים הפילוגנטיים יהיו מובהקים יותר. בנוסף, ניתוח פילוגנטי נכון דורש יצוג מלא של הסדרות השונות כדי לקבל תמונה מייצגת של הקשרים הגנטיים בין התמר ומינים חד-פסיגיים נוספים. בעתיד ניתן לנסות ולבודד גנים נוספים שיאפשרו הרחבת בסיס הניתוח הפילוגנטי.

#### 5.4. שונות בדגם המתילציה

לדגם המתילציה השפעה על התפתחות הפרח ועל פוריותו. שינויים ברמת המתילציה נמצאו כגורמים לעיוותים בפרחים, לתוספת אברים בפרח (אבקנים או שחלות), ולעקרות (Richards, 1997; Kaeppler, 2000). יתכן ששינויים במתילציה ה-DNA במהלך הריבוי בתרבית מהווים מנגנון חשוב ליצירת השונות הסומקלונלית. עבודות קודמות מצאו פולימורפיזם ברמת המתילציה של ה-DNA בצמחים שיוצרו בתרבית ריקמה לעומת צמחים שרובו בשיטות קונבנציונאליות (Peraza-Echeverria, 2001; Jaligot *et al.*, 2000). הבדלים כאלה נמצאו גם בין עצי דקל השמן עם פנוטיפ 'Mantled' (Jaligot *et al.*, 2000), הדמיון בין פנוטיפ ה'חנטה הלקויה' ו'ריבוי השחלות' (Matthes *et al.*, 2001, 2002, 2004). הדמיון בין פנוטיפ ה'חנטה הלקויה' ו'ריבוי השחלות' בתמר לפנוטיפ 'Mantled' בעצי דקל השמן, והשיפור בסימפטומים בשני הפנוטיפים עם הזמן במרבית העצים, מצביעים על האפשרות שמופע העצים החריגים בתמר, קשור גם כן לשונות אפיגנטית בדגם המתילציה באתרים (Loci) מסויימים. בעבודה שנעשתה במעבדתינו

בשיטה של Methylation Sensitive AFLP (Gurevich, Lavi and Cohen, submitted), נמצאו הבדלים בדפוס המתילציה בעצי 'ברהי' חריגים בעלי 'חנטה לקויה' ו'ריבוי שחלות'. שיטות כגון Methylation Sensitive AFLP (Matthes *et al.*, 2001) ו-HPLC (Gehrke *et al.*, 1984) בודקות את כלל הגנום ולא מתאימות לבדיקת המתילציה הספציפית בגנים ייחודיים. יתרה מזאת, בעבודות בארבידופסיס נמצא שעל אף ירידה כללית במתילציה הגנום יכולה להתרחש עלייה ברמת המתילציה (וכתוצאה מכך השתקה) של גנים ספציפיים, כמו הגן Superman (Jacobsen, 1997, 2000).

בעבודה זו ניסינו לבחון בחינה ראשונית הבדלים בדפוסי המתילציה בגנים המועמדים שבודדתי. בחרנו להשתמש באיזוסכיזומרים *HpaII* ו-*MspI* לסריקה ראשונית של דגם המתילציה במספר אתרי חיתוך בשני מקטעים מהגנים PdSPW1 ו-PdMADS4. גישה זו יושמה בניסוי ראשוני בעץ נורמאלי שרובה מחוטר ובעץ חריג שרובה בתרבית רקמה. גישה זו מאפשרת בחינה מצומצמת של דפוס המתילציה מכיוון שהיא בוחנת רק אתרי CCGG המהווים חלק מכלל אתרי ה-CG, ואינה בודקת את כל האתרים שאינם CG כגון CNG או CNN (N מייצג A, T או G). בצמחים קיימת רמה גבוהה של מתילציה ציטוזין גם באתרים אלה (Tariq and Paszkowski, 2004). יתר על כן, Jaligot וחבריו (2004) מצאו שאתרי CCGG מושפעים מעט מאוד מהירידה הכללית במתילציה ה-DNA שנמצאה באסוציאציה עם פנוטיפ ה-'Mantled'.

דפוס המתילציה נבחן בעלים. מובן מאליו שיתכן וההבדלים בדגם המתילציה בגנים אותם בדקנו מתרחשים ברקמות אחרות כגון בתפרחת בה מתבטא הפנוטיפ החריג. יחד עם זאת ראוי לציין שדגם המתילציה נשמר ברקמה מסוימת במהלך הריבוי מדור לדור. סביר להניח שדגם המתילציה ייחודי לרקמה ולשלב ההתפתחותי. המנגנון האחראי לכך אינו ברור די צורכו (Richards, 1997). ככל הנראה המידע להתאמת דגם המתילציה לרקמה ולשלב התפתחותי תלוי בגורמים סביבתיים, גנטיים ובביטוי של גנים מסוימים (Jaligot *et al.*, 2004). האנזימים *HpaII* ו-*MspI* מזהים אתר בין ארבעה בסיסים ולכן צפויים להתקבל פרגמנטים באורכים של מאות בסיסים בודדות. בגנים הנבדקים: PdSPW1 ו-PdMADS4, חלק מה-DNA לא נחתך על ידי *HpaII* ונשאר כפרגמנטים גדולים מאוד. יתכן שהחיתוך נמנע בגלל אזורים ממותלים או עקב פעילות אנזים לא מלאה. באנליזה הראשונית נמצא שבעצים הנורמאליים כל ה-DNA נחתך ע"י שני האנזימים. בעוד שבפרגמנט אחד מהגן PdSPW1, ב-DNA החתוך על ידי *MspI* מהעצים החריגים נמצא כ-12% תוצר יחסית ל-DNA הלא חתוך. בפרגמנט אחד מהגן PdMADS4, ב-DNA החתוך על ידי *MspI* מהעצים החריגים התקבל כ-5.2% תוצר יחסית ל-DNA הלא חתוך. בשני הגנים בעצים החריגים כל ה-DNA נחתך ע"י *HpaII*. תוצאות אלו מרמזות שיתכן וקיים מצב של המי-מתילציה (Hemi-Methylation - מתילציה רק באחד הגדילים) בציטוזין החיצוני בחלק מאתרי החיתוך בשני גנים אלה בעצים החריגים. בדקל שמן נמצא ש-4.1% מאתרי *MspI/HpaII* הם המי-

ממותלים (Jaligot *et al.*, 2004), בשלב זה איננו יכולים להבחין בין המי-מתילציה בגנים PdMADS4 ו-PdSPW1 לבין חיתוך לא מלא ב-*MspI* (היכול לנבוע מהבדלים ברמת נקיון ה-DNA). חשוב להדגיש שאנליזה זאת ראשונית מאוד ונעשתה על שני פרטים בלבד וללא חזרות על הניסוי.

דפוס המתילציה נבדק ברצף קצר ולא בגן המלא, באזורים הלא מתורגמים של ה-RNA (UTRs), הפרומוטור והאינטרונים. מתילציה של פרומוטור או אזור מקדד של גן יכולה לפגוע בשעתוק (Jost and Saluz, 1993). כדי להעריך האם מתילציה של אזורים מסוימים בגנים הנ"ל אחראים ליצירת הפנוטיפ החריג, נדרשת המשך בחינתם של אזורים אלו בעצים חריגים ועצים נורמאליים. מכיוון שהפנוטיפ החריג מופיע בתפוחת ראוי בהמשך לבדוק הבדלים בדגם המתילציה בפרח. כמו כן יש להגדיל את מדגם העצים הנבדקים בכדי לאמת קיומה של אסוציאציה בין דגם המתילציה לפנוטיפ. יחד עם זאת יש לזכור שהשונות הפנוטיפית הגדולה בין העצים החריגים והשונות הפיסיולוגית (תפוחות בגיל שונה) מקשים על הגדלת המדגם ויש להקפיד על בחירת עצים בעלי מופע פנוטיפי אחיד ככל האפשר תוך התמקדות במופע מסויים. בנוסף ראוי לבחון מתילציה במכלול הציטוזינים (ולא רק באתרי CCGG) ברצף הגנים המועמדים ובכך להרחיב את מגוון האתרים בהם דגם המתילציה עלול להשתנות בין הפנוטיפים השונים. בנוסף השיטה של חיתוך באמצעות איזוסכיזומרים אינה כמותית ולא בודקת מתילציה באופן ישיר אלא את רמת תוצר ה-PCR המתקבל לאחר חיתוך באנזים. בעתיד ניתן לבחון את דפוס המתילציה בשיטה של bisulfite sequencing. בשיטה זו כל ציטוזין לא ממותל עובר מודיפיקציה לאורציל. בראקציית PCR, יבנה גדיל משלים בו האורציל יתנהג כתימין ומולו יקשר אדנין. לעומת זאת, מול הציטוזין הממותל (שלא יהפוך לאורציל) יקשר גואנין. השוואת רצף DNA שטופל ב-bisulfite לרצף שלא טופל מאפשרת זיהוי של כל הציטוזינים הממותלים במקטע הגנומי הנבדק (Warnecke *et al.*, 2002).

## 5.5. שונות ברמת הרצף

שינויים ברצף יכולים להתרחש בעקבות חשיפת הרקמה לתנאי "עקה" בתרבית כתוצאה מ"קפיצת" טרנספוזונים, טעות של מנגנוני התיקון או הסינתזה וגורמים נוספים (Kaeppler *et al.*, 2000). SNP הוא אחד מהשינויים הנפוצים ביותר ברצף ה-DNA הנמצא בתדירות גבוהה בצמחים ויכול להיות באסוציאציה לפנוטיפ. בעבודה זו חיפשנו שינויים ברצף הנמצאים באסוציאציה לפנוטיפ החריג. ביצעתי תחילה בדיקת היתכנות במספר מצומצם של גנים על תערובות DNA (DNA pools) של מספר פרטים. שיטה זו מאפשרת לבחון מספר פרטים בתוך זמן קצר ותוך חסכון בעלויות. בשיטת תערובות ה-DNA ניתן להשתמש לאיבחון אסוציאציה בין סמנים לבין גנים המבקרים תכונה מסוימת ולזיהוי מוטציות. החיסרון בשיטה זו היא רמת הרגישות הנמוכה לאיתור שינויים ברצף. בשיטת התערובות ניתן לאתר

אללים שמצויים בשיעור של 20% ומעלה בתערובת (Sham *et al.*, 2002). מכיוון שחיפשתי הבדל משמעותי בתדירות האללים בין העצים הנורמאליים לעצים החריגים, שיטה זאת התאימה לצרכי. ראוי לציין כי בתערובות יש קושי באבחנה בין מצב בו חלק מהפרטים הומוזיגוטים לאלל אחד וחלק מהפרטים הומוזיגוטים לאלל השני לעומת מצב בו כל הפרטים הינם הטרוזיגוטים. מצב הטרוזיגוטי יכול לנבוע גם מדופליקציה של גן או ממשפחת גנים בעלי רצף דומה. בשיטה זאת לא איתרתי שינויים ברצף בין הפנוטיפ הנורמאלי לחריג, לכן בשלב הבא נעשה ריצוף של הגנים בפרט חריג אחד ופרט נורמאלי אחד. בגנים בהם לא אותר רצף גנומי, נבדק רצף ה-cDNA. אנליזה של פרטים בודדים היא הדרך הישירה לזיהוי שינויים ברצף, אך שיטה זאת יקרה וארוכה יותר. ראוי לציין שתדירות טעויות בריצוף הוערכה לשיעור של בסיס אחד לכל מאה בסיסים וזאת גם תדירות ה-SNPs בצמחים רבים (Edwards *et al.*, 2001). לכן, כל הבדל ברצף אומת בחזרות ובפרטים נוספים. בבדיקת פרט אחד נורמאלי ופרט אחד חריג אותר SNP אחד במצב הומוזיגוטי באינטרון בגן PdMADS4. מקטע הגן PdMADS4 נבדק בעוד שני עצים נורמאליים ושני עצים חריגים אך ה-SNP לא חזר בהם. יתכן שה-SNP נבע מפולימורפיזם בין העץ הנורמאלי לעץ החריג ללא אסוציאציה לפנוטיפ או כתוצאה מטעות בריצוף. כמו כן בהשוואה בין פרט חריג לפרט נורמאלי בגנים PdSQUA1, PdDL, PdAGL2-3 ו-PdMADS4 נמצאו מספר SNPs ברצף המקודד. בגנים PdAGL2-3 ו-PdMADS4 נמצא SNP במצב הטרוזיגוטי בעץ החריג לעומת מצב הומוזיגוטי בעץ הנורמאלי שלא גרם להחלפת חומצה אמינית. בגנים PdSQUA1 ו-PdDL נמצא SNP שגרם להחלפת חומצה אמינית. בגן PdDL נמצא SNP במצב הטרוזיגוטי בעץ הנורמאלי לעומת מצב הומוזיגוטי בעץ החריג, שגרם להחלפת חומצה אמינית בעץ הנורמאלי. בגן PdSQUA1 בעץ חריג אחד נמצא SNP במצב הטרוזיגוטי לעומת מצב הומוזיגוטי בעץ הנורמאלי אחד שגרם להחלפת חומצה אמינית סרין בחומצה אמינית פרולין בעץ החריג. סרין הינה חומצת אמינו הידרופילית בעוד פרולין הינה חומצת אמינו הידרופובית. החלפת חומצה אמינית באזור שמור, ובמיוחד החלפת חומצת אמינו מקבוצה אחת לחומצת אמינו מקבוצה אחרת יכולה להיות בעלת השפעה רבה על מבנה החלבון ובעקבות כך על הפנוטיפ. הבדל זה לא חזר בבדיקת זוג עצים נוסף ואולם יתכן שיש מקום לבדוק פרטים נוספים ולבחון את השפעת השינוי ברמת ביטוי החלבון כדי לבדוק האם שינויים אלו נמצאים באסוציאציה לפנוטיפ. יתכן גם שהבדלים אלה נבעו, מפולימורפיזם בין העצים ללא אסוציאציה לפנוטיפ או כתוצאה מטעויות בריצוף. לסיכום במקטעי הגנים אותם בדקתי במספר פרטים קטן לא אותרו שינויים ברצף המצויים באסוציאציה עם הפנוטיפ החריג. יש להדגיש כי חיפוש האתרים השונים ברצף נעשה בפרגמנטים קצרים בלבד, ולא לכל אורך הגן ואזורי הבקרה שלו. כדי לבחון נושא זה ביסודיות דרוש ריצוף מלא של הגן, כולל האזורים הלא מתורגמים של ה-RNA (UTRs), וכן ריצוף איזור הפרומוטור והאינטרונים ובדיקתם בעצים חריגים ועצים נורמאליים.

## 5.6. שונות בדגם ביטוי הגנים

אפיון דגם ביטוי הגנים בפרחים של תמר נעשה באמצעות Quantitative RT-PCR. שיטה זאת מאפשרת לעקוב ולהעריך את כמות תוצר ה-PCR בכל מחזור ובכך לקבוע את הכמות ההתחלתית היחסית של ה-Template הספציפי בריקמה. שיטה זו נחשבת למדוייקת ודורשת ריכוז נמוך יחסית של RNA. חסרונותיה (כמו בכל השיטות המבוססות על PCR) הם האפשרות של הגברה לא שווה של מולקולות DNA שונות או של קטעי DNA שמקורם בזיהומים שונים, ואי דיוקים הנובעים מהנפחים הזעירים הנלקחים לריאקציה. על כן, חשוב לבצע חזרות וביקורות מתאימות ולהתייחס לתוצאות המתקבלות בזיהרות המתאימה. כדי לבדוק את הדירות התוצאות בעבודה זאת, ערכנו חזרות על אותו ניסוי בימים שונים. נמצא שקיימת שונות בערכי הסף (Ct) של אותם עצים ואותו cDNA באנליזות השונות. שונות זאת יכולה לנבוע מטעויות פיפטציה, הבדלים בריאגנטים ו/או הבדלים ביעילות ה-PCR. למרות הזיהרות שנקטנו, חלק מהתוצאות נמצאו לא הדירות. אנו התייחסתי רק לתוצאות שחזרו על עצמן בהפרשים של עד 30%. הבדלים מעין אלה נמצאו גם בעבודותיהם של Marino וחובריו (2003) ו-Bustin (2002). יתכן שניתן להתגבר על חלק מהשונות בתוצאות על ידי שימוש בקיטים להכנת ה-cDNA, שימוש באותם אצוות של ראגנטים ו-master mixes להאחדת תערובות הריאקציה ולהגדלת הנפחים. בדיקות של עקומת כיוול בכל הרצת RT-PCR תאפשר בקרה על שינויים אלה, בהנחה שהעקומה תושפע באותה מידה על דוגמאות הכיול כמו על הדגימות הלא ידועות.

דגם ביטוי הגנים נבדק בפרחים מתפרחות בוגרות המוכנות להאבקה. יש להדגיש כי כל שלבי התמיינות הפרח והתפתחותו בתמר מתרחשים בתוך הגזע. התפרחת נגישה רק כשהפרחים הגיעו לשלבי ההתפתחות הסופיים. לכן ניתן היה לבחון את ביטוי הגנים השונים רק לאחר שהתפרחת יוצאת מהגזע. דפוס ביטוי הגנים במהלך התפתחות הפרח ספציפי לרקמה ולזמן, לכן יתכן שקיימים הבדלים בדגם הביטוי בגנים אותם בדקנו בשלבי התפתחות מוקדמים יותר. כל הגנים שזוהו בעבודה זאת מתבטאים בפרח בחלון הזמנים הספציפי אותו בדקנו. תפרחת התמר מכילה עשרות סנסנים ובכל סנסן עשרות פרחים. הפרחים על גבי הסנסן נמצאים בשלבי הבשלה שונים (ה-RNA בו השתמשנו בניסוי זה הופק מפרחים מכל התפרחת ובעקבות כך נדגמו פרחים בשלבי הבשלה שונים). יתכן שקיימת שונות בין הפרחים השונים וזאת עלולה היתה למסך את התוצאות. ביטוי הגנים נבחן בפרח השלם ללא הפרדה לאיברים. הביטוי השונה באיברי הפרח השונים עלול גם הוא למסך את תוצאות הניסוי. בהמשך המחקר ניתן יהיה לבחון את מיקום ביטוי הגנים בחלקי הפרח השונים על ידי *in situ hybridization*.

הפנוטיפים החריגים של עצים מתרבית ריקמה מהזן 'ברה' הם: 'חנטה לקויה ו'ריבוי שחלות'. ה'פנוטיפ החמור' כולל 'חנטה לקויה' ואחוז גבוה של 'ריבוי שחלות'. במרבית העצים תופעת 'ריבוי השחלות' נעלמת באופן הדרגתי לפני תופעת חוסר החנטה. ה'פנוטיפ החלש' כולל 'חנטה לקויה' ואחוז נמוך של 'ריבוי שחלות' (ואף מצבים בהם לא מזוהים חנטים מרובי השחלות). הניסוי הראשון התמקד בעצים בעלי 'פנוטיפ חמור'. הנחת העבודה היתה ששינוי משמעותי בביטוי גן מסויים, המצוי באסוציאציה לפנוטיפ, יופיע באופן ברור גם במספר מצומצם של פרטים. בשלב הבא על מנת לאמת את קיומה של אסוציאציה בין רמת הביטוי הגנים לפנוטיפ הורחב המדגם. בניסוי השני נבחרו עצים בעלי 'פנוטיפ חלש'.

בשלב הראשון נבחנו שניים עד שלושה עצים נורמאליים מחוטרים ושלושת העצים החריגים בעלי 'הפנוטיפ החמור'. נמצאו הבדלים הדירים בביטוי בגנים PdSPW1 ו-PdDIF בין ממוצע העצים החריגים לממוצע העצים הנורמאליים. בניסוי השני נבדקו שבעה עצים חריגים נוספים בעלי 'פנוטיפ חלש' ושישה עד שבעה עצים נורמאליים נוספים. בניסוי זה לא נמצאו הבדלים ברמות הביטוי של שני גנים אלה בין העצים הנורמאליים לחריגים. ניתן להסביר תוצאות אלה בכך שהעצים ששימשו לניסוי השני היו בעלי פנוטיפ פחות חמור של 'ריבוי שחלות' (רק 0-5% מהחנטים הינים מרובי שחלות), לכן יתכן שבמיקרה זה לא יהיו הבדלים משמעותיים בביטוי גנים הומיאוטים בין העצים הנורמאליים והחריגים. שילוב תוצאות שני הניסויים לא מצביע על הבדלים משמעותיים ברמת ביטוי אף אחד מהגנים. יתכן והמגוון בדרגות החומרה של הפנוטיפ גרם למיסוך ההבדלים.

ביטוי הגנים PdDIF ו-PdSPW1 בשלושת העצים בעלי 'הפנוטיפ החמור' היה נמוך פי שלושה מאשר בעצים הנורמאליים. הגן PdDIF: ניתן להסביר דפוס ביטוי זה של ב"פגיעה" ישירה בגן (מתילציה או שינוי ברצף) או בהשפעת גנים רגולטורים אחרים המשפיעים על ביטוי גן זה. הגן PdDIF הומולוגי לגנים מסוג דיפנסין שתפקידם הוא בהגנה על הצמח בתנאי עקה שונים. תנאי תרבית ריקמה גורמים לשינוי בביטוי גנים בדומה לתגובה לעקות ביוטיות או אביוטיות. ראוי לציין שהגן EGAD (הומולוגי ל-PdDIF) מדקל השמן מתבטא בעיקר בתפוחת והוא בעל דמיון לגן PTT מפטוניה המתבטא בעמוד העלי בפרח. מכאן ניתן לשער שהגן PdDIF, מעורב בהגנה על אברי הרבייה של הפרח מפתוגנים. בעבודתם של Tregear וחובריו (2002) לא נמצאו הבדלים ברמת הביטוי של הגן EGAD1 בשלב התפוחות בין עץ נורמאלי לעץ חריג בדקל השמן. אולם נצפה ביטוי חזק של גן זה בשלבים מוקדמים של ההתפתחות הקאלוס מעץ 'Mantled' לעומת ביטוי חלש של הגן בקאלוס מעץ נורמאלי. בשלבים המאוחרים של התפתחות קאלוס מצמח 'Mantled' רמת הביטוי של הגן הייתה נמוכה מאוד. יתכן שלא נמצאו הבדלים ברמת הביטוי בגן EGAD1 בתפוחות מדקל השמן, מכיוון שהתפוחות היו בשלב התפתחותי שונה מאשר התפוחות מתמר. לאור העובדה שבעצי תמר חריגים ובעצי דקל שמן 'Mantled' התגלתה שונות רבה בחומרת הפנוטיפ בין עצים שונים ובחלקם שיפור בחומרת הפנוטיפ עם הזמן, יתכן שנבדקו עצי דקל

שמן בעלי 'פנוטיפ חלש' או שנבדקו עצים עם מגוון של דרגות חומרת פנוטיפ שגרמו למיטוך ההבדלים, בדומה לממצא שלי המתאר לעיל. מציאת הבדלים בביטוי הגן PdDif בשלב הקאלוס (בדומה לדקל השמן), עשויה לשמש ככלי לזיהוי של פנוטיפ 'חנטה לקויה' וריבוי השחלות' בתמר בשלב מוקדם.

הגן PdSPW1: הומולוגי לגנים מסוג B המבקרים את התפתחות הפרח. Adam וחבריו (2007) מצאו בעצי דקל השמן 'Mantled' ירידה ברמת הביטוי של גנים מסוג B, C, ו-E בשלבי התפתחות שונים של התפרחת החריגה. הירידה הגדולה ביותר בביטוי התקבלה בגן EgDEF1 (הומולוגי ל-PdSPW1) בתפרחת החריגה. בעבודתי ביטוי הגן PdSPW1 היה נמוך יותר בעצים בעלי 'הפנוטיפ החמור'. הרחבת המדגם בעצים נוספים בעלי 'פנוטיפ חלש' לא אימתה את קיומו של הבדל זה וכאמור לעיל יתכן שההבדל קיים רק בין ה'פנוטיפים החמורים' לנורמאליים. לחילופין יתכן שהתוצאות הראשוניות מקורן בטעויות המובנות בשיטה. כדי לחפש הבדלים בגנים היוצרים טרנספורמציה הומאוטית חשוב להתמקד בעצים בעלי 'ריבוי שחלות'. יש לציין שלא מצאתי ירידה מובהקת בביטוי הגן השני מסוג B - PdMADS4. יתכן גם כאן ששינויים בביטוי הגן מתרחשים בשלבי התפתחות קודמים לאלה שנבדקו. בעבודתנו לא ניצפו הבדלים בביטוי הגנים מסוג C ו-E בתמר. יתכן שהסיבה לכך היא השלב ההתפתחותי המאוחר יותר (יחסית לתפרחות דקל השמן) בו נבדקו התפרחות מתמר. יש להדגיש שלא מצאנו מתאם בין אחוז ריבוי השחלות לביטוי הגן בתמר. בכל הגנים האחרים שנבדקו לא נמצאו הבדלים מובהקים ברמת הביטוי בין תפרחות של עצים נורמאליים לעומת עצים חריגים.

להבדלים בביטוי יכולים להיות מספר גורמים, ביניהם: הבדלים ברצף, הבדלים בדגם המתילציה או הבדלים הנובעים משלב התפתחותי או מתנאי סביבה שונים בתרבות רקמה. התוצאות בעבודה זו מצביעות על האפשרות שההבדלים בביטוי גנים אלה מאפיינים את ה'פנוטיפ החמור'. יתכן שהירידה בביטוי גנים מסוג B המבקרים את התפתחות איברי הפרח היא האחראית להיווצרות הפנוטיפים החריגים. ב'פנוטיפ החמור', ביטוי לא תקין של אחדים מהגנים המועמדים שנבחנו יכול להביא לטרנספורמציה הומאוטית שתתבטא ב'ריבוי שחלות'. ב'פנוטיפ החלש', יתכן שביטוי חריג של אותם גנים מועמדים יגרום לעיוותים מבניים בצלקות ובשחלה. קיימת גם האפשרות שמנגנון יצירת פנוטיפ 'החנטה הלקויה' נגרם מפגיעה בגן אחד בעוד פנוטיפ 'ריבוי השחלות' נגרם בעקבות פגיעה בגן שני. אך לאור התופעה של שיפור באחוזי ריבוי השחלות ב'פנוטיפ החמור' עם הזמן במרבית העצים ובמקביל שיפור הדרגתי באחוזי החנטה, ניתן לשער ששני הפנוטיפים קשורים ואולי נגרמים מפגיעה בדרגות חומרה שונות באותו גן (יתכן גן רגולטורי).

יתכן שב'פנוטיפ החלש' בשלב ההתפתחותי של התפרחת בו נעשתה הבדיקה, ההבדלים ברמת הביטוי אינם משמעותיים (אם כי בגנים המבקרים תהליכים התפתחותיים גם הבדלים קטנים עשויים להיות משמעותיים) ולכן לא זהו. יתכן והיו מתגלים הבדלים משמעותיים יותר



ברמת הביטוי בין העצים הנורמאליים לחריגים בשלבי התפתחות מוקדמים יותר. בעתיד יתכן שראוי להשוות את דגם ביטוי הגנים בשלבים שונים של התפתחות התפרחת, כדי לאתר שלבי התפתחות בהם עשויים להיות הבדלים משמעותיים בביטוי. לסיכום יש לציין שההבדלים בביטוי שהתקבלו בעבודה זו מתבססים על מספר קטן של עצים. יחד עם זאת, הגדלת המדגם עשויה להגדיל את השונות הפנוטיפית הגדולה בין העצים החריגים. בשלב זה לא ניתן להבדיל בין מצב שבו ההבדלים בביטוי בעצים בעלי ה'פנוטיפ החמור' הינם אקראיים ומאפיינים רק את שלושת העצים שנבדקו לבין מצב שבו ההבדלים בביטוי נמצאים באסוציאציה לפנוטיפ. בעתיד ולאור התוצאות, יש להתמקד בפנוטיפים אחידים תוך הרחבת המדגם.

## 5.7. חשיבות חקלאית וכיוונים עתידיים

נטיעות שתילי תמר מתרבית רקמה הינן חדשות יחסית בארץ ובעולם, אך חיוניות להמשך התפתחות ענף התמר. בנוסף ליתרון של הריבוי המסיבי, מציעות שיטות הריבוי בתרבית רקמה מגוון אפשרויות לעתיד. ביניהן פיתוח או אינטרודוקציה של זנים חדשים המאופיינים, בתכונות פרי, יבול, חיוניות האבקה (בזכרים), ריבוי זנים עם עמידות למחלות נפוצות (כמו מחלת הביוד (Bayoud) המכה את ענף התמרים בצפון אפריקה), ופיתוח של שיטות התמרה גנטית בתמרים. יחד עם זאת, היווצרות טיפוסים חריגים (off-types) בתרביות רקמה (Al Kaabi, 2003; Kunert *et al.*, 2003; Al Kaabi *et al.*, 2007 Zaid and) מהווה מיכשול לגישות אלה. העבודה הנוכחית מסייעת להבנת המנגנון של יצירת העצים החריגים מפנוטיפ ספציפי. היא מצביעה על האפשרות שפגיעה בגנים המבקרים את התפתחות איברי הפרח היא המבקרת את היווצרות הפנוטיפים החריגים של 'חנטה לקויה' ו'ריבוי שחלות'. אם כי אין בעבודה זאת הוכחה ברורה להנחה זאת ולמנגנון האחראי לתופעה זאת. בעתיד ניתן לבחון גנים מועמדים נוספים, כמו גם את הגנים האלה, באורך מלא כולל אתרים רגולטורים, בפרחים משלבי התפתחות שונים ולבחון בהם את דגם המתילציה, רצף הבסיסים ודגם הביטוי. ההבדל שנמצא בביטוי הגן מסוג דיפנסין הקשור בהגנה על הצמח בתנאי עקה מצביע על האפשרות לבחון גנים נוספים שפעילותם משתנה בתנאי עקה. עבודה זאת מצביעה על האפשרות שדגם הביטוי של גנים מסוימיים עשוי להיות המנגנון המבקר את היווצרות הטיפוסים החריגים. איפיון גנים המצויים באסוציאציה לפנוטיפ עשויים לשמש בעתיד לזיהוי מוקדם של הפנוטיפים החריגים ב'ברה'. זיהוי מוקדם יכול למנוע שתילת עצים במטע בהם הפנוטיפ מתגלה רק לאחר מספר שנות גידול ובכך למנוע אובדן השקעות רבות. במקביל דרוש מחקר בתנאי תרבית רקמה כדי לאפיין את השפעתם של גורמים מסוימיים (כגון הרכב המצע, ותנאי הגידול) על היווצרות השונות הסומקלולנית. בכך יהיה ניתן לפתח פרוטוקולים טובים יותר של ריבוי בתרבית ריקמה במטרה למנוע יצירת עצים חריגים.

## 6. רשימת ספרות:

- אבידוב, י. (1959). עלילות עירק. הוצאת עם עובד.
- ברנשטיין, צ. (2004). התמר. הוצאת המועצת לייצור ושיווק פירות.
- ישראלי, י. (2004). ריבוי תמרים בתרבית רקמה. מתוך: "התמר", ברנשטיין, צ. פרק 9: הוצאת הדיקלאים בע"מ ומועצת הפירות.
- כהן, י., קורצ'ניסקי, ר., טריפלר, א., זיו, ג., כהן, ר. (2003). בעיות חנטה בעצי תמר מזן 'ברהי' שמקורם בתרבית רקמה. עלון הנוטע, 57, 275-279.
- סטולר, ש. (1977). גידול התמר בארץ ישראל. הוצאת הקיבוץ המאוחד.
- Adam, H., Jouannic, S., Escoute, J., Duval, Y., Verdeil, J.L. and Tregear, J.W. (2005). Reproductive developmental complexity in the African oil palm (*Elaeis guineensis*). American Journal of botany 92, 1836-1852.
- Adam, H., Jouannic, S., Morcillo, F., Orioux, Y., Duval, Y. and Tregear, J.W. (2007). Functional characterization of MADS box genes involved in the determination of oil palm flower structure. Journal of Experimental Botany 58, 1245-1259.
- Adam, H., Jouannic, S., Morcillo, F., Richaud, F., Duval, Y. and Tregear, J.W. (2006). MADS box genes in oil palm (*Elaeis guineensis*): patterns in the evolution of the SQUAMOSA, DEFICIENS, GLOBOSA, AGAMOUS and SEPALLATA subfamilies. Journal of Molecular Evolution 62, 15-31.
- Aitchitt, M., Ainsworth, C.C. and Thangavelu, M. (1993). A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from mature leaves of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Plant Molecular Biology Reporter 11, 317-319.
- Al Kaabi, H.H., Zaid, A. and Ainsworth, C. (2007). Plant-off-Types in Tissue Culture-derived Date Palm (*Phoenix dactylifera* L) Plants. International Date Palm Conference, Abu Dhabi, United Arab Emirates.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25, 3389-3402.
- Al-Wasel, A.S. (2001). Field performance of somaclonal variants of tissue culture-derived date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Plant Tissue Culture 11, 97-105.
- Alwee, S.S., Van der Linden, C.G., Van der Schoot, J., Folter, S.D., Angenent, G.C., Cheah, S.C. and Smulders, M.J.M. (2006). Characterization of oil palm MADS box genes in relation to the mantled flower abnormality. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 85, 331-344.
- Barrow, S.C. (1998). A monograph of *Phoenix* L. (*Palmae: Coryphoideae*). Kew Bulletin 53, 513-575.
- Bommert, P., Satoh-Nagasawa, N., Jackson, D. and Hirano, H.Y. (2005). Genetics and evolution of inflorescence and flower development in grasses. Plant Cell Physiology 46, 69-78.
- Bowman, J.L., Sakai, H., Jack, T., Weigel, D., Mayer, U. and Meyerowitz, E.M. (1992). SUPERMAN, a regulator of floral homeotic genes in *Arabidopsis*. Development 114, 599-615.

- Bowman, J.L. and Smyth, D.R. (1999). CRABS CLAW, a gene that regulates carpel and nectary development in *Arabidopsis*, encodes a novel protein with zinc finger and helix-loop-helix domains. *Development* 126, 2387-2396.
- Brettell, R.I.S., Dennis, E.S., Scowcroft, W.R. and Peacock, W.J. (1986). Molecular analysis of a somaclonal variant of alcohol dehydrogenase. *Molecular and General Genetics* 202, 335-344.
- Bustin, S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology* 25, 169-193.
- Bustin, S.A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* 29, 23-39.
- Chang, S., Puryear, J. and Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* 11, 113-116.
- Chen, Q., Atkinson, A., Otsuga, D., Christensen, T., Reynolds, L. and Drews, G.N. (1999). The *Arabidopsis* FILAMENTOUS FLOWER gene is required for flower formation. *Development* 126, 2715-1726.
- Clark, S.E., Running, M.P. and Meyerowitz, E.M. (1993). Clavata1, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* 119, 397-418.
- Cohen, Y., Korchinsky, R. and Tripler, E. (2004). Flower abnormalities cause abnormal fruit setting in tissue culture propagated date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Journal of Horticultural Sciences and Biotechnology* 79, 1007-1013.
- Colombo, L., Franken, J., Koetje, E., Van Went, J., Dons, H., Angenent, G. and van Tunen, A. (1995). The petunia MADS box gene FBP11 determines ovule identity. *Plant Cell* 7, 1859-1868.
- Corley, R.H.V., Lee, C.H., Law, I.M. and Wong, C.Y. (1986). Abnormal flower development in oil palm clones. *Planter* 62, 233-240.
- Corniquel, B. and Mercier, L. (1994). Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivar identification by RFLP and RAPD. *Plant Science* 101, 163-172.
- Dennis, E.S., Brettell, R.I.S. and Peacock, W.J. (1987). A tissue culture induced Adh1 null mutant of maize results from a single base change. *Molecular and General Genetics* 210, 181-183.
- Devanand, P.S. and Chao, C.T. (2003). Genetic Variation within 'Medjool' and 'Deglet Nur' date (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars in California detected by fluorescent-AFLP markers. *Journal of Horticultural Sciences and Biotechnology* 78, 405-409.
- Ditta, G., Pinyopich, A., Robles, P., Pelaz, S. and Yanofsky, M.F. (2004). The SEP4 gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. *Current biology* 14, 1935-1940.
- Djerbi, M. (2000). Abnormal fruiting of the date palm derived from tissue culture. *Proceedings of the Date Palm International Symposium, Windhoek, Namibia*, pp.73.

- Edwards, K.J. and Mogg, R. (2001). Plant genotyping by analysis of single nucleotide polymorphisms. In *Plant Genotyping: The DNA Fingerprinting of Plants*. Henry, R.J (ed). CABI Publishing, New York pp, 1-13.
- Eeuwens, C.J., Lord, S., Donough, C.R., Rao, V., Vallejo, G. and Nelson, S. (2002). Effects of tissue culture conditions during embryoid multiplication on the incidence of 'Mantled' flowering in clonally propagated oil palm. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 70, 301-323.
- Felsenstein, J. (2005). Phylip (Phylogeny Inference Package) version 3.66. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle. ,<<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>>.
- Finnegan, E., Peacock, W. and Dennis, E. (1996). Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8449-8454.
- Finnegan, E.J., Genger, R.K., Peacock, W.J. and Dennis, E.S. (1998). DNA methylation in plants. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, 223-247.
- Fornara, F., Parenicova, L., Falasca, G., Pelucchi, N., Masiero, S., Ciannamea, S., Lopez-Dee, Z., Altamura, M.M., Colombo, L. and Kater, M.M. (2004). Functional characterization of OsMADS18, a member of the AP1/SQUA subfamily of MADS box genes. *Plant Physiology* 135, 2207-2219.
- Gehrke, C.W., Mc-Cune, R.A., Gama-Sosa, M., Ehrlich, M. and Kuo, K.C. (1984). Quantitative reverse-phase high-performance liquid chromatography of major and modified nucleosides in DNA. *Journal of Chromatography* 301, 199-219.
- Goto, K. and Meyerowitz, E.M. (1994). Function and regulation of the *Arabidopsis* floral homeotic gene PISTILLATA. *Genes and Development* 8, 1548-1560.
- Gruenbaum, Y., Naveh-Many, T., Cedar, H. and Razin, A. (1981). Sequence specificity of methylation in higher plant DNA. *Nature* 292, 860-862.
- Gu, Q., Ferrándiz, C., Yanofsky, M.F. and Martienssen, R. (1998). The FRUITFULL MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development* 125, 1509-1517.
- Gurevich, V., Lavi, U. and Cohen, Y. (2005). Genetic variation in date palms propagated from offshoots and tissue culture. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 130, 46-53.
- Hama, E., Takumi, S., Ogihara, Y. and Murai, K. (2004). Pistillody is caused by alterations to the class-B MADS-box gene expression pattern in alloplasmic wheats. *Planta* 218, 712-720.
- Ingram, G.C., Goodrich, J., Wilkinson, M.D., Simon, R., Haughn, G.W. and Coen, E.S. (1995). Parallels between UNUSUAL FLORAL ORGANS and FIMBRIATA, genes controlling flower development in *Arabidopsis* and *Antirrhinum*. *Plant Cell* 7, 1501-1510.
- Irish, V.F. (2001). Variations on a theme: flower development and evolution. *Genome Biology* 1, 1015.1-1015.4.

- Jack, T. (2004). Molecular and genetic mechanisms of floral control. *Plant Cell* 16, S1-S17.
- Jacobsen, S.E. and Meyerowitz, E.M. (1997). Hypermethylated SUPERMAN epigenetics alleles in *Arabidopsis*. *Science* 277, 1100-1103.
- Jacobsen, S.E., Sakai, H., Finnegan, E.J., Cao, X. and Meyerowitz, E.M. (2000). Ectopic hypermethylation of flower-specific genes in *Arabidopsis*. *Current Biology* 10, 179-186.
- Jaligot, E., Beule, T. and Rival, A. (2002). Methylation-sensitive RFLPs: characterisation of two oil palm markers showing somaclonal variation-associated polymorphism. *Theoretical and Applied Genetics* 104, 1263-1269.
- Jaligot, E., Beule, T., Baurens, F.S., Billotte, N. and Rival, A. (2004). Search for methylation-sensitive amplification polymorphisms associated with the 'mantled' variant phenotype in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Genome* 47, 224-228.
- Jaligot, E., Rival, A., Beule, T., Dussert, S. and Verdeil, J.L. (2000). Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq): the DNA methylation hypothesis. *Plant Cell Reports* 19, 684-690.
- Jang, S., Hur, J., Kim, S.J., Han, M.J., Kim, S.R. and An, G. (2004). Ectopic expression of OsYAB1 causes extra stamens and carpels in rice. *Plant Molecular Biology* 56, 133-143.
- Yeivin, A. and Razin, A. (1993). DNA methylation: molecular biology and biological significance. In *DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance*. Jost, J.P. and Saluz, H.P (ed). Birhauser Verlag, Basel, Switzerland pp, 523-568.
- Kaeppler, S.M., Kaeppler, H.F. and Rhee, Y. (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* 43, 179-188.
- Kang, H.G., Jeon, J.S., Lee, S. and An, G. (1998). Identification of class B and class C floral organ identity genes from rice plants. *Plant Molecular Biology* 38, 1021-1029.
- Khlestkina, E.K. and Salina, E.A. (2006). SNP markers: methods of analysis, ways of development, and comparison on an example of common wheat. *Russian Journal of Genetics* 42, 585-594.
- Kofuji, R., Sumikawa, N., Yamasaki, M., Kondo, K., Ueda, K., Ito, M. and Hasebe, M. (2003). Evolution and divergence of the MADS-box gene family based on genome-wide expression analyses. *Molecular Biology and Evolution* 20, 1963-1977.
- Krizek, B.A. and Fletcher, J.C. (2005). Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. *Nature Reviews Genetics* 6, 688-698.
- Kunert, K.J., Baaziz, M. and Cullis, C.A. (2003). Techniques for determination of true-to-type date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plants: a literature review. *Emirates Journal of Agricultural Sciences* 15, 1-16.
- Kyozuka, J., Konishi, S., Nemoto, K., Izawa, T. and Shimamoto, K. (1998). Downregulation of RFL, the FLO/LFY homolog of rice, accompanied with

- panicle branch initiation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 1979-1982.
- Larkin, P.J. and Scowcroft, W.R. (1981). Somaclonal variation-a novel source of variability from cell culture for plant improvement. Theoretical and Applied Genetics 60, 197-214.
- Laux, T., Meyer, K.F.X., Berger, K. and Jurgens, G. (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. Development 122, 87-96.
- Lee, S., Jeon, J.S., An, K., Moon, Y.H., Lee, S., Chung, Y.Y. and An, G. (2003). Alteration of floral organ identity in rice through ectopic expression of OsMADS16. Planta 217, 904-911.
- Madlung, A., Masuelli, R.W., Watson, B., Reynolds, S.H., Davison, J. and Comai, L. (2002). Remodeling of DNA Methylation and Phenotypic and Transcriptional Changes in Synthetic *Arabidopsis* Allotetraploids. Plant Physiology, 129, 733-746.
- Mandel, M.A., Gustafson-Brown, C., Savidge, B. and Yanofsky, M.F. (1992). Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene APETALA1. Nature 360, 273-277.
- Marino, J.H., Cook, P. and Miller, K.S. (2003). Accurate and statistically verified quantification of relative mRNA abundances using SYBR Green I and real-time RT-PCR. Journal of Immunological Methods 283, 291-306.
- Matthes, M., Singh, R., Cheah, S.C. and Karp, A. (2001). Variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture-derived regenerants revealed by AFLPs with methylation-sensitive enzymes. Theoretical and Applied Genetics 102, 971-979.
- McCubbin, M.J., Van Staden, J. and Zaid, A. (2000). A Southern African survey conducted for off-types on date palms produced using somatic embryogenesis. Proceedings of the Date Palm International Symposium, Windhoek, Namibia, pp, 68-72.
- Mena, M., Ambrose, B., Meeley, R.B., Briggs, S.P., Yanofsky, M.F. and Schmidt, R.J. (1996). Diversification of C-function activity in *maize* flower development. Science 274, 1537-1540.
- Meyerowitz, E.M., Bowman, J.L., Brockman, L.L., Drews, G.N., Jack, T., Sieburth, L.E. and Weigel, D. (1991). A genetic and molecular model for flower development in *Arabidopsis thaliana*. Development 1, 157-167.
- Mizukami, Y. and Ma, H. (1995). Separation of AG function in floral meristem determinacy from that in reproductive organ identity by expressing antisense AG RNA. Plant Molecular Biology 28, 767-784.
- Morcillo, F., Gagneur, C., Adam, H., Richaud, F., Singh, R., Cheah, S.C., Rival, A., Duval, Y. and Tregear, J.W. (2006). Somaclonal variation in micropropagated oil palm. Characterization of two novel genes with enhanced expression in epigenetically abnormal cell lines and in response to auxin. Tree Physiology 26, 585-594.

- Nagasaki, H., Matsuoka, M. and Sato, Y. (2005). Members of TALE and WUS subfamilies of homeodomain proteins with potentially important functions in development form dimers within each subfamily in rice. *Genes and Genetic Systems* 80, 261-267.
- Nagasawa, N., Miyoshi, M., Sano, Y., Satoh, H., Hirano, H.Y., Sakai, H. and Nagato, Y. (2003). SUPERWOMAN1 and DROOPING LEAF genes control floral organ identity in rice. *Development* 130, 705-718.
- Nam, J., DePamphilis, C.W., Ma, H. and Nei, M. (2003). Antiquity and evolution of the MADS-box gene family controlling flower development in plants. *Molecular Biology and Evolution* 20, 1435-1447.
- Nandi, A.K., Kushalappa, K., Prasad, K. and Vijayraghavan, U. (2000). A conserved function for *Arabidopsis* SUPERMAN in regulating floral whorl cell proliferation in rice, a monocotyledonous plant. *Current Biology* 10, 215-218.
- Nasu, S., Suzuki, J., Ohta, R., Hasegawa, K., Yui, R., Kitazawa, N., Monna, L. and Minobe, Y. (2002). Search for and analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in rice (*Oryza sativa*, *Oryza rufipogon*) and establishment of SNP markers. *DNA Research* 8, 163-171.
- Oh, T.J., Cullis, M.A., Kunert, K., Engelborgh, I., Swennen, R. and Cullis, C.A. (2007). Genomic changes associated with somaclonal variation in banana (*Musa spp.*). *Physiologia Plantarum* 129, 766-774.
- Page, R.D.M. (2000). TREEVIEW, Tree drawing software for Apple Macintosh and Microsoft Windows. Ver. University of Glasgow, Glasgow, Scotland, UK. <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>.
- Pelucchi, N., Fornara, F., Favalli, C., Masiero, S., Lago, C., Pe, E., Colombo, L. and Kater, M.M. (2002). Comparative analysis of rice MADS-box genes expressed during flower development. *Sexual Plant Reproduction* 15, 113-122.
- Pelaz, S., Ditta, G.S., Baumann, E., Wisman, E. and Yanofsky M.F. (2000). B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature* 405, 200-203.
- Peraza-Echeverria, S., Herrera-Valencia, V.A. and Kay, A. (2001). Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Science* 161, 359-367.
- Pflieger, S., Lefebvre, V. and Causse, M. (2001). The candidate gene approach in plant genetics: a review. *Molecular Breeding* 7, 275-291.
- Reuveni, O. (1986). Date. In *CRC Handbook of Fruit Set and Development*, Monselise, S.P ed. Boca Raton: CRC Press, pp 119-144.
- Richards, E.J. (1997). DNA methylation and plant development. *Trends in Genetics* 13, 319-323.
- Rival, A., Bertrant, L., Beule, T., Combes, M.S., Trouslot, P. and Lashermes, P. (1998a). Suitability of RAPD analysis for detection of somaclonal variants in oil palm (*Elaeis guineensis Jacq.*). *Plant Breeding* 117, 73-76.

- Rival, A., Tregear, J., Verdeil, J.L., Richaud, F., Beule, T., Hartman, C., Rode, A. and Duval, U. (1998b). Molecular search for mRNA and genomic markers of the oil palm 'mantled' somaclonal variation. *Acta Horticulturae* 461, 165-171.
- Saker, M.M., Bekheet, S.A., Taha, H.S., Fahmy, A.S. and Moursy, H.A. (2000). Detection of somaclonal variations in tissue culture-derived date palm plants using isoenzyme analysis and RAPD fingerprints. *Biologia Plantarum* 43, 347-351.
- Sawa, S., Ito, T., Shimura, Y. and Okada, K. (1999). FILAMENTOUS FLOWER controls the formation and development of *Arabidopsis* inflorescences and floral meristems. *Plant Cell* 11, 69-86.
- Schmidt, R.J., Velt, B., Mandel, M.A., Mena, M., Hake, S. and Yanofsky, M.F. (1993). Identification and molecular characterization of ZAG1, the *maize* homologue of the *Arabidopsis* floral homeotic gene AGAMOUS. *Plant Cell* 5, 729-737.
- Sham, P., Bader, J.S., Craig, I., O'Donovan, M. and Owen, M. (2002). DNA Pooling: a tool for large-scale association studies. *Nature reviews. Genetics* 3, 862-871.
- Suzaki, T., Sato, M., Ashikari, M., Miyoshi, M., Nagato, Y. and Hirano, H.Y. (2004). The gene FLORAL ORGAN NUMBER1 regulates floral meristem size in rice and encodes a leucine-rich repeat receptor kinase orthologous to *Arabidopsis* CLAVATA1. *Development* 131, 5649-5657.
- Tariq, M. and Paszkowski, J. (2004). DNA and histone methylation in plants. *Trends in Genetics* 20, 244-251.
- Tisserat, B. (1979). Propagation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro. *Journal of Experimental Botany* 30, 1275-1283.
- Tregear, J.W., Morcillo, F., Richaud, F., Berger, A., Singh, R., Cheah, S.C., Hartmann, C., Rival, A. and Duval, Y. (2002). Characterization of a defensin gene expressed in oil palm inflorescences: induction during tissue culture and possible association with epigenetic somaclonal variation events. *Journal of Experimental Botany* 53, 1387-1396.
- Savolainen, V. and Chase, M.W. (2003). A decade of progress in plant molecular phylogenetics. *Trends in Genetics* 19, 717-724.
- Warnecke, P.M., Stirzaker, C., Song, J., Grunau, C., Melki, J.R. and Clark, S.J. (2002). Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing. *Methods* 27, 101-107.
- Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D.R., Yanofsky, M.F. and Meyerowitz, E.M. (1992). LEAFY controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* 69, 843-859.
- Whipple, C.J., Ciceri, P., Padilla, C.M., Ambrose, B.A., Bandong, S.L. and Schmidt, R.J. (2004). Conservation of B-class floral homeotic gene function between *maize* and *Arabidopsis*. *Development* 131, 6083-6091.
- Yamaguchi, T., Nagasawa, N., Kawasaki, S., Matsuoka, M., Nagato, Y. and Hirano, H.Y. (2004). The YABBY gene DROOPING LEAF regulates carpel specification and midrib development in *Oryza sativa*. *Plant Cell* 16, 500-509.



- Yamaguchi, T. and Hirano, H.Y. (2006). Function and Diversification of MADS-Box genes in rice. *The Scientific World Journal* 6, 1923–1932.
- Zaid, A. (1999). Date palm cultivation. ISSN 0259-2517 FAO Plant production and protection paper number 156. FAO, Rome.
- Zaid, A. and Al Kaabi, H. (2003). Plant-off types in tissue culture-derived date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Emirates Journal of Agricultural Sciences* 15, 17-35.
- Zhang, S.H., Hu, W.J., Wang, L.P., Lin, C.F., Cong, B., Sun, C.R. and Luo, D. (2005). TFL1/CEN-like genes control intercalary meristem activity and phase transition in rice. *Plant Science* 168, 1393-1408.
- Zik, M. and Irish, V.F. (2003). Global identification of target genes regulated by APETALA3 and PISTILLATA floral homeotic gene action. *Plant Cell* 15, 207-222.

## 7. תקציר באנגלית

### Abstract

Date palm is a major tree crop in arid regions of the Middle East and North Africa. Date palms are traditionally propagated through offshoots, but their number is limited. The global need to expand date palm groves has led to the development of methods for tissue culture propagation. Most of the trees generated from tissue culture are normal and true-to-type, but a significant number of them have typical abnormal phenotypes. Thousands of such off-type trees were identified in Israel and many more exist in other countries. The off-type trees cause major losses to the farmers.

The present study is aimed at elucidating the mechanism responsible for the formation of one of the most common off-types - 'low fruit-setting' and 'multi-carpel' flowers which appears among trees of the 'Barhee' cultivar. Trees having the 'severe phenotype' are characterized by 'low fruit-setting' and high percentage of flowers and fruitlets with supernumerary carpels. The 'weak phenotype' is characterized by 'low fruit setting' and a low percentage of 'multi-carpel' flowers and fruitlets. Our working hypothesis is that the 'multi-carpel' phenotype is generated by a genetic and/or epigenetic change in one of the genes controlling flower development. The present study focuses on isolation of date palm genes controlling flower development, and their comparison between normal and off-types trees.

We have identified sequences from 11 date palm genes, showing high homology to 'flower development genes' from various plant species. The sequence homology between the date palm genes to genes from other monocot plants ranges from 77% to 96%. Most of the orthologous genes from oil palm have the highest homology levels to the date palm genes (90-96%).

These genes were analyzed and compared between normal and off-types trees at the following aspects: (1) DNA-methylation patterns, (2) Sequence variation, (3) Expression patterns.

(1) Methylation patterns were assessed by the two isoschizomers, *MspI* and *HpaII* sharing the same recognition sequence, but differing in their sensitivity to DNA-methylation, followed by PCR amplification of the restricted region. In two sequences of the genes PdSPW1 and PdMADS4, a PCR product was

generated in the off-type tree, suggesting that a small fraction of DNA was not cut by *MspI*, yet in the normal tree no PCR product was detected. However, it is not clear whether the uncut DNA resulted from a difference in methylation patterns between normal and off-type trees or from low enzyme efficiency.

(2) We have looked for SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) and genotypic differences (homozygous vs. heterozygous) distinguishing between normal and off-type trees. Comparison of one normal with one off-type tree revealed a homozygous SNP in the intron of the gene PdMADS4, and a SNP distinguishing between a heterozygote and a homozygote in the coding sequence of the genes PdMADS4, PdAGL2-3, PdDL and PdSQUA1. All the above mentioned sequence variations did not distinguish other normal trees from off-types and thus are not associated with the phenotype.

(3) Patterns of gene expression in flowers of normal and off-type trees were characterized by Quantitative RT-PCR. The expression of two genes, PdDIF and PdSPW1, was three times lower in trees having the 'severe phenotype' of 'low fruit setting' and formation of 'multi carpel' flowers than in the normal trees. PdSPW1 is a homolog of B function genes controlling flower development. PdDIF is homologous to defense-related genes which are thought to play a protective role in biotic and abiotic stresses.

The present study widens our knowledge regarding the mechanism responsible for somaclonal variation in date palm. Alteration of expression patterns of "flower development genes" during the TC propagation process, could be responsible for generation of off-type trees. Understanding the mechanism by which these off-types are generated through tissue culture is required for modifying the tissue culture conditions and for development of methods for early detection of the off-types. Elimination of the abnormal phenotypes or their early detection is highly beneficial for the date palm industry.

**Characterization of genes controlling flower organ  
development in normal and off-type date palm (*Phoenix  
dactylifera* L.) trees**

**M.Sc. Thesis**

**Submitted to the Faculty of Agricultural, Food and Environmental Quality  
Sciences of the Hebrew University of Jerusalem**

**By**

**Maor Shochat**

**Rehovot, Israel**

**September 2007**