

דו"ח מסכם לתכנית מחקר מספר 10-0807-203

איתור גנים מרכזיים המשתתפים בתגובה לעקת יובש ככלי לשיפור יכולת ניצול המים בצמח וחסכון במים בגידול עצי פרי

Identification of key regulators control drought stress as a tool to improve plant water use efficiency and decrease water use in fruit trees agriculture

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

גיורא בן-ארי : המכון למדעי הצמח, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן.

אמנון שוורץ : המכון למדעי הצמח, הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית, רחובות.

איריס ביטון : המכון למדעי הצמח, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן.

Giora Ben-Ari: Institute of Plant Science, Volcani center, ARO, Bet-Dagan. Email – giora@agri.gov.il.

Amnon Schwartz: Institute of Plant Science, Faculty of Agriculture, Hebrew University of Jerusalem, Rehovot. Email - schwartz@agri.huji.ac.il.

Iris Biton: Institute of Plant Science, Volcani center, ARO, Bet-Dagan. Email – ivrb28@volcani.agri.gov.il.

אפריל 2011

ניסן תשע"א

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא.

חתימת החוקר: _____

פרסומים:

Uri Boneh, Iris Biton, Chuanlin Zheng, Amnon Schwartz and Giora Ben-Ari (2011)
Characterization of the ABA perception mechanism in *Vitis vinifera*. Submitted to *Plant Molecular Biology*.

תקציר

מנגנון התגובה של הצמח ליובש מבוסס על הפעלה ורגולציה של גנים המשתתפים בתגובה לעקה. החומצה האבסיסית (ABA) הינה ההורמון העיקרי המשתתף בתגובת הצמח ליובש. מנגנון קליטת ה-ABA בתא פוענח לאחרונה ואותרו הגנים המשתתפים בקליטת סיגנל ה-ABA ומנגנון הפעולה של גנים אלו. בהיעדר חומצה אבסיסית, פוספטאז ספציפי (PP2C) נמצא באינטראקציה ומעכב את הקינאז SnRK2. קשירה של ABA לרצפטור ל-ABA, גורמת שינוי במבנה המרחבי של הרצפטור. שינוי זה מאפשר אינטראקציה בין הרצפטור ל-PP2C ובכך גורם לשחרור העיכוב של הקינאז SnRK2. הקינאז המשוחרר מפעיל את עצמו על ידי זרחון עצמי ובהמשך מאקטב את פקטור השיעתוק ABF שנקשר לפרומוטרים של גנים המשתתפים בתגובה ליובש וגורם לאינדוקציה של גנים אלו. מעבר האותות של ABA בגפן כולל 8 רצפטורים, 3 מעכבים (PP2C), 6 קינאזות (SnRK2) ושני פקטורי שעתוק (ABF). במחקר הנוכחי, אופיינה תבנית הביטוי של גנים אלו בעקבות חשיפת ייחורי גפן לעקות אביוטיות שונות כולל יובש, ריסוס ABA, קור ועקת מלח. רב הגנים עוברים רגולציה בתגובה לעקות אביוטיות כאשר חלקם עוברים אינדוקציה וחלקם השתקה. הרצפטורים ל-ABA בגפן מראים ספציפיות לרקמה ותבנית הביטוי שלהם שונה בתכלית, בין העלים לשורשים. לעומתם, שלושת המעכבים, מראים ספציפיות לעקה ותבנית ביטוי דומה בעלים ובשורשים. האינטראקציות בין הגנים המשתתפים בהעברת סיגנל ה-ABA נבחנו בשיטת Y2H. נמצא כי המעכב *VvPP2C2* הינו המעכב העיקרי אשר עובר אינטראקציה עם הרצפטורים ל-ABA ואינטראקציה זו תלויה בנוכחות ABA. בנוסף נמצא כי פקטור השיעתוק *ABF1* עובר אינטראקציה עם חמישה מתוך ששת הקינאזות. מאידך, לא אותרה אינטראקציה בין המעכב (PP2C) לקינאז (SnRK2). התוצאה של חוסר אינטראקציה בין המעכב לקינאז מעלה אפשרות שבגפן, שלא כמו בארבידופסיס, ישנו חלבון נוסף שמקשר בין המעכב לקינאז. אפשרות כזו נבחנת בימים אלו על ידי אפיון הקומפלקס של הקינאז בעזרת MS. זיהוי, אפיון ומניפולציה של הגנים העיקריים המשתתפים בתהליך העברת סיגנל ה-ABA בעצי פרי, יכול לתרום רבות לשיפור ביצועי העצים.

מבוא ותאור הבעיה

השינויים האקלימיים הגלובליים גורמים לעלייה מתמדת בשטחים המוגדרים צחיחים, דבר המשפיע על גידול צמחים. מאידך, על פי ההערכות הקיימות, עד שנת 2025 יידרש גידול של 40% ביבול החקלאי כדי לספק מזון לאוכלוסיית העולם הגדלה. במקביל, המחסור החריף במים הכתיב לאחרונה שינויים ועדכוניים בהקצאת המים לחקלאות. שינויי האקלים הצפויים יגרמו למשאב המים להתייקר אף יותר, בעולם בכלל ובישראל בפרט. על מנת להמשיך ולקיים את החקלאות בארץ ישנו הכרח ליעל את השימוש במי השקיה בחקלאות. ייעול זה יכול להתבצע בשתי רמות: רמת המיכון ורמת הצמח [1]. במחקר הנוכחי הוצע להתמקד בצמח ולפעול להבנת הבסיס המולקולרי למנגנון הפיזיולוגי

המשתתף בתגובה לעקת יובש. ידע מסוג זה הוא בבחינת תשתית הכרחית לפיתוח עתידי מושכל של אסטרטגיות שיאפשרו ניצול יעיל יותר של המים על יד הצמח ויאפשרו חסכון בהשקיה.

סקירת ידע

תגובת הצמח ליובש

מים הם המרכיב העיקרי בתאים צמחיים. כמותם נעה בין 60% ל- 95% מהמשקל הטרי של רקמות צמחיות (למעט זרעים) במינים שונים [2]. ברמה התאית, המים אחראים על עיצוב המבנה הממברנלי על ידי קיטוב של מולקולות הידרופוביות/הידרופיליות. בנוסף, המים משמשים כתווך המאפשר התמוססות של מרכיבים הידרופיליים וקיום ראקציות ביוכימיות. נוכחותם של מים בכמות מספקת בתא, הכרחית לשימור לחץ טורגור, החיוני לגדילה תקינה של התאים. ברמת הרקמה, המים מהווים אמצעי קישור בין התאים. המים נעים בחללים הבין תאיים ובתוך התאים ואחראים על תנועת מומסים ברקמה. ברמת הצמח, המים משמשים להובלת חומרי מזון והורמונים בין אברי הצמח השונים.

במהלך התפתחותם, נאלצים צמחים להתמודד עם מצבי עקה שונים. תנאי הסביבה המשתנים עשויים להביא לתנאי חסר או עודף, להם עשויים להיות השפעות חריפות על הצמח - מפגיעה זמנית בהתפתחות ועד לכמישה מוחלטת. במהלך עקת יובש נחשף הצמח לתנאי מחסור במים העשוי לפגוע בהתפתחותו התקינה. קיימים בצמח מנגנוני הגנה טבעיים בפני עקות יובש, חלקם מנגנונים מורפוגנטיים הנוגעים לשינויים באופי הצימוח, כגון שינוי יחס שורש/נוף, שינויים בגודל העלים, הקדמת מועדי הפריחה ועוד, וחלקם בעלי אופי פיסיוולוגי, כגון התאמה אוסמוטית של תאי השורש והנוף לויסות פוטנציאל מים, שינויים בבקרת מוליכות הפיוניות ועוד [3]. מחסור מים בקרקע מורגש על ידי השורשים וגורם ליצירת אותות כימיים והידראוליים ולמעברם לשאר חלקי הצמח דרך צינורות העצה [4]. האותות הכימיים המיוצרים בשורשים דומיננטיים בשלבי העקה הראשונים לפני יצירת האותות ההידראוליים [5]. האותות ההידראוליים דומיננטיים בשלבים מאוחרים יותר של העקה כאשר היא גוברת וככל הנראה אחראים על ייצור החומצה האבסיסית בעלים והתגובה לטווח רחוק [6].

תפקיד ההורמון ABA בתגובה ליובש

החומצה האבסיסית (ABA), הורמון צמחי המצוי בכל אברי הצמח, נוצרת, נקשרת ומתפרקת בקצב מהיר מאד. התגובה ההורמונלית של מערכת השורשים לעקת יובש מתאפיינת בהעברת סיגנלים שמקורם בשורש אל עבר הנצר (chemical signaling root-to-shoot). ההורמון העיקרי המיוצר בתגובה לעקת יובש הוא החומצה האבסיסית שרמתה בשורשים עשויה לעלות בתנאי יובש עד פי 10 ביחס לרמה הבסיסית המיוצרת בתנאים אופטימליים. בעבר טענו שהחומצה האבסיסית מנויידת מהשורשים לעלים דרך העצה ומשפיעה על פתיחת הפיוניות [7], אולם בשנים האחרונות (כבעבר הרחוק יותר), הראו מספר מחקרים שלהורמון ABA המיוצר בעלים עצמם, עשוי להיות משקל גדול יותר בבקרת פתחי הפיוניות מאשר לזה המיוצר בשורש [6, 8]. השפעת החומצה האבסיסית על רגולצית הפיוניות בתגובה לעקת יובש נחקרת כבר מספר עשורים, והחלה מאפיון פנוטיפ המוטנט *flacca* בעגבניה הפגום בסינטזת חומצה אבסיסית ומראה פתח פיונית חריג [9]. בעקבות עקת יובש

החומצה האבסיסית נצברת בעלים, מעודדת סגירת פיוניות פתוחות ומעכבת פתיחת פיוניות סגורות, וכתוצאה מכך מפחיתה איבוד מים. מספר מולקולות זהו כשליחים משניים של החומצה האבסיסית כגון: סידן ציטוזולי, cyclic ADP-ribose, inositol 1,4,5 trisphosphate, inositol diacylglycerol pyrophosphate, hexakisphosphate ומי חמצן [10, 11]. נמצא כי מתן חומצה אבסיסית חיצונית משרה עליה בביטוי של גנים רבים הידועים כמשתתפים בתהליך תגובת הצמח ליובש [12].

תאי השמירה

תאי השמירה הינם תאי אפידרמיס מתמחים, המאורגנים בזוגות, ומקיפים את חלל הפיונית. כאשר התנאים מתאימים לפתיחת הפיונית (כלומר, עוצמת אור/לחות גבוהה), משאבת פרוטונים אשר ממוקמת על ממברנת תאי השמירה, מוציאה יוני H^+ מתאי השמירה של הפיונית. הפוטנציאל החשמלי של התאים הופך להיות שלילי, ועקב כך מתחילה כניסה של יוני אשלגן (K^+) לתוכם. עליית רמת האשלגן בתאים מגדילה את הלחץ האוסמוטי בהם, והדבר גורם לכניסת מים בתהליך של אוסמוזה. עקב כניסת המים לתאי השמירה, נפח התאים ולחץ הטורגור גדלים. הבדלי אלסטיות בין שתי דפנות תאי השמירה גורם לתאי השמירה להמתח לכיוונים מנוגדים ועקב כך לפתיחת הפיונית. בתגובה ליובש ישנה עליה ברמת החומצה האבסיסית בתאי השמירה. עליה זו מעודדת צבירת סידן ציטוזולי, אשר גורם בהמשך לשחרור אניונים ואשלגן דרך תעלות בממברנת התא. שחרור זה גורם בעקבותיו ליציאת מים מתאי השמירה, וכתוצאה מכך הפיוניות נסגרות. עליית סידן ציטוזולי בתאי השמירה בעקבות היפרפולריזציה של ממברנת תאי השמירה, מתרחשת רק בנוכחות מי חמצן החיוניים לתהליך סגירת הפיוניות. השראת סגירת פיוניות על ידי החומצה האבסיסית, תלויה גם בחומצה חנקנית המעודדת שחרור סידן ציטוזולי [13, 14].

מעבר האותות בתגובה ליובש

במצב של חשיפה לעקת יובש, כמו גם לעקות אחרות, מופעל בתא תהליך של מעבר אותות (signal transduction), אשר בו התא מתרגם עקה חיצונית לתגובה ביוכימית, הכוללת הפעלת מספר רב של גנים. התגוננות הצמח בפני היובש מתחילה על ידי חישה של מחסור במים. חישה זו גורמת להפעלת קינאזות ספציפיים אשר מפעילים פקטורי שיעתוק. פקטורי השיעתוק אשר מופעלים נקשרים לאזור הפרומוטר של גני מטרה, וגורמים לשיעתוק מוגבר של חלבוני תגובה המסייעים בהתמודדות עם העקה [15, 16]. המנגנון הביוכימי והמולקולרי של תגובת הצמח ליובש נלמד לעומק בעיקר בארבידופסיס ונמצא כי קיימים שני מסלולי תגובה של הצמח ליובש. האחד תלוי והשני בלתי תלוי בחומצה האבסיסית [12]. בודדו מספר גדול של גנים המעורבים בתהליך, כולל מאות גנים אשר מתבטאים ביתר בתגובה ליובש ומתן ABA אקסוגני [17]. עד כה זוהו ארבעה רצפטורים של חומצה אבסיסית: חלבון הקושר רני"א FCA, CHLH, GCR2 ולאחרונה משפחת החלבונים RCAR/PYR [18-22].

מסלול חישת החומצה האבסיסית

מנגנון הבקרה של ABA מבוסס על קליטתו בתא הצמחי אשר בעקבותיו מופעלת שרשרת גנים (cascade). שרשרת הגנים הפועלת בתגובה ל ABA כוללת בתחילתה את הקולטן הראשוני שקולט את הסיגנל, ובסופה נמצאים פקטורי שעתוק, שאחראים לשעתוק הגנים המעורבים בתגובה לעקות א-ביוטיות ול-ABA.

השערות רבות היו בקשר לשאלה מי הוא הקולטן הראשוני ל ABA, אך רק בחודש מאי 2009 דווח בשני מחקרים בלתי תלויים על משפחת הגנים המהווים קולטנים של ABA בארבידופסיס RCAR/PYR/PYL [19, 20].

הגילוי של קבוצת הקולטנים RCAR/PYR/PYL והמבנה המרחבי שלהם, הוביל להבנה כיצד פועלת קליטת הסיגנל של ABA, ואת תפקידם של כל המעורבים בשרשרת מעבר הסיגנל.

כאשר ABA אינו נוכח, ישנו מעכב-PP2C אשר על ידי קשירה לחלבון ה-SnRK2 מעכב את פעילותו. כאשר ABA נוכח במערכת, יש קישור בין הקולטן ל ABA, אשר מביא לשינוי המבנה המרחבי של הקולטן וגורם לקישור המעכב (PP2C) לקולטן. בעקבות שחרור ה-SnRK2 מהמעכב מופעלים חלבוני ה-SnRK2 על ידי זרחון עצמי ולאחר מכן מפעילים על ידי זרחון את פקטורי השעתוק המכונים ABFs. פקטורי השעתוק, לאחר הפעלתם, נקשרים לפרומוטורים של גנים ספציפיים המעורבים בתגובה ל ABA ומבקרים את רמת ביטויים [23, 24] (איור 1).

תגובת הגפן ליובש כמודל לעצי פרי

במחקר הנוכחי נרתם הידע שנרכש בארבידופסיס ובחד שנתיים אחרים, על מנת ללמוד על מנגנון התגובה של רב שנתיים מעוצים, שעשויה להיות מורכבת יותר. כצמח מודל למחקר בתחום, השתמשנו בגפן. אנליזה של תגובת הצמח ליובש צפויה להיות אינפורמטיבית בצמחים אשר עברו התאמה ליובש, כגון אלו הגדלים במזרח התיכון. באזור זה, עקב מחסור בגשמים פיתחו הצמחים אסטרטגיות שונות להתמודדות עם תנאי עקת יובש, כולל התאמה מורפולוגית ופיזיולוגית. הגפן לין *Vitis Vinifera* מעניין במיוחד, עקב מחזור הגידול שלו במהלך חודשי הקיץ. הגפן לין גדלה בתנאי עקת יובש קבועים למטרת שיפור איכות היין, ולכן מנגנוני התגובה ליובש בעץ פרי זה מפותחים [25]. בשונה מחד שנתיים, בעצי פרי רב שנתיים, עקת יובש בשנה אחת תשפיעה על התפתחות הצמח והיבול בשנים העוקבות, ועל כן ישנה חשיבות עליונה ללימוד מנגנון התגובה ליובש בעץ פרי רב שנתי כדוגמת הגפן. בנוסף, לאחרונה פורסמה טיוטה של רצף הגנום המלא של הגפן, עץ הפרי הראשון שרוצף במלואו [26]. השוואה בין רצף הארבידופסיס לרצף הגפן, שניהם מקבוצת ה-Rosids, מראה שרמת ההומולוגיה בין שני צמחים אלו גבוהה יחסית, וניתן ללמוד רבות על הפונקציה של גנים מגפן, על בסיס מחקר שנעשה על תפקוד אותם גנים בארבידופסיס.

מטרת המחקר

מטרת המחקר הנוכחי הינה הבנת הבסיס המולקולרי למנגנון הפיזיולוגי המשתתף בתגובה לעקת יובש, על ידי איתור ולימוד "רשתות ההפעלה" במעבר האותות של היובש. בעקבות הממצאים

שפורסמו לאחרונה וזיהוי מעבר האותות המלא בקליטת החומצה האבסיסית, החל מהקולטן וכלה בפקטור השעתוק, החלטנו להתמקד במעבר אותות זה. תוך שימוש בידע הרב שנרכש מלימוד קליטת החומצה האבסיסית בארבידופסיס, אפיינו את קליטת ה ABA בגפן.

עיקרי הניסויים והתוצאות

תוך שימוש במאגרי מידע והשוואת רצפי הגנים בארבידופסיס לגנום הגפן, בודדנו שמונה רצפטורים, 3 מעכבים, 6 קינאזות ו- 2 פקטורי שעתוק מגנום הגפן (איור 2). לשם אפיון רמות הביטוי של כלל הגנים המשתתפים בסיגנל החומצה האבסיסית, השתמשנו ב- RT-PCR. רמות הביטוי היחסי של הגנים הנבחנים, אופיינו בעלים ובשורשים של יחורי גפן, לאחר תנאי עקות אביוטיות הכוללים חשיפה לחומצה אבסיסית, יובש קור ומליחות. *VvABAREC1* עבר אינדוקציה בעלים, תחת כלל העקות הנבחנות. לעומת זאת, בשורשי גפן, גן זה הראה ירידה בביטוי בעקבות הטיפול השונים מלבד עקת מלח. רמת הביטוי של הגן *VvABAREC2* הייתה נמוכה מאוד ולא ניתנת לזיהוי ב- RT-PCR בכלל הדוגמאות. *VvABAREC3/4/5* הראו עליה ברמת הביטוי בעלים, בעקבות חשיפה לחומצה אבסיסית. כל הרצפטורים מלבד *VvABAREC1* מראים בעלים עליה ברמת הביטוי בעקבות טיפולים מסוימים וירידה ברמות הביטוי בעקבות טיפולים אחרים. לעומת זאת, בשורשים רב הרצפטורים לחומצה אבסיסית מראים ירידה ברמת הביטוי בעקבות עקות אביוטיות. כלומר הרצפטורים לחומצה אבסיסית מראים תבנית ביטוי ספציפית לרקמה. לעומתם, משפחת המעכבים PP2C מראים תבנית ביטוי ספציפית לעקה גם בעלים וגם בשורשים. *VvPP2C1* עובר אינדוקציה בעלים ובשורשים בעקבות חשיפה לעקת קור, *VvPP2C2* ספציפי ליובש וחשיפה לחומצה אבסיסית ו- *VvPP2C3* מראה עליה ברמת הביטוי בעקבות חשיפה לעקת מלח ולעקת יובש. ישנה קורלציה גבוהה ומובהקת בין רמות הביטוי של משפחת המעכבים PP2C בעלים ובשורשים בעקבות חשיפה לעקות אביוטיות ($r=0.767$; $P<0.0036$). לשם אפיון דומיננטיות בין משפחות הרצפטורים והמעכבים ברקמות השונות, נבחנו רמות הביטוי המוחלט של גנים אלו בעלים ושורשים של צמחים לא מטופלים. נראה שהרצפטור בעל רמת הביטוי הגבוהה ביותר בשורשים הוא *VvABAREC3* ובעלים *VvABAREC4*. במשפחת המעכבים נראה ש- *VvPP2C2* מראה ביטוי גבוה יחסית לאר הגנים במשפחה גם בעלים וגם בשורשים.

אינטראקציה חלבון – חלבון בין משתתפי העברת סיגנל החומצה האבסיסית בגפן:

על מנת לאפשר העברת סיגנל תקינה, צריכים החלבונים המשתתפים לעבור אינטראקציה אחד עם השני בשלבים שונים של תהליך העברת הסיגנל. בצמח המודל, בארבידופסיס, נמצא כי המעכב PP2C עובר אינטראקציה עם הקינאז SnRK2 כאשר אין במערכת חומצה אבסיסית. כאשר מוספת חומצה אבסיסית למערכת, מולקולות החומצה האבסיסית נקשרות לרצפטורים, ולאחר קשירתם, שינוי קונפורמציה ברצפטור מאפשר קשירתו למעכב. בעקבות שחרור המעכב מהקינאז, הקינאז מאקטב את עצמו ונקשר לפקטור השיעתוק. בארבידופסיס נמצאה אינטראקציה *in vitro* ו- *in vivo* בין פקטור השיעתוק לקינאז, בין הקינאז למעכב ובין המעכב לרצפטור כתלות בחומצה אבסיסית. לשם

לימוד הגורמים המשתתפים בהעברת הסיגנל בגפן, נבחנו אינטראקציות חלבון – חלבון במשפחות הגנים הני"ל בגפן. לשם בחינת האינטראקציות בגפן, השתמשנו במערכת Yeast two hybrid ולקו השמרים AH109 הוחדרו זוגות פלסמידים המבטאים גנים שונים. במערכת זו ביטוי הגנים מאפשר ייצור שתי חומצות אמינו טריפטופן ולאוצין. לפיכך שמר המבטא את שני הגנים הנבחנים יגדל על מצא חסר טריפטופן ולאוצין. במקרה של אינטראקציה בין החלבונים הנבחנים ישנו ייצור של חומצת אמינו היסטידין ושל סמן נוסף lacZ. לפיכך שמר המבטא שני חלבונים שעוברים אינטראקציה יגדל על מצע חסר טריפטופן, לאוצין והיסטידין. עקב ייצור בזלי מועט של היסטידין, ישנו צורך להוסיף למצע מעכב היסטידין 3AT, על מנת לאפשר סלקציה על מצע זה, שעליו יגדלו רק שמרים המכילים חלבונים שעברו אינטראקציה. יכולת האינטראקציה בין הרצפטורים השונים למעכבים השונים נבחנה בהיעדר או הימצא ABA על מצע הגידול. נמצא ש-VvPP2C3 לא עובר אינטראקציה עם אף אחד משמונת הרצפטורים. לעומתו VvPP2C1 ו-VvPP2C2 הראו אינטראקציה עם חמישה רצפטורים כל אחד. VvPP2C1 עובר אינטראקציה עם חמשת הרצפטורים כתלות בהמצאות ABA במצע הגידול. לעומתו, VvPP2C2 עובר אינטראקציה עם שני רצפטורים כתלות ב-ABA ועם שלושה רצפטורים ללא תלות זו (איור 4א). על מנת לבחון את עוצמת האינטראקציות השונות, נעשה שימוש בסמן נוסף, lacZ, שנוצר רק כאשר יש אינטראקציה בין החלבונים הנבחנים. בעזרת סמן זה, ניתן לראות שהאינטראקציות בין המעכב VvPP2C1 לרצפטורים חלשות יחסית. לעומתם, האינטראקציות בין VvPP2C2 לבין הרצפטורים חזקות מאוד ונותנות ביטוי גבוה של lacZ כאשר מוסיפים ABA למצע הגידול (איור 4ב). בבחינת האינטראקציות בין המעכבים לקינאזות, לא נמצאה אינטראקציה בין אף זוג חלבונים (איור 5). בבחינת האינטראקציות בין הקינאזות לפקטורי השיעתוק, נמצא כי VvABF1 עובר אינטראקציה עם כל הקינאזות מלבד VvSnRK2.6.

דיון ומסקנות

ריצוף גנום הגפן [26] מהווה כלי חשוב מאוד בלימוד תפקוד גנים. במחקר זה השתמשנו במאגרי המידע של גנום הגפן על מנת לאתר את הגנים המשתתפים בהעברת סיגנל החומצה האבסיסית. על פי רצפי הגנים בארבידופסיס, אותרו בגנום הגפן 8 רצפטורים, 3 מעכבים, 6 קינאזות ושני פקטורי שיעתוק. רמת ביטויים של גנים אלו והאינטראקציות בניהם אופיינו במחקר זה. נמצא שהרצפטורים לחומצה אבסיסית ספציפיים לרקמה ואילו המעכבים מראים ספציפיות לעקה. בנוסף נמצאה אינטראקציה תלויה ABA בין 5 רצפטורים למעכב VvPP2C2. מעכב זה על פי יכולת האינטראקציה שלו ועל פי רמת ביטויו בצמחי בקורת ובצמחים מטופלים ביובש או בחומצה אבסיסית, נראה כבעל התפקיד המרכזי בהעברת סיגנל ה-ABA בגפן. במשפחת הרצפטורים נראה כי 3-5 רצפטורים משתתפים בהעברת הסיגנל. חמישה מתוך ששת הקינאזות ופקטור שיעתוק אחד הראו אינטראקציה ונראים כמשתתפים נוספים בתהליך העברת סיגנל החומצה האבסיסית. למרבית ההפתעה, לא נתקבלה אינטראקציה בין מעכב לקינאז. אינטראקציות אלו אותרו בארבידופסיס בעזרת Yeast two hybrid, אך לא בגפן. אפשרות אחת להסבר תוצאה זו היא כי הבחינה במחקר הנוכחי נעשתה *in*

in vivo, אך במחקר *in vivo* יתכן וחלבונים אלו יראו אינטראקציה. אפשרות זו נבחנת בימים אלו על ידי שימוש בתרבית תאי גפן שאליה הוחדר פלסמיד ביטוי המבטא ביתר את החלבון SnRK2.5 עם תג בצד הקרבוקסילי שלו. בעזרת הרצה ב-MS אנו מתכננים לאתר את החלבונים שעוברים אינטראקציה *in vivo* עם חלבון זה בתאי ביקורת ובתאים שנחשפו ל-ABA. אפשרות נוספת להסבר חוסר האינטראקציה בין הקינאז והמעכב, היא כי בניגוד בארבידופסיס, בגפן מודל העברת סיגנל החומצה האבסיסית שונה וקיים חלבון מקשר בין הקינאז למעכב. על פי אפשרות זו ניסינו להציע מודל להעברת סיגנל החומצה האבסיסית בגפן. בהיעדר ABA, המעכב VvPP2C2 נקשר לחלבון מסויים שקשור לקינאז ומעכבו. כאשר מולקולת ABA נקלטת על ידי הרצפטור VvABAREC1/3/4/5/7, הרצפטור משנה את צורתו ובעקבות כך עובר אינטראקציה עם המעכב VvPP2C2 ועם החלבון הנוסף. קשירת המעכב לרצפטור משחררת את הקינאז והוא יכול לאקטב את עצמו על ידי זרחון עצמי ובהמשך להפעיל את פקטור השיעתוק VvABF1 על ידי זרחונו שגורם לקשירת פקטור השיעתוק לפרומוטרים ספציפיים ושיעתוק של גנים רבים המשתתפים בתגובה ליובש ולחומצה אבסיסית (איור 7).

יישום תוצאות המחקר, הבעיות שנתרו לפתרון והמשך המחקר

מחקר זה הינו מחקר תשתיתי לטווח רחוק. לפיכך יש להמשיך לחקור את הנושא ולאחר לימוד וצבירת ידע על הבסיס המולקולארי לתגובת הצמח ליובש, ניתן יהיה לפתח יישומים חקלאיים שיעזרו בחיסכון במים בחקלאות עצי פרי. מחקר זה אושר לשנה בלבד ולפיכך הינו חלקי בלבד. תוצאות המחקר עד כה רבות ומעניינות מאוד ונותנות נקודת פתיחה מצוינת להבנת תגובת עצי פרי ליובש ברמה המולקולארי. יש להמשיך ולחקור את משפחות הגנים השונות ולבחון את השחקנים המרכזיים בכל משפחה. זאת על ידי העמקה בתפקוד הגנים ואיתור משתתפים נוספים כגון תעלות יונים בפיוניות (SLAC1) שמופעלות על ידי SnRK2 בתגובה לחומצה אבסיסית ואחראיות לסגירת פיוניות. יש לבדוק הבדלים בין זנים ברמת הביטוי וברמת הרצף של גנים אלו ולנסות לאתר סמנים לתגובה מהירה ליובש.

פרסומים מדעיים של המחקר

בכנס על עקות אביוטיות שהתקיים בינואר 2011 בקולורדו הוצג פוסטר על מחקר זה:

Uri Boneh, Iris Biton and Giora Ben-Ari (2011) The grape ABA signaling. In: Plant abiotic stress tolerance mechanisms, water and global agriculture. Keystone, Colorado, USA.

לפני חודש, נשלח המאמר הבא ל-Plant molecular biology. כעת המאמר עובר Review.
Uri Boneh, Iris Biton, Chuanlin Zheng, Amnon Schwartz and Giora Ben-Ari (2011) Characterization of the ABA perception mechanism in *Vitis vinifera*. Submitted to *Plant Molecular Biology*.

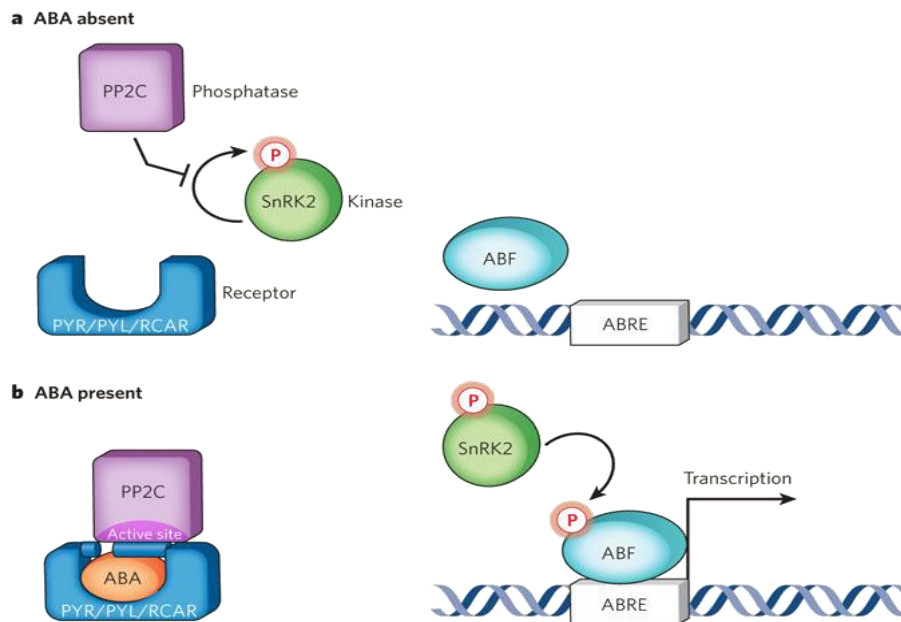
פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח ללא הגבלה.

- .1 Tuberosa, R., et al., *Improving water use efficiency in Mediterranean agriculture: what limits the adoption of new technologies?* Annals of Applied Biology, 2007. **150**(2): p. 157-162.
- .2 Monneveux, P. and E. Belhassen, *The diversity of drought adaptation in the wide.* Plant Growth Regulation, 1996. **20**(2): p. 85-92.
- .3 Pou, A., et al., *Adjustments of water use efficiency by stomatal regulation during drought and recovery in the drought-adapted Vitis hybrid Richter-110 (V. berlandieri x V. rupestris).* Physiol Plant, 2008. **134**(2): p. 313-23.
- .4 Schachtman, D.P. and J.Q. Goodger, *Chemical root to shoot signaling under drought.* Trends Plant Sci, 2008. **13**(6): p. 281-7.
- .5 Goodger, J.Q., et al., *Relationships between xylem sap constituents and leaf conductance of well-watered and water-stressed maize across three xylem sap sampling techniques.* J Exp Bot, 2005. **56**(419): p. 2389-400.
- .6 Christmann, A., et al., *A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage.* Plant J, 2007. **52**(1): p. 167-74.
- .7 Sauter, A., W.J. Davies, and W. Hartung, *The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from root to shoot.* J Exp Bot, 2001. **52**(363): p. 1991-7.
- .8 Neumann, P.M., *Coping mechanisms for crop plants in drought-prone environments.* Ann Bot (Lond), 2008. **101**(7): p. 901-7.
- .9 Tal, M., *Abnormal Stomatal Behavior in Wilty Mutants of Tomato.* Plant Physiol, 1966. **41**(8): p. 1387-1391.
- .10 Schroeder, J.I., J.M. Kwak, and G.J. Allen, *Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants.* Nature, 2001. **410**(6826): p. 327-30.
- .11 Zalejski, C., et al., *Diacylglycerol pyrophosphate is a second messenger of abscisic acid signaling in Arabidopsis thaliana suspension cells.* Plant J, 2005. **42**(2): p. 145-52.
- .12 Yamaguchi-Shinozaki, K. and K. Shinozaki, *Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses.* Annu Rev Plant Biol, 2006. **57**: p. 781-803.
- .13 Sirichandra, C., et al., *The guard cell as a single-cell model towards understanding drought tolerance and abscisic acid action.* J Exp Bot, 2009. **60**(5): p. 1439-63.
- .14 Wang, P. and C.P. Song, *Guard-cell signalling for hydrogen peroxide and abscisic acid.* New Phytol, 2008. **178**(4): p. 703-18.
- .15 Ramanjulu ,S. and D. Bartels, *Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants.* Plant Cell Environ, 2002. **25**(2): p. 141-151.
- .16 Shinozaki, K. and K. Yamaguchi-Shinozaki, *Gene networks involved in drought stress response and tolerance.* J Exp Bot, 2007. **58**(2): p. 221-7.
- .17 Matsui, A., et al., *Arabidopsis transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array.* Plant Cell Physiol, 2008. **49**(8): p. 1135-49.
- .18 Liu, X., et al., *A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid.* Science, 2007. **315**(5819): p. 1712-6.
- .19 Ma, Y., et al., *Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors.* Science, 2009. **324**(5930): p. 1064-8.

- .20 Park, S.Y., et al., *Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins*. *Science*, 2009. **324**(5930): p. 1068-71.
- .21 Razem, F.A., et al., *The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor*. *Nature*, 2006. **439**(707) : (4p. 290-4.
- .22 Shen, Y.Y., et al., *The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor*. *Nature*, 2006. **443**(7113): p. 823-6.
- .23 Sheard, L.B. and N. Zheng, *Plant biology: Signal advance for abscisic acid*. *Nature*, 2009. **462**(7273): p. 575-576.
- .24 Umezawa, T., et al., *Molecular Basis of the Core Regulatory Network in ABA Responses: Sensing, Signaling and Transport*. *Plant and Cell Physiology*, 2010. **51**(11): p. 1821-1839.
- .25 Alícia, P., et al., *Adjustments of water use efficiency by stomatal regulation during drought and recovery in the drought-adapted Vitis hybrid Richter-110 (V. berlandieri × V. rupestris)*. *Physiologia Plantarum*, 2008. **134**(2): p. 313-323.
- .26 Jaillon, O., et al., *The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla*. *Nature*, 2007. **449**(7161): p. 463-7.

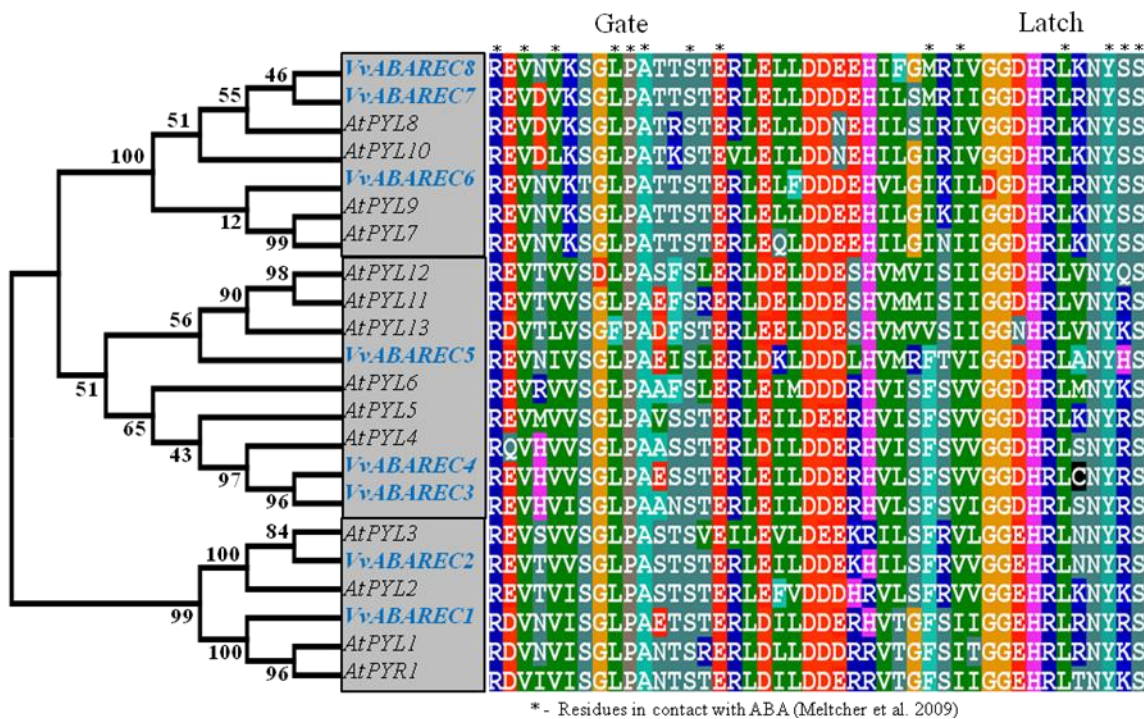
- איור 1: מודל קליטת סיגנל ABA בארבידופסיס [23]. a. בהיעדר ABA, PP2C מעכב את פעילות SnRK2. a. כאשר ABA מתווסף למערכת.
- איור 2: עץ פילוגנטי והשוואת רצפי הארבידופסיס והגפן של רצפטורים לחומצה אבסיסית (א), מעכבים (ב), קינאזות (ג) ופקטורי שיעתוק (ד).
- איור 3: רמת ביטוי יחסי שנמדדה ב- RT-PCR לכלל הגנים בעלים ובשורשים לאחר 6 שעות של הטיפול הבאים: A – ריסוס בחומצה אבסיסית; D – טיפול יובש; N – עקת מלח; C – השריה בקור (4C). רמת הביטוי היחסי מוצגת בסקאלה מאדום – עליה ברמת הביטוי, לירוק – ירידה בביטוי. מימין מוצגת רמת הביטוי של הרצפטורים והמעכבים בעלים ושורשים של צמחי ביקורת, בסקאלה מכחול – ביטוי גבוה, לצהוב – ביטוי נמוך.
- איור 4: בחינת אינטראקציה בין הרצפטורים למעכבים (yeast two hybrid) עם וללא חומצה אבסיסית על גבי צלחות (א) ושימוש בסמן ההיסטידין שנוצר רק כאשר יש אינטראקציה, או בנוזל (ב) ושימוש בסמן LacZ.
- איור 5: בחינת אינטראקציה בין המעכבים לקינאזות (yeast two hybrid) על גבי צלחות.
- איור 6: בחינת אינטראקציה בין הקינאזות לפקטורי השעתוק (yeast two hybrid) על גבי צלחות (א) ושימוש בסמן ההיסטידין שנוצר רק כאשר יש אינטראקציה, או בנוזל (ב) ושימוש בסמן LacZ.
- איור 7: מודל מוצע למעבר האותות של סיגנל החומצה האבסיסית בגפן.

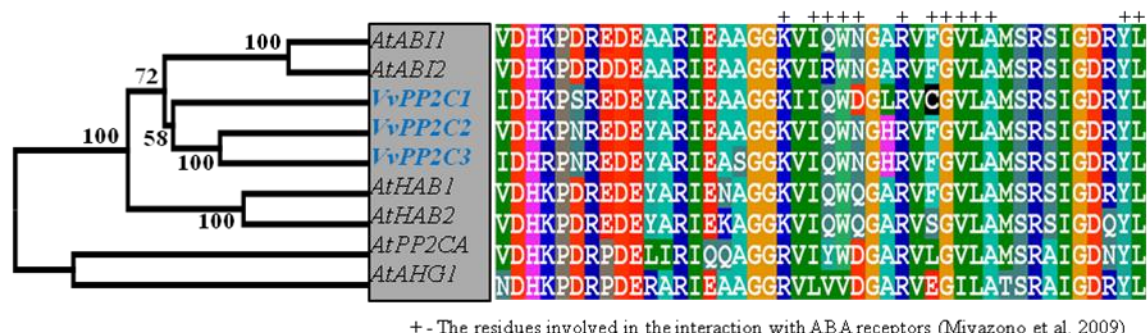
איור 1:



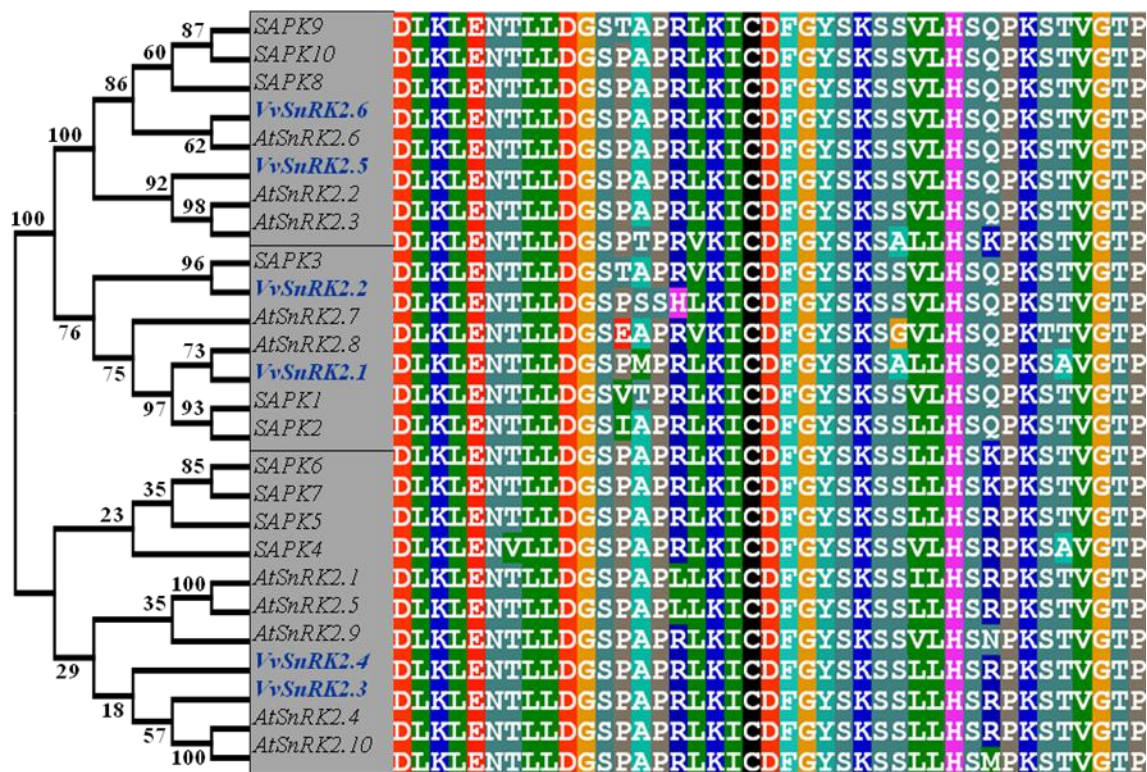
איור 2:

א.



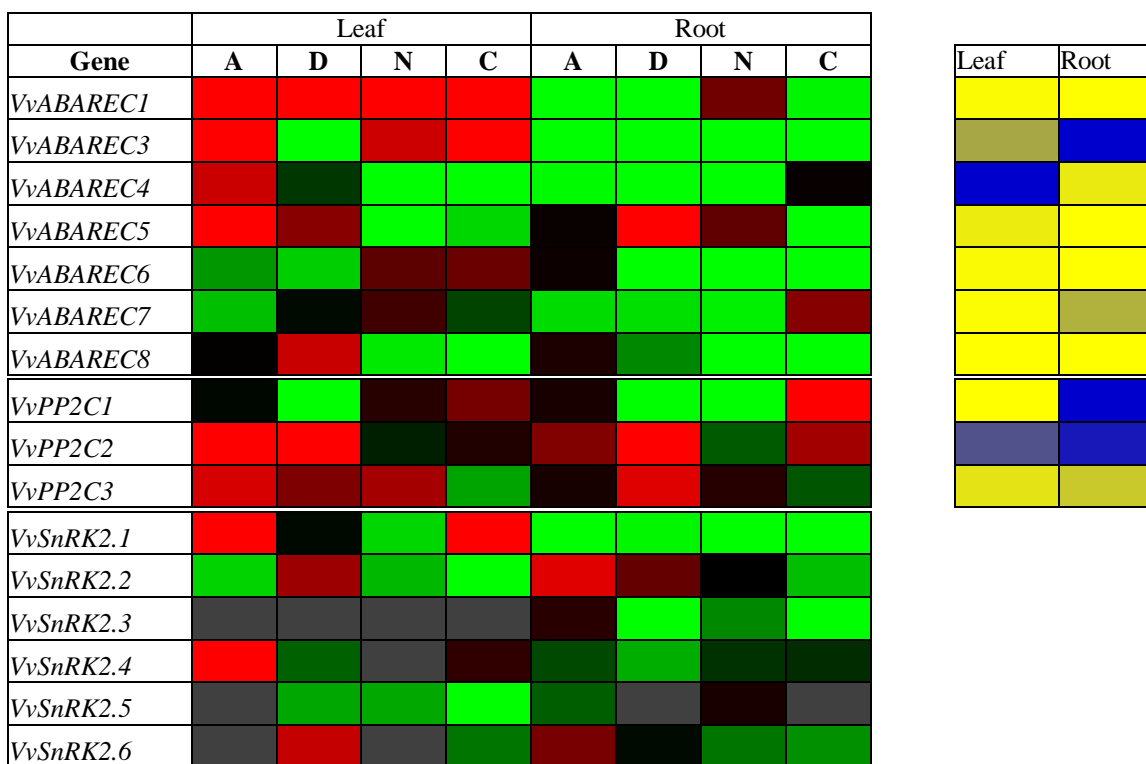


+ - The residues involved in the interaction with ABA receptors (Miyazono et al. 2009)



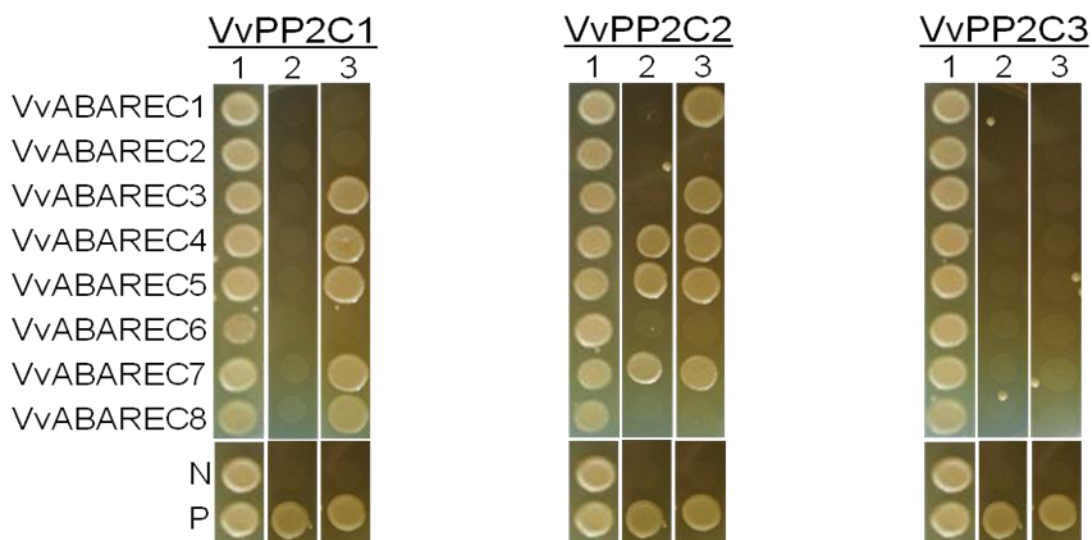
The basic region is in a thick line and the leucine repeats marked with arrowheads (Choi et al., 2000).

איור 3:

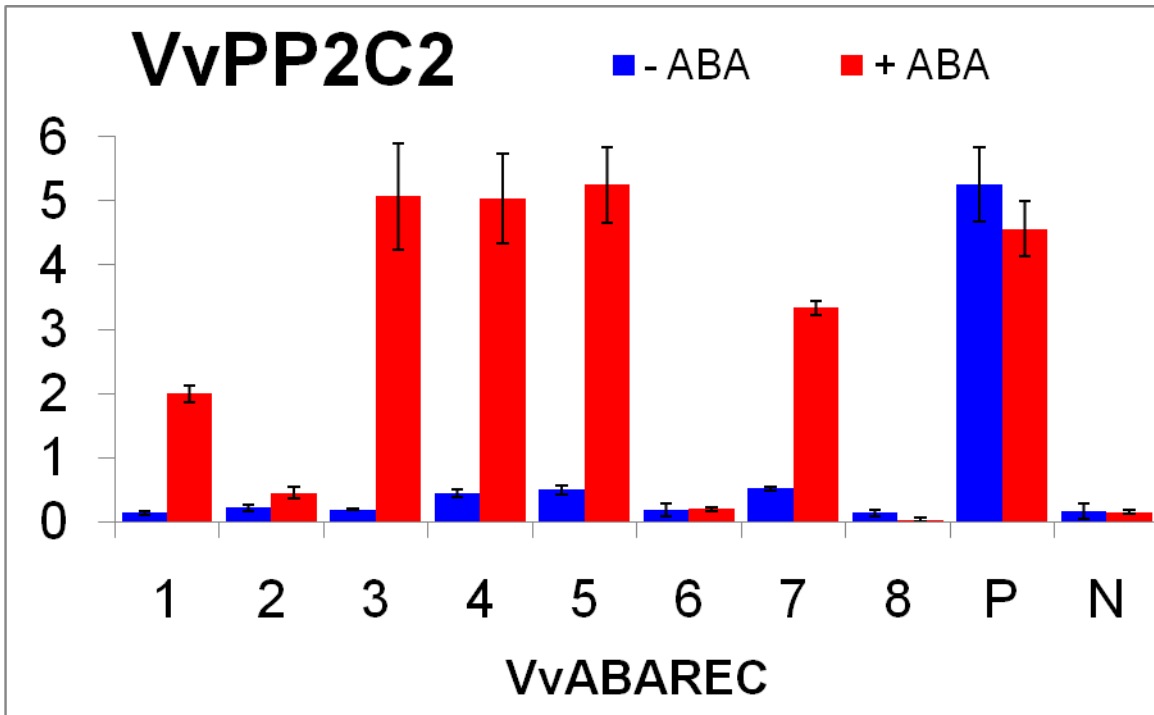
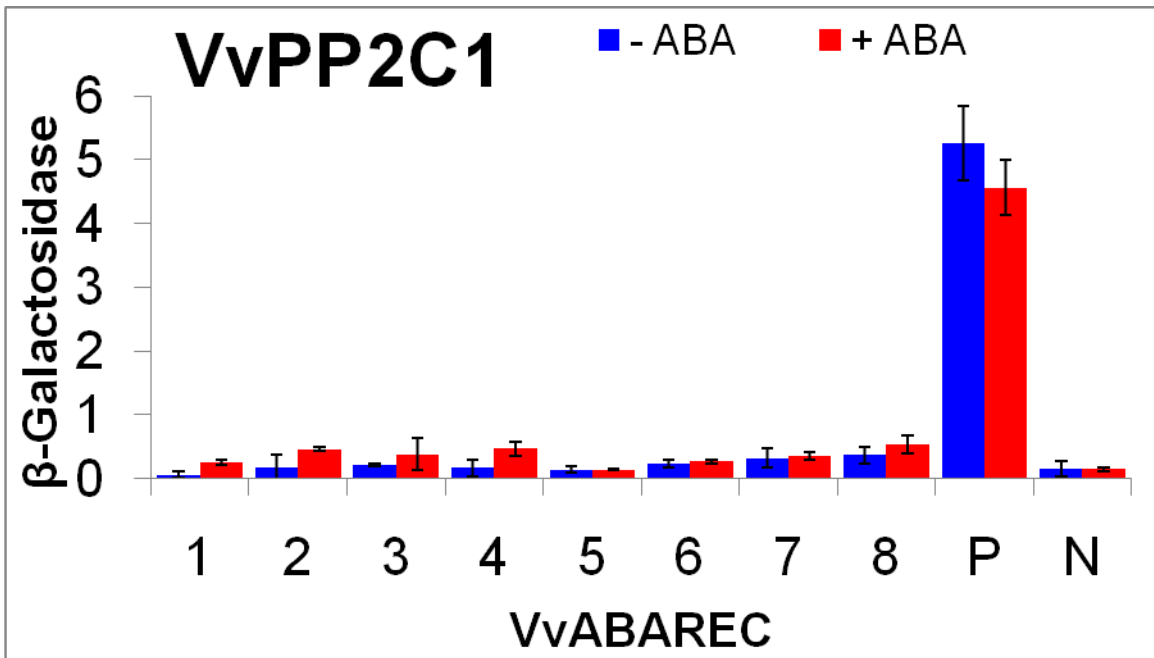


איור 4:

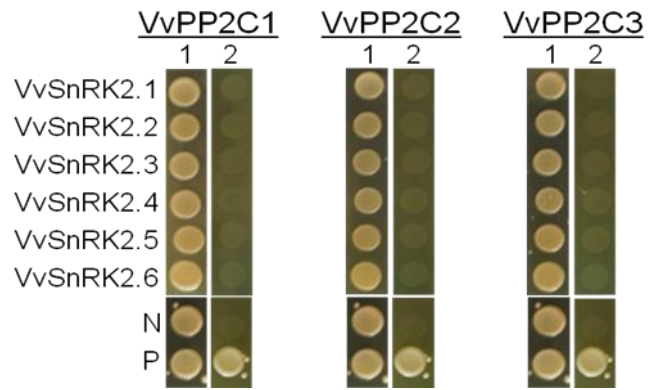
א.



1: *trp; leu* 2: *trp; leu; his* +5mM 3AT 3: *trp; leu; his* +5mM 3AT + 100µM (±)ABA

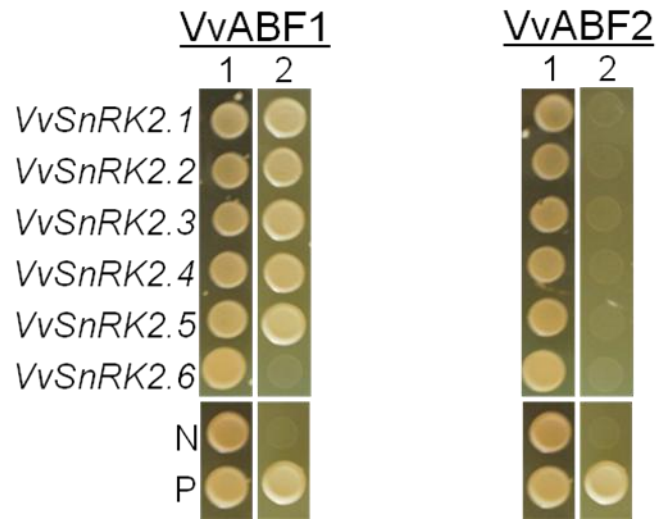


איור 5:

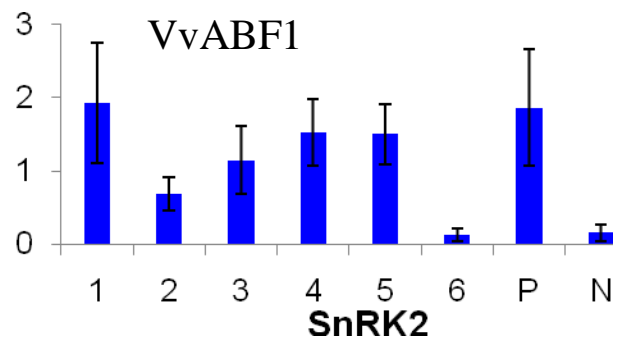


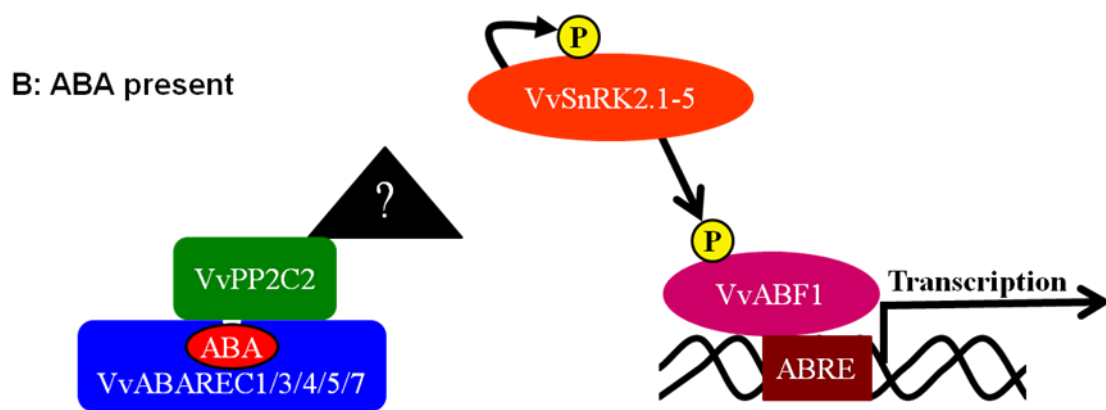
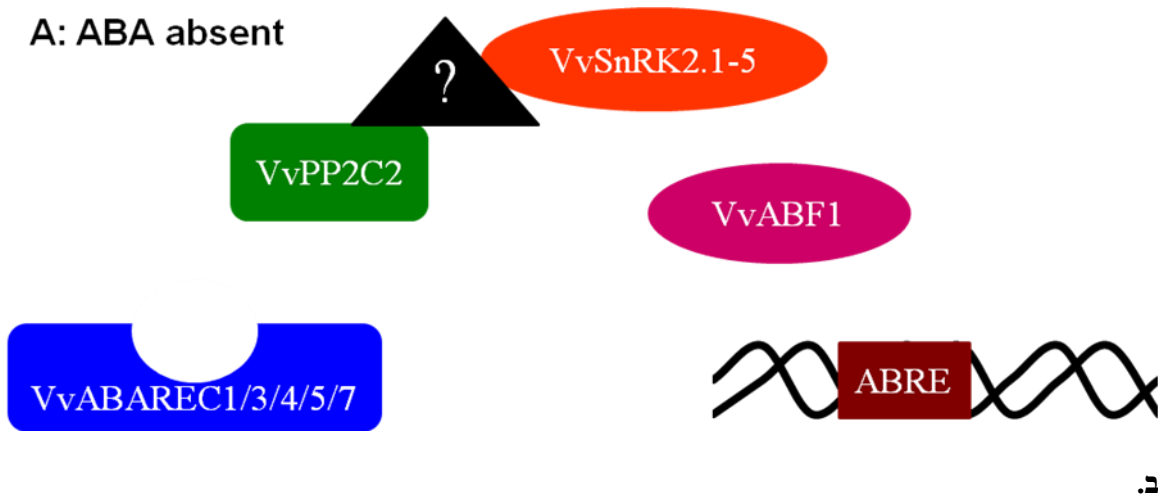
איור 6:

א.



ב.





סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס לכל השאלות בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).

שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.

הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.

| |
|--|
| <p>מטרת המחקר הנוכחי הינה הבנת הבסיס המולקולרי למנגנון הפיזיולוגי המשתתף בתגובה לעקת יובש, על ידי איתור ולימוד "רשתות ההפעלה" במעבר האותות של היובש. בעקבות הממצאים שפורסמו לאחרונה וזיהוי מעבר האותות המלא בקליטת החומצה האבסיסית, החל מהקולטן וכלה בפקטור השעתוק, החלטנו להתמקד במעבר אותות זה. תוך שימוש בידע הרב שנרכש מלימוד קליטת החומצה האבסיסית בארבידופסיס, אפיינו את קליטת ה ABA בגפן.</p> |
| <p>עיקרי הניסויים והתוצאות.</p> |
| <p>תוך שימוש במאגרי מידע והשוואת רצפי הגנים בארבידופסיס לגנום הגפן, בודדנו שמונה רצפטורים, 3 מעכבים, 6 קינאזות ו- 2 פקטורי שעתוק מגנום הגפן.</p> |
| <p>תבנית הביטוי של גנים אלו אופיינה בייחורי גפן שנחשפו לעקות אביוטיות שונות.</p> |
| <p>האינטראקציה בין החלבונים המשתתפים במעבר סיגנל נבחנה ונמצאו מספר גדול של צמדי חלבונים שעוברים אינטראקציה. חלק מהאינטראקציות נמצאו כתלויות בנוכחות ABA.</p> |
| <p>מסקנות מדעיות והשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?</p> |
| <p>הוצע מודל להעברת סיגנל ה- ABA בגפן אשר שונה מהארבידופסיס (הצמח היחידי שבו המעבר פוענח במלואו).</p> |
| <p>הונחה תשתית מחקרית להמשך ניסויים אשר יאפיינו את הגנים החשובים ביותר בתהליך זה.</p> |
| <p>מטרות המחקר הושגו באופן חלקי מכיוון שמחקר זה אושר לשנה אחת בלבד ותוכנן לשלוש שנים.</p> |
| <p>בעיות שונות לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנותרה לביצוע תוכנית המחקר?</p> |
| <p>החלק שנותר הוא איתור גנים מרכזיים ספציפיים מתוך כלל הגנים המשתתפים, אשר מניפולציה בהם תאפשר יישום חקלאי.</p> |
| <p>עקב ההצלחה וקבלת מספר רב של תוצאות מעניינות בשנה הראשונה, המחקר ממשיך כעת ללא מימון.</p> |
| <p>הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטוט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פוטנטים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.</p> |
| <p>Uri Boneh, Iris Biton and Giora Ben-Ari (2011) The grape ABA signaling. In: Plant abiotic stress tolerance mechanisms, water and global agriculture. Keystone, Colorado, USA (Poster).</p> |
| <p>Uri Boneh, Iris Biton, Chuanlin Zheng, Amnon Schwartz and Giora Ben-Ari (2011) Characterization of the ABA perception mechanism in <i>Vitis vinifera</i>. Submitted to <i>Plant Molecular Biology</i> (Under review).</p> |
| <p>פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)</p> |
| <p>רק בספריות <</p> |
| <p>ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) <</p> |
| <p>חסוי – לא לפרסם <</p> |