

דו"ח לתכנית מחקר מספר 857-0549-08

חקר בקרת המטבוליזם של SO<sub>2</sub>/סולפיט בצמח ויישומו בהגנת הצומח ולהארכת חיי מדף

Sulfite Oxidase: A New Technological Tool for Improved Crop Protection and Shelf Life

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ולהנהלת ענף הירקות

ע"י

המכון לביטכנולוגיה של אזורים צחיחים, אוניברסיטת בן גוריון  
המחלקה למדעי הצמח, מכון ויצמן  
המחלקה למדעי הצמח, מכון ויצמן  
המחלקה לאיחסון, מכון וולקני  
המחלקה לפיתופתולוגיה, מכון וולקני

משה שגיא  
רוברט פלור  
אסף אהרוני  
אמנון ליכטר  
יגאל אלעד

Moshe Sagi, The Institute for Desert Research, Ben Gurion University, POB 653, Beer Sheva  
84105, Israel, email: [gizi@bgu.ac.il](mailto:gizi@bgu.ac.il)

Robert Fluhr, Department of Plant Science, Weizmann Institute of Science, POB 26, Rehovot  
76100, Israel, email:

Assaf Aharoni, Department of Plant Science, Weizmann Institute of Science, POB 26, Rehovot  
76100, Israel, email:

Amnon Lichter, Institute of Technology and Storage of Agricultural Products, Dept. of Postharvest  
Science of Fresh Produce, Agricultural Research Organization, The Volcani Center, POB 6, Bet  
Dagan 50250, Israel, email:

Yigal Elad, Dept of Plant Pathology and Weed Research, Agricultural Research Organization, The  
Volcani Center, POB 6, Bet Dagan 50250, Israel, email:

יוני 2011

תמוז תש"ע

האם הנך מאשר את ציון הפסקה הבאה בדף הפתיחה לדו"ח כן/לא מחק את המיותר\*  
הממצאים בדו"ח זה הנם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים



\* חתימת החוקר

רשימת פרסומים: אין!

## 1. תקציר

אחסון עגבנייה לאחר הקטיף מתבסס על קירור בטמפר' נמוכה (12 מ"צ) כאשר כל פציעה מוקדמת או נוכחות של גורמי מחלות עלול לגרום לרקבונות בפירות הנמצאים באריזה. שימוש בגפרית דו-חמצנית (גד"ח,  $SO_2$ ) רווח בייצור ענבים למניעת גידול פתוגנים בזמן האחסון והמשלוח. השימוש אינו נפוץ בירקות ובפירות אחרים כולל עגבנייה. פיתוח טיפול בגד"ח ללא גרימת נזק לאשכולות פרי העגבנייה מצד אחד ומניעת נזקי אחסון מצד שני הינו בעלת משמעות כלכלית רבה לקידום הענף.

קיימים מספר תוצרי גנים שגד"ח (סולפיט) משמש עבורם כסובסטרט והם בעיקרם סולפיט אוקסידאז (SO), סולפיט רדוקטאז (SiR) וייתכן שגם SQD1 הממוקם בכלורופלאסט ו-MST1 ו-MST2 הממוקמים במיטוכונדריה ובציטוזול בהתאמה. תגובתם של תוצרי הגנים הנ"ל ובמיוחד SiR ביחד עם SO בפרי העגבנייה לא נחקרה די הצורך והינה בבסיס עבודת מחקר זו. מוצע מחקר שמטרתו להגביר את יעילות השימוש בגד"ח כחומר למניעת התפתחות מחלות באחסון העגבנייה כמודל לשימוש בפירות וירקות אחרים. המטרות הספציפיות של המחקר הינן: 1. אופטימיזציה של ביטוי SO בפרי העגבנייה בתגובה לחשיפה לגד"ח (היפוטיות העבודה היא שביטוי יתר של SO ינטרל סולפיט באשכולות וימנע נזק ברקמות). 2. להשפיע על יכולת הנטרול של סולפיט באשכול כדי להקנות הגנה מנזקי סולפיט (היפוטיות העבודה שלנו היא שהגברת ביטוי גנים נוספים ל-SO, כדוגמת סולפיט רדוקטאז (SiR), המנטרלים סולפיט יפחיתו נזקי ותכולת סולפיט ברקמות). 3. קביעת מטבוליטים שהינם תוצאה של טיפולים בגד"ח בעגבנייה.

בשנה הראשונה ייצרנו צמחים נוספים המבטאים את SO ביתר כך שלהמשך הניסויים יש לנו מספר קווים מספק. הדגמנו את הפוטנציאל של שימוש בגד"ח (גפרית דו חמצנית) למניעת התפשטות מחלות פטרייתיות (הודגם באנתרקנוז) ואת חשיבות הביטוי של גנים (בחלקי הצמח הנמכר) אשר תוצריהם יכולים לנטרל סולפיט (הודגם ב-SO). שיבטנו גנים נוספים (SiR, MST1, MST2 ו-SQD1) שייתכן ומשתתפים בניטרול גד"ח (סולפיט), וייצרנו קונסטרוקטים מתאימים לביטוי ביתר ולהשתקת הגנים הנ"ל בעגבנייה. התחלנו לייצר צמחים טרנסגנים לגנים אלה.

בשנה השנייה ייצרנו צמחים המבטאים את SiR ביתר ובחסר לבחינת ניטרול  $SO_2$ . אחרי תהליך של סלקציה קיבלנו מספר צמחים הומוזיגוטים שונים שמבטים ביתר את הגן SiR. הדגמנו באמצעות הפטרייה הפתוגנית בוטריטיס את פוטנציאל השימוש ב- $SO_2$  למניעת התפשטות מחלות אחסון. בנוסף הראנו את החשיבות לביטוי של גנים המנטרלים סולפיט (הודגם ב-SO) בחלקי הצמח הנמכר: פרות בודדים ובאשכולות. בדקנו את ההשפעה של טיפול ב- $SO_2$  על נזק ברקמות הפרי ושאריות סולפיט ומטבוליטים הקשורים להבשלה תקינה. כיללנו את ריכוז  $SO_2$  באידוי למניעת מחלות אחסון מצד אחד והופעת נזק באשכול (בעיקר בעלי הגביע) מצד שני.

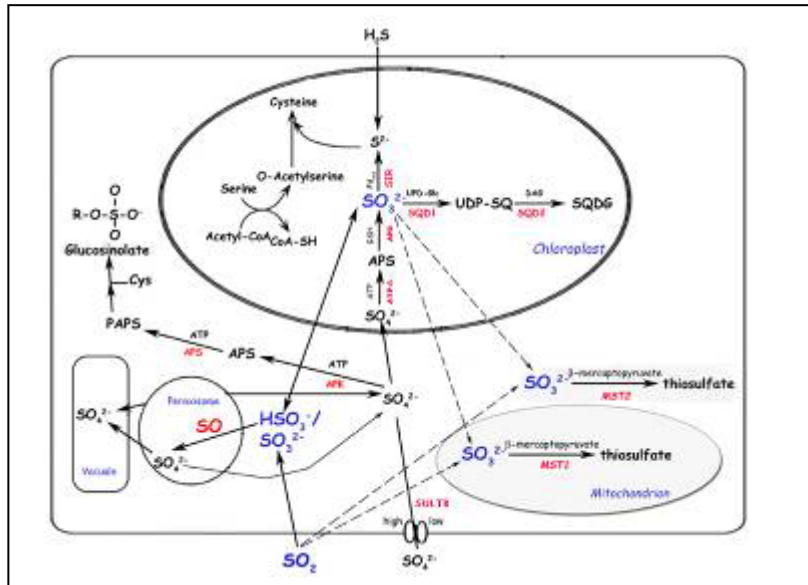
בשנה השלישית למחקר המשכנו באפיון של הקווים הומוזיגוטים של SiR OE ובסלקציה לקבלת קווים הומוזיגוטים עבור SiR Ri בו היה קושי בגלל לטאליות של הנבטים ההומוזיגוטיים. הצלמחנו לבסוף הצלחנו לקיים 2 קווים נפרדים-אחד הומוזיגוטי ואחר הטרואיגוטי בריבוי וגטטיבי. הצלחנו ליצר זרעים פוריים מ-3 קווים נפרדים שמבטאים ביתר את הגן SiR, כך שמאפשר לנו המשך למחקר להשוואת טיפול פירות ואשכולות בגד"ח שמבטאים כול אחד גן שונה ביתר ששניהם מסוגלים לנטרל סולפיט. את היכולת לנטרול סולפיט הדגמנו בשלב זה בניסויים של דיסקיות עלים. את הפוטנציאל להשמדת מחלת אכסון כגון בוטריטיס ואת היתרון לביטוי יתר של גנים מנטרלים סולפיט הצגנו בניסוי עלים שהודגר עם פיסות פלסטיק שמשחררים  $SO_2$  באיטיות. התחלנו בייצור צמחים טרנסגנים 1-2 MST ו-SQD1. מבחינה מדעית הוכחנו והצגנו מערכת גנים הפועלים יחד לניטרול סולפיט באופן בו מתגברת פעילותם של SO SIR SO2 SQD1-2 MST1 המנצלים סולפיט ומופחתת פעילותם של APR 3 שונים הפועלים להגברת סולפיט (ראה בניספח 7 ו- A Figure 8 באפנדיקס כמו גם (Supplemental 11).

## 2. מבוא

נגזרות סולפיט עלולות להזיק לבריאות האדם, אך למרות עובדה זו, מתקיים בהם שימוש רב בטכנולוגיות מזון ובחקלאות בעיקר לעיכוב גדילת חיידקים ומניעת השחמת מוצרי מזון. בייצור ענבים למשל, מתקיים שימוש בנידוף גפרית דו חמצנית (גד"ח) למניעת גידול פתוגנים בזמן האחסון והמשלוח (Winkler and Clary et al., 2005; Jacob, 1925). סולפיט גם מוכנס ליון, פירות וירקות יבשים לעיכוב ומניעת איבוד צבע והשחמה כתוצאה מפעילות פוליפנול אוקסידאז (ע"י עיכובו) (Ribereau-Gayon et al., 1999). מאחר ושיעור ניכר מהאוכלוסייה מגלים רגישות לתרכובות המכילות סולפיט כתוצאה מטיפול בגד"ח, השימוש בגד"ח הינו תחת פיקוח ובארה"ב אריזות מזון המכילות מעל 10 חלקי מליון (ח"מ) חייבות בסימון התכולה (Anonymous 1986, 1989). הרבה פרות וירקות מגלים רגישות ליישום גד"ח בנידוף למניעת פתוגנים ומצד שני מתקיים מאמץ מחקרי רב למציאת התנאים והחומרים עמם מתאפשר ביעילות אחסון ממושך. אחסון פרי העגבנייה לאחר הקטיף מתבסס על קירור בטמפ' נמוכה (12 מ"צ) כאשר כל פגיעה מוקדמת או נוכחות של מידבק עלול לגרום לרקבונות בפרות הנמצאים בקרבה. מצד שני העוקץ ומצעת הפרי מגלים רגישות לטיפול בגד"ח. פיתוח טיפול בגד"ח ללא גרימת נזק בפרי העגבנייה מצד אחד ומניעת נזקי אחסון מצד שני הינו בעלת משמעות כלכלית רבה לקידום הענף.

### פרוק סולפיט

לאחרונה הדגמנו באמצעות שיבוט הגן, סולפיט אוקסידאז (SO; Sulfite oxidase) בארבידופסיס, שהאנזים SO אחראי לחימצון התרכובת הרעילה, סולפיט והפיכתה לסולפאט שאיננו רעיל. בתנאים רגילים, הצמח מכיל את האנזים ברמה המאפשרת לו לנטרל את כמות הסולפיט הנוצרת, ככל הנראה, במהלך פרוק ח' אמינו המכילות גפרית [ציסטאין ומתיונין] (Hansch and Mendel, 2005). באמצעות שינויים ברמת ה-SO הדגמנו בצמחי ארבידופסיס המהונדסים תחת הבקרה של המקדם הקונסטיטוטיבי, 35S, שצמחים בהם הוגברה רמת האנזים, גילו עמידות לאידוי בריכוז גבוה של SO<sub>2</sub> או סולפיט, בעוד שצמחים בהם שונה הגנום כך שהאנזים SO כלל לא סונתז, גילו רגישות ל-SO<sub>2</sub> או לסולפיט בהשוואה לטיפוס הבר (Brychkova et al., 2007). יתר על כן, צמחים עם ביטוי יתר של SO צברו יותר סולפאט (תוצר של חימצון סולפיט) בהשוואה לביקורת והעלים לא נפגעו (לא נמצא נקרוזיס בעלים) לאחר אידוי ב-SO<sub>2</sub>, בעוד שבצמחים בהם הושתק ביטוי של האנזים לא נצבר יותר סולפאט בהשוואה לביקורת טיפוס הבר והעלים נפגעו. SO איננו המערכת היחידה המנטרלת סולפיט. קיימים לפחות 4 תוצרי גנים שיתכן וסולפיט משמש עבורם כסובסטרט והם סולפיט רדוקטאז (SiR) ו-SQD1 הממוקמים בכלורופלאסט ו-MST1 ו-MST2 הממוקמים במיטוכונדריה ובציטוזול בהתאמה (ראה איור 1). הדגמנו שלפחות ברמת ה-RNA, SiR ו-SO בארבידופסיס, עשויים לפעול יחד כדי לנטרל סולפיט, כך ש-SiR יכול לעבור התאמה לפי רמת הסולפיט בעוד SO מתפקד במערכת זו כבקר ביטחון עבור עודף סולפיט (Brychkova et al., 2007). תגובתם של תוצרי הגנים הנ"ל ובמיוחד SiR ביחד עם SO בעגבנייה לא נחקרה די הצורך ולכן נמצא בבסיס עבודת המחקר הנוכחי.



**Figure 1. Sulfur assimilatory metabolism and subcellular distribution in plant cells.** For assimilation into cysteine, sulfate enters the cell via high and low-affinity sulfate transporters (SULTR) and is then transported into plastids and activated by adenylation to adenosine 5' phosphosulfate (APS) in a reaction catalyzed by ATP sulfurylase (ATPS; EC 2.7.7.4). APS is reduced to sulfite by APS reductase (APR; EC 1.8.4.9); the electrons are derived from glutathione. Sulfite is further reduced by a ferredoxin dependent sulfite reductase (SiR; EC 1.8.7.1) to sulfide, which is incorporated by O-acetylserine (thiol)lyase (OASTL; 2.5.1.47) into the amino acid skeleton of O-acetylserine (OAS) to form cysteine. (Leustek et al., 2000; Kopriva and Koprivova, 2004a; Kopriva, 2006). The intermediate of the sulfate assimilation pathway, sulfite, can be metabolized in plant chloroplasts into a sulfolipid head group precursor catalyzed by SQD1 and SQD2. Sulfolipids are essential in maintaining the balance of thylakoid membrane charge (Sanda et al., 2001). Sulfite oxidase (SO), an enzyme oxidizing sulfite to sulfate, was detected in *Arabidopsis* peroxisomes (Eilers et al., 2001; Nowak et al., 2004) that are localized in the vicinity of the chloroplasts in the cell (Hansch and Mendel, 2005). Cytosolic and mitochondrial sulfite may be converted via the mitochondrion and cytosol-localized  $\beta$ -mercaptopyruvate sulfurtransferases, (MST1 and MST2, respectively) that catalyze the synthesis of thiosulfate in the presence of  $\beta$ -mercaptopyruvate and sulfite (Papenbrock and Schmidt, 2000b; Tsakraklides et al., 2002). **Sulfite in the cytosol and organelles may originate from the chloroplast and/or as  $\text{SO}_2$  that enters the plants via their stomata and hydrates to sulfite ions,  $\text{HSO}_3^-$  and  $\text{SO}_3^{2-}$ .** **Metabolites:** APS, adenosine 5'-phosphosulfate; GSH, reduced glutathione; PAPS, 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (3'-phosphoadenylylsulfate); SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycerol; UDP-Glc, UDP-glucose; UDP-SQ, UDP-sulfoquinovose; **Cofactors:**  $\text{Fd}_{\text{red}}$ , reduced ferredoxin. **Proteins (in red):** APSK, APS kinase; APR, adenosine 5'-phosphosulfate reductase; APS, ATP sulfurylase; MST1,  $\beta$ -mercaptopyruvate sulfurtransferase 1; MST2,  $\beta$ -mercaptopyruvate sulfurtransferase 2; SIR, sulfite reductase; SO, sulfite oxidase; SQD1; SQD2; SULTR, sulfate transporter.

### 3. מטרת המחקר

מטרתנו הכללית היא להגביר את יעילות השימוש בגד"ח כחומר למניעת התפתחות מחלות באחסון העגבנייה כמודל לשימוש בפירות וירקות אחרים.

מטרתינו הספציפיות הן:

1. אופטימיזציה של ביטוי SO בעגבנייה בתגובה לחשיפה לגד"ח. היפותזת העבודה שלנו היא שביטוי יתר של SO ינטרל סולפיט באשכולות ומונע נזק ברקמות.
2. להשפיע על יכולת הנטרול של סולפיט בפרי כדי להקנות הגנה לעלי הגביע ורקמות אשכולות פרי מנזקי סולפיט. היפותזת העבודה שלנו היא שהגברת ביטוי גנים נוספים ל-SO, כדוגמת SiR, המנטרלים סולפיט יפחיתו נזקי ותכולת סולפיט ברקמות האשכולות.
3. קביעת מטבוליטים שהינם תוצאה של טיפולים בגד"ח בעגבנייה. היפותזת העבודה שלנו הינה שגרימת ומניעת נזק ברקמת האשכול כתוצאה משימוש בגד"ח יגרמו לשינוי במתכונת ביטוי הגנים וצבירת מטבוליים שהינם תוצרי אסימילציה וחימצון סולפיט.

#### 4. חמרים ושיטות

##### תנאי גידול הצמחים:

כל הצמחים ששימשו לריבוי זרעים, תאור מורפולוגי, אפיון הומוזיגוטים, קבלת רקמות הצמח לניסויים שונים גדלו בחממה טרנסגנית באוניברסיטת בן גוריון בתנאים מבוקרים של 25 מ"צ ביום ו-18 מ"צ בלילה.

בדיקת עמידות לסולפיט בדיסקיות עלים: דיסקים (קוטר 6.5 מ"מ) נלקחו מעלים שעברו אינקובציה בנוכחות 7 מילימולר סודיום סולפיט (מתואם עם חומצת כלורית 1 מולר ל-pH 6.5) על נייר סופג בצלחת פטרי למשך 36-48 שעות. אינקובציה במים מזוקקים שימשה כביקורת. בתום הניסוי צילמנו את העלים ונלקחו דוגמאות לבדיקת תכולת כלורופיל.

קביעת כלורופיל בעלים: בוצעה במבחנות אפנדורף שהכילו 500 מיקרוליטר 80% אתנול למשך 48 שעות עד למיצוי כל הצבע. התהליך התרחש בטמפרטורה 4 מ"צ בחושך. כלורופיל נמדד בספקטרופוטומטר באורך גל של 652 נ"מ. הכלורופיל חושב ככמות צבע שנשאר בדיסקיות אחרי הטיפול בהשוואה לדיסקיות ביקורת של מים מזוקקים.

ניצול היתרון של ביטוי יתר של גנים הקשורים לנטרול סולפיט בעלים של צמח עגבנייה לטיפול בפיסות פלסטיק המשחררים SO<sub>2</sub> כטיפול נגד עובש האפור בוטריטיס:

נבדקו פיסות פלסטיק שנלקחו משקיות פלסטיק עם ציפוי ב- Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> המיועדים לטיפול בענבים באיכסון בטמפרטורות נמוכות נגד עובש האפור בוטריטיס. גודל ומשקל הפיסה מהווים יחס ישר למשקל של החומר הפעיל (sodium metabisulfite 50 גר' לק"ג).

עלים צעירים של 2 קווי עגבנייה המבטאים SO ביתר (13-6/6 ו-12-5/7), שני קווי SO Ri (421 ו-131), קווי שונים שמבטאים את הגן SiR ביתר (10-5, 10-10, 3-2) וטיפוס הבר (RR) באורך של כ-5 ס"מ הונחו בצלחות פטרי בקוטר 145 מ"מ על נייר סופג לח (3 מ"ל מים מזוקקים) בסיס העלה הונח באוריינטציה כלפי היקף הצלחת. מתחת למכסה של צלחות הטיפול הודבקו פיסת פלסטיק (להלן "דפי SO<sub>2</sub>") במשקל של כ-200 מ"ג המכילים Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (תואם ל-10 מ"ג Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) למשך זמנים שונים באור ובחושך לפי הגדרת הטיפול המפורט למטה. נבגים של בוטריטיס, Bo5-10, נקצרו בתמיסה מימית אחרי כ-21 ימי גידול על מצע PDA. תמיסת ההדבקה הכילה 33mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1% גלוקוז ו-1000 נבגים למיקרוליטר. כול נקודת הדבקה בוצעה עם 5 מיקרוליטר מהתמיסה.

אחרי ההדבקה, צלחות הטיפול, הביקורת והדבקת "מוק" נסגרו היטב עם פראפילם והדגרו בטמפרטורת החדר (25 מ"צ) באור או בחושך לזמנים שונים לפי הגדרת הטיפול. בתום זמן הדגרה הוצאה פיסת הפלסטיק והצלחות נשמרו מתחת תאורה רצופה (46 מיקרו אינשטיין) 33 שעות נוספות להערכת הנזק בעלים וקוטר הליזיון שנוצר מגידול הפטרייה.

דירוג צבע בפרי: צבע הפרי נאמד וויזואלית תמיד ע"י אותו אדם לפי תרשים צבע של "מדריך כרמל לעגבניות ליצוא". קנה מידה של התרשים נע בין 1 ששווה לפרי ירוק ל-12 עבור פרי אדום.

חוזק הפרי: בדקת התנגדות נערכו במכשיר שטילון (Chatillion) במהירות של 175 מ"מ לדקה בארבעה מקומות בכל פרי. התוצאות מוצגות בערכים של ניוטון.

דליפת אלקטרוליטים (electrolyte leakage): אחרי קילוף הפרי, נלקחו בעזרת מחורר דוגמאות של המצעית מסביב אזור המרכז. הדסקיות נשקלו ועברו אינקובציה ב-15 מ"ל של מים מזוקקים למשך 30 דקות בטמפ' של 25 מ"צ על פלטה מטלטלת במהירות של 100 סיבובים לדקה. אחרי מדידה של מוליכות חשמלית (Cyberscan500con, Eutech instruments) הדוגמאות עברו הרתחה למשך 10 דקות לקבלת אלקטרוליטים כללים. התוצאות מוצגות כאחוזי האלקטרוליטים מכלל האלקטרוליטים.

פיגמנטים בפרי העגבנייה: ליקופן ובטא קרוטן מוצו ממצעית הפרי עם אצטון הקסאן (1:2) ביחס של 1:11 (w:v) עם מכתש ועלי. הצבע נקבע בספקטרופוטומטר באורכי גל 472 נ"מ ללאוקופן ו-453 נ"מ לבטא קרוטן.

קביעת סולפיט: נערך אחרי מיצוי בתמיסת 200 ח"מ חומצת אסקורבית. המיצוי בוצע בקליפה ביחס 1:8 ובמצעית הפרי ביחס 1:4 (v/w). אבחון סולפיט נעשה עם התאמות בשתי שיטות שונות: א) עם DTNB לפי שיטה של Li and Zhao, 2006 (ו-ב) לפי שיטה של Pachmayr ע"י pararosanolin-HCl.

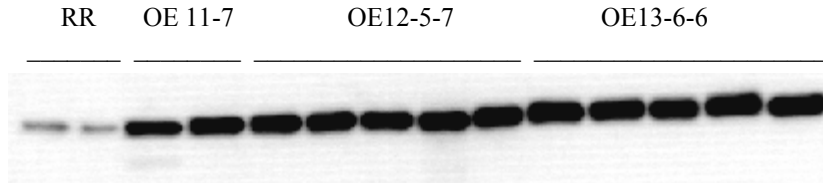
גידול והדבקה של בוטריטיס בפרי: תבדיל Bo5-10 של הפטרייה הפתוגנית בוטריטיס (עובש האפור) גדל על PDA (potato dextrose agar). נבגים נקצרו ורוכזו בתמיסה מימית. לקראת ההדבקה הנבגים הוכנסו לתמיסה שהכילה 1% גלוקוז ו-0.033M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  בריכוז 0. כל פרי הודבק ב-4 מקומות עם 5 מיקרוליטר תמיסת נבגים בריכוז של 1000 נבגים למיקרוליטר. להדבקת mock שימשה תמיסת גלוקוז ובופר פוספט בלבד, ללא נבגים. הפרי המודבק נשמר בטמפ' של 25 מ"צ ותנאי לחות גבוהה למשך 48 שעות להתפתחות המחלה לפני הטיפול ב- $\text{SO}_2$ . הפירות הושמו במכשיר ליצירה ושמירת  $\text{SO}_2$  בריכוז קבוע ונחשפו ל-10 ח"מ גדי"ח למשך מספר שעות. הפירות נבדקו 48 שעות לאחר גמר הטיפול. התפשטות המחלה נמדדה ע"י מדידת השינוי בקוטר הפציעה (ליזיון) שהופיע עקב הדבקה ואו טיפול בגדי"ח.

## 5. תוצאות ודיון

### בידוד צמחי עגבנייה נוספים המבטאים ביתר את הגן סולפיט אוקסידאז (SO)

בכדי לקבל קוים נוספים של עגבנייה המבטאים ביתר את הגן סולפיט אוקסידאז גידלנו 10-12 צמחים ( $T_1$ ) שנבטו מזרעי אם ( $T_0$ ) שעברו טרנספורמציה כמתואר בעבר (Brychkova et al., 2007) /ליצור זרעים נוספים שלאחר נביטה רוססו בקנמיצין. צמחי  $T_2$  שגילו כולם עמידות לקנמיצין (6 ריסוסים עוקבים ב-500 מ"ג קנמיצין לליטר) הוגדרו כהומוזיגוטים (ראה טבלה 1) ומיצוי החלבונים המסיסים נבדק באמצעות Western blot ונוגדנים ספציפיים לסולפיט אוקסידאז כדי לוודא שאכן החלבון מבוטא ביתר בצמחים ההומוזיגוטיים בהשוואה לטיפוס הבר (RR) (איור 2) וכן לוודא שהצמחים אכן הומוזיגוטים ואין התפלגויות וצמחים שונים המכילים את החלבון בכמות דומה לזו של טיפוס הבר.

בהתבסס על תוצאות אלה הקוים OE12-5-3, OE12-5-7, OE13-6-6 נבחרו כהומוזיגוטיים להמשך המחקר ואילו מבין הקוים OE11-7, OE15-3 and OE16-4 שהיו גם פחות פוריים והציגו פנוטיפ של עלי תפוא"ד, ייבחרו צמחים הומוזיגוטיים בהמשך.

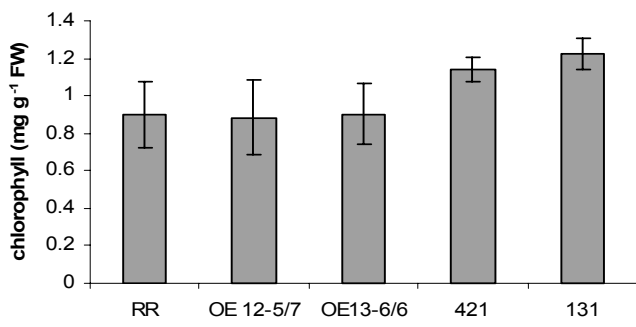
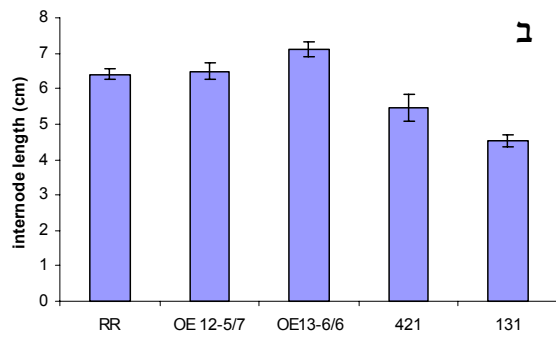
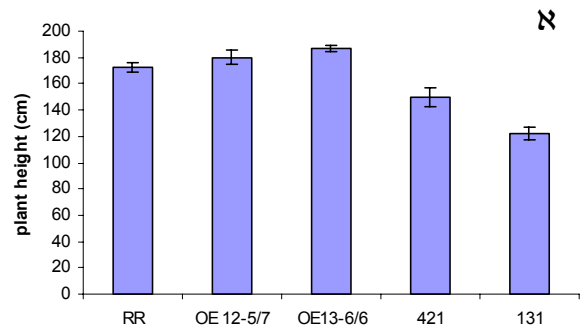
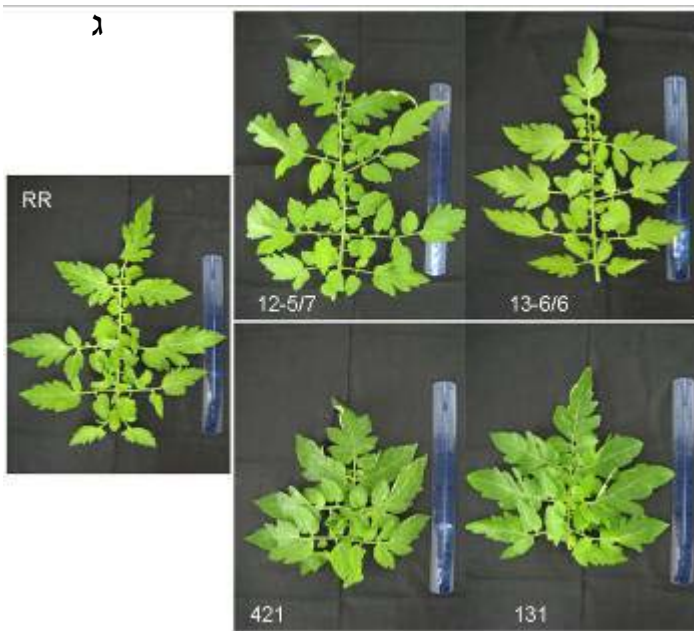


**איור 2** בדיקת חלבון סולפיט אוקסידז (SO) ע"י western blot בקווי עגבנייה המבטאים את SO ביתר בהשוואה לטיפוס הבר (RR).

אפיון צמחים מהנדסים של SO

כדאי לתאר ולהשוות את המוטנטים השונים של SO בתכונות קשורות למורפולוגיה ופוריות הצמח הקמנו ניסויים במשך שתי עונות גידול. הניסויים ניבנו עם 5 חזרות של שני קווים שעברו השתקת הגן SO ושני קווים בעלי ביטוי יתר בהשוואה לטיפוס הבר.

מדידה של גובה הצמח הראה שקווי OE דומים לטיפוס הבר, ואילו המוטנטים שעברו השתקת הגן SO היו יותר נמוכים. לא נמצאו הבדלים בין מספר הפרקים על גבעול המרכזי (תוצאות לא הוצגו) כך שהבדלים בגובה הצמח נבעו



**איור 3** גובה הצמח, אורך הפרקים ומראה כללי של קווים מהנדסים של (א) מהתארכות הפרקים (איור 3 א, ב). תופעה דומה ניתן

לצפות בצורת העלים, שגם כאן העלים של קווי Ri הינם קצרים

והעללים צפופים יותר שגורם למראה קומפקטי (איור 3 ג).

**איור 4** תכולת כלורופיל בעלי עגבניות המהנדסות עבור הגן SO

באופן ברור צבעם של העלים של קווי Ri היה ירוק יותר (איור 3 ג) ראה קביעת תכולת כלורופיל (איור 4). המשמעות של ההבדלים הנ"ל בין הגנוטיפים תיבדק בהמשך.

בקשר לפוריות הצמחים התקבל ששני קווי Ri הניבו פחות יבול בשתי עונות הגידול בעיקר כתוצאה מירידה במספר הפירות לצמח ופחות מהבדלים במשקל הפרי הבודד. תופעה זו הייתה בולטת יותר בעונת הסתיו (טבלה 1 א ו-ב).

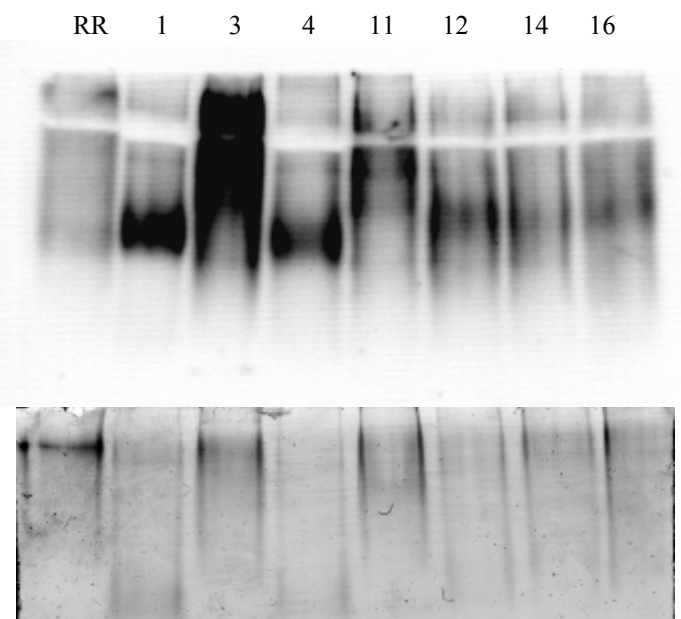
**טבלה 1:** מועד פריחה, יבול כללי, מספר פירות ומשקל פרי בצמחי עגבניה מונדסים ל SO בגידול קיץ (א) וסתיו (ב)

<b>(א)</b>				
קו	זמן לפרחיה (ימים משתילה)	יבול כללי לצמח (גרם)	מס' פירות לצמח	משקל פרי בודד (גרם)
RR	29	919.8±114.8	39.9±4.0	22.8±1.1
Ri SO 421	29	518.4±43.7	30.9±2.1	16.7±0.4
Ri SO 131	33	536.2±108.4	30.6±5.8	17.1±0.9
OE SO 12-5/7	33	832.6±151.8	38.1±6.8	21.7±1.0
OE SO 13-6/6	25	989.5±76.4	48.4±3.8	20.5±1.0
<b>(ב)</b>				
קו	זמן לפרחיה (ימים משתילה)	יבול כללי לצמח (גרם)	מס' פירות לצמח	משקל פרי בודד (גרם)
RR	20	846.2±107.9	51.7±5.7	16.4±0.7
Ri SO 421	22	291.6±45.6	24.4±4.0	11.9±1.0
Ri SO 131	24	252.9±53.1	17.6±3.7	14.4±0.8
OE SO 12-5/7	20	725.2±97.6	64.8±7.2	11.2±0.7
OE SO 13-6/6	16	858.6±42.7	59.4±3.7	14.5±0.5

בירור צמחי עגבנייה שעברו הינדוס בגן סולפיט רדוקטאז (SiR) להשתקה או לביטוי יתר

בכדי לקבל קווים הומוזיגוטים של עגבנייה המבטאים ביתר את הגן סולפיט רדוקטאז (SiR) גידלנו 43 צמחים ( $T_0$ ) שעברו טרנספורמציה כמתואר בדו"ח הראשון (תמונות ראה נספח איור 1). מתוך צמחי  $T_0$  של OE (OE=ביטוי

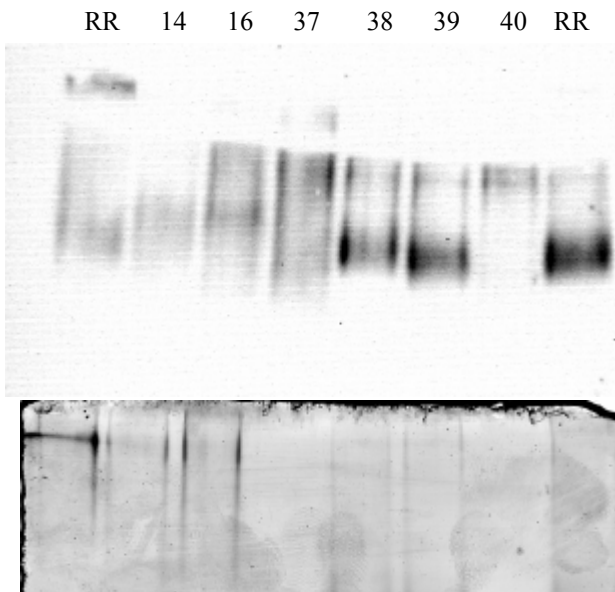
יתר) כל הצמחים נתנו פרי ושתילים של דור  $T_1$  מ-27 קווים שנבטו רוססו בקנמיצין (6 ריסוסים עוקבים ב-500 מ"ג קנמיצין לליטר) להמשך ברירת צמחים הומוזיגוטים (נספח טבלה 1). נמצא שבשישה קווים (#1, #2, #4, #23, #24, #25) מתוך שלושה קאלי (3, 31 ו-A16) כל צמחי  $T_1$  היו רגישים לקנמיצין ולפיכך ככל הנראה לא הוחדר הגן. להמשך גידלנו בחממה 5 קווים  $T_1$  (#3, #5, #10, #11, #12) לקבלת  $T_2$  ובירור הומוזיגוטים. מיצוי החלבונים המסיסים של הצמחים נבחן באמצעות Western blot ונוגדנים ספציפיים ופעילות אנזימתית ל-SiR כדי לוודא שאכן החלבון מבוטא ביתר בצמחים אלו בהשוואה לטיפוס הבר (RR) (איור 5 וגם Sup 5D). מתוך קווי



**איור 5.** פנל העליון הינו western blot ופנל התחתון גל פעילות של SiR. (RR -זן הבר, מס' 1-16 קווים שונים של  $T_0$  בעלי ביטוי יתר של SiR)



מס' 3 ו-5 הצלחנו לבדוד קו הומוזיגוטי אחד מכל אחד, ואילו ממס' 10 קיבלנו 3 קווים הומוזיגוטים ששימשו להמשך העבודה. בעונה האחרונה יצרנו כמות מספקת של זרעים שמאפשר לנו לבצע ניסויים נוספים.



**איור 6.** פנל העליון הינו western blot ופנל התחתון גל פעילות של SiR. (RR - זן הבר, מס' 14, 16 - קווים שונים של  $T_0$  בעלי ביטוי יתר של SiR, מס' 37-40 - קווים שונים של  $T_0$  שעברו השתקה של SiR)

בין 4 צמחי ה- $T_0$  שאמורים להיות SiR מושתק הובחנה צורת גידול שונה. שני קווים (#38, #39) התפתחו בקצב גידול דומה לטיפוס הבר ובצמחי  $T_1$  שרוססו בקנמיצין התגלו 100% רגישות לסמן (נספח טבלה 1) וביטוי החלבון היה רק דומה לזה של זן הבר (איור 6). לעומת זאת התפתחותם של שני הקווים הנוספים (#37, #40) הייתה בקצב איטי מאוד וביטוי חלבון SiR היה כמעט אפסי בשני הקווים (איור 6). פירות שחנטו בקו #40 נפלו הרבה לפני הבשלתם בצבע ירוק (נספח איור 2) ורק אחרי הבשלה באיכסון הזרעים שהתפתחו יכלו לנבט באחוז נביטה גבוה ביותר 99-100%. ריסוסים של צמחי  $T_1$  אם קנמיצין גילו התפלגות של 1:3 של צמחים רגישים ובלתי רגישים לסמן כפי הצפוי (נספח טבלה 1). סלקציה של קווים הומוזיגוטים בין 55 צמחי  $T_1$  הובילה ל-2 קווים שכל הנראה הומוזיגוטים. אנו מצפים לקבלת זרעים בעתיד הקרוב לייצור צמחים הומוזיגוטים עבור 40 SiR Ri להמשך המחקר. כרגע משתמשים בצמחים עמידים לקנמיצין שהם הטרו והומוזיגוטים.

התמונה ליצירת פירות בקו #37 שונה. חנטת הפירות בקו זה נמוכה מאוד ככול הנראה בגלל כמות מעטת של גרגירי אבקה וחיוניותם הנמוכה (נספח איור 3) שגרמה לייצור פרי מועט. בהמשך נביטתם של זרעי  $T_1$  הגיעה

Phenotypes of SiR Ri #37 seedlings showing malformations after germination and do not further develop



**איור 7** נבטים שנבטו מקו SiR Ri #37 והתפתחותם הלקוייה

ל 4% בלבד (נספח טבלה 1) והתפתחות לא תקינה של רוב הזרעים (איור 7). כעת בידינו 3 צמחים שטרם נבדקו לעמידות לקנמיצין.

### בדיקת רגישות לסולפיט של קווי עגבניות המהונדסים עבור הגנים SO ו-SiR

רגישות לגידח בעגבניות עם שינויי ביטוי לSO תוארה בדוח שנה א' וב'. בגלל העלויות הגבוהות הכלולות

בשימוש מדויק בגידח השתמשנו בהמשך בבדיקת רגישות לסולפיט בדיסקיות עלים

בקווי עגבנייה המבטאים ביתר או עברו השתקה של הגנים SO או SiR בהשוואה לטיפוס הבר RR. כמדדים לנזק

שימשו הסתכלות וויזואלית (צילום) ותכולת

כלורופיל (איור 8).

טיפול של 7 מילימולר סודיום סולפיט למשך 48 שעות גרם לירידה בתכולת הכלורופיל בכול קווי עגבנייה (איור 8). ירידה משמעותית נצפתה בקו

SiR Ri 40 ורק 20% מתכולת הכלורופיל

בהשוואה לביקורת נמדדה אחרי הטיפול. בטיפוס

הבר ו-SO Ri נשאר כ-40%, לעומת זאת בשני

הקווים בהם יש ביטוי יתר (SO ו-SiR) נשאר כ-60% תכולת כלורופיל (איור 8). לכן נראה שצמחים

שמבטאים ביתר אחד משני הגנים הקשורים

לנטרול סולפיט יותר עמידים לנזקים מתוצר

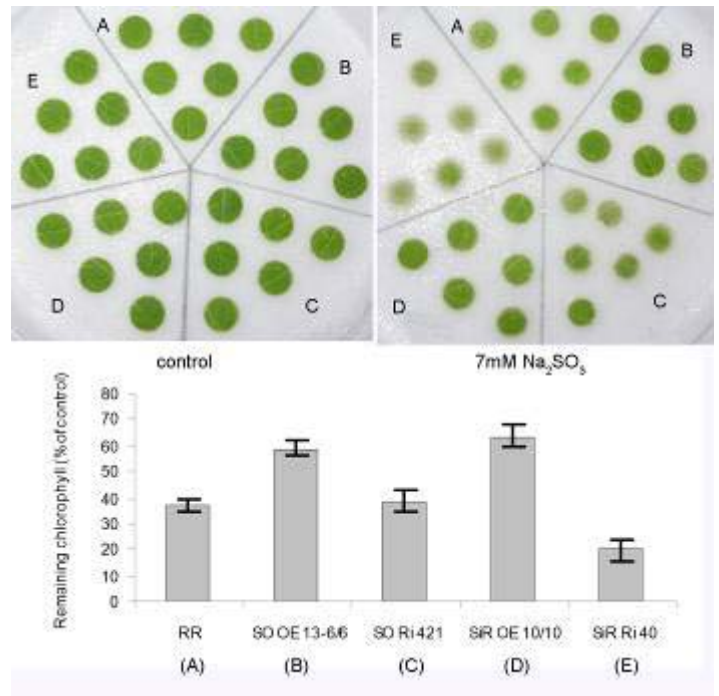
בטיפול עם סולפיט או גדי"ח, עכב יכולתם לנצל

ולנטרל באופן יותר יעיל סולפיט. נראה שכנראה

SiR יותר יעיל בפעולת הנטרול, מכיוון שהשתקת

הגן גורם לרגישות גבוה יותר בהשוואה לדיסקים

מצמחים בהם הושקת הגן SO (איור 8).



**איור 8** בדיקת רגישות לסולפיט של קווי עגבנייה שמבטאים ביתר או עברו השתקה של הגנים SO או SiR (פנל עליון) ושאריות כלורופיל אחרי סיום הניסוי (פנל תחתון)

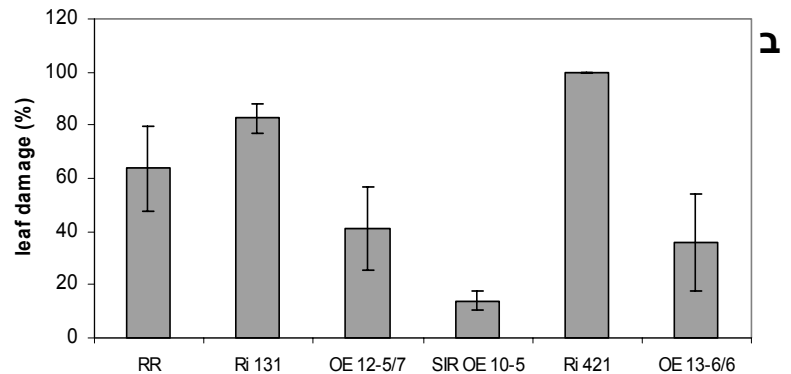
### בחינת מוטנטים של SO ו-SiR באריזה בדפי פלסטיק המשחרר SO<sub>2</sub>

הטיפול בדפי פלסטיק המשחררים SO<sub>2</sub> גורם לנזק בעלים המתבטא בהתרככות של רקמת העלים שמתחיל בקצות העלים מלווה בשינוי צבע מירוק בהיר מבריק לירוק חיוור (איור 9 א).

טיפול במשך 8 שעות בתנאי אור גרם לתמותה של 100 אחוז בעלים של קו SO Ri 421 ו-82% בקו SO Ri 131.

טיפוס הבר RR ניזק באורך בינוני של 64%. בשני הקווים שמבטאים את הגן SO ביתר הנזק ירד לכ-40%. מעניין

לציין שעלים שמבטאים ביתר את הגן SiR (OE 10-5) הראו רק כ-14% נזק בעלים (איור 9 ב).



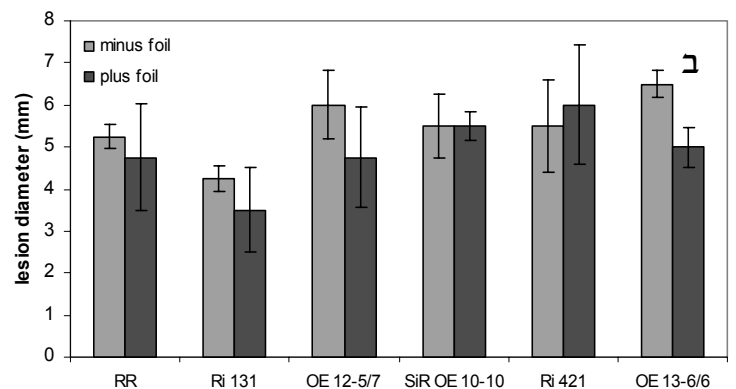
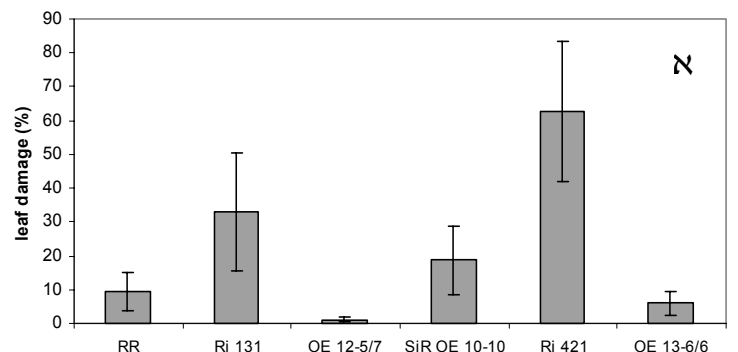
**איור 9.** (א) נזק בעלים של קווי עגבניות כתוצאה מטיפול בדפי  $SO_2$  למשך 8 שעות בתנאי אור רצוף. נבחנו קווים שונים בהם כאלה המבטאים ביתר גנים לנטרול סולפיט או כאלה שעברו השתקה בהשוואה לטיפוס הבר, (ב) ביטוי הנזק כדירוג אחוזי שטח עלים הפגוע.

טיפול בדפי  $SO_2$  למשך 8 שעות באור והדבקה

עם בוטריטיס

ביטוי הנזק שנגרם לעלים כתוצאה מהטיפול היה דומא לניסוי המתואר למעלה: הנזק הכי חזק נצפה בקו SO Ri 421 ואחריו SO Ri 131. טיפוס הבר ושני הקווי המבטאים ביתר את הגן SO נזקו פחות. עלים של קו נוסף שמבטא ביתר את בגן SiR OE10-10 נזקו באופן בינוני (איור 10 א).

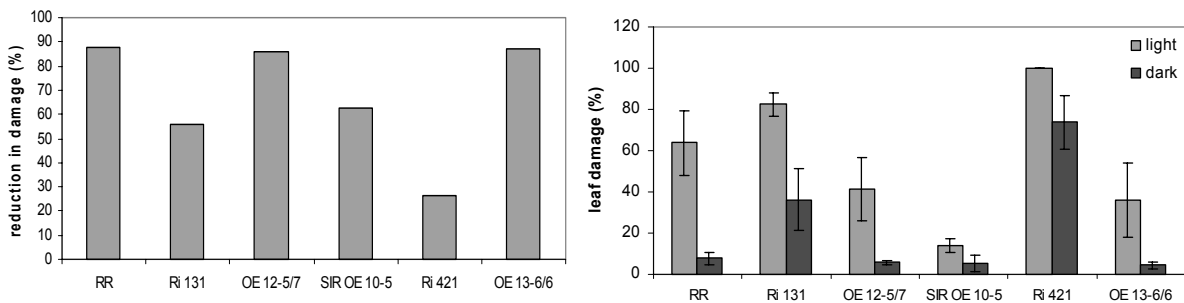
גדילת הבוטריטיס נמדדה כהתפשטות הליזיון על העלים. טיפול למשך 8 שעות בדפי  $SO_2$  במשקל של 200 מ"ג לא השמיד את הפתוגן, אך גרם לנזק רב בעלים של קווי Ri (איור 10 ב).



**איור 10** (א) אחוזי נזק בעלים של קווי עגבניות המבטאים ברמות שונות תוצרי גנים לנטרול סולפיט בהשוואה לטיפוס הבר לאחר טיפול בדפי  $SO_2$ . (ב) התפשטות הליזיון אחרי הדבקה עם בוטריטיס וטיפול בדפי  $SO_2$ .

### השפעת אור וחושך בטיפול בדפי SO<sub>2</sub>

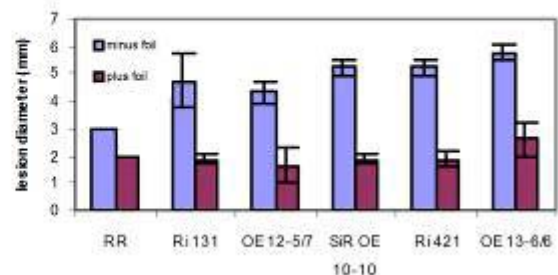
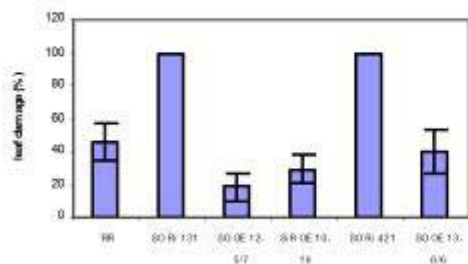
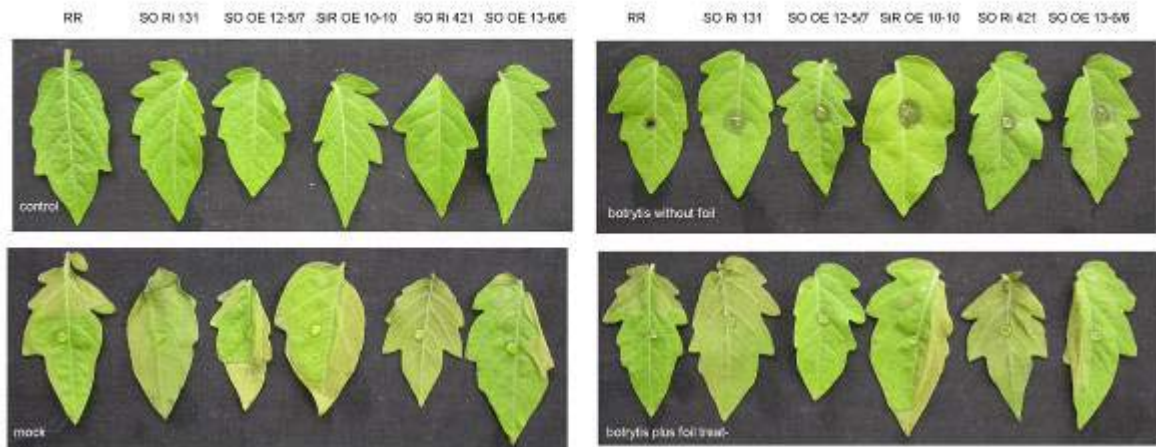
כדי להגדיל את מנת ה-SO<sub>2</sub> ניסינו לבצע את הטיפול בדפי SO<sub>2</sub> בחושך בזמן שפעילות הפיזיולוגית של העלים נמוכה יותר (בעיקר הפיוניות סגורות, אך SO פעיל בפראוקסיזום ולא קשור לכלורופלסטים). אכן הנזק בעלים ירד בין 86-87% כתוצאה מטיפול בחושך בעיקר בקווים המבטים את SO ביתר ובטיפול הבר (איור 11). גם בקווי Ri נצפתה הקטנה בנזק, אך פחות משמעותית של 56%-ו 26% בלבד בקווי Ri 131 ו-Ri421, בהתאמה. הנזק הכי קטן נצפתה בקו SiR OE 10-5 שגם באור וגם בחושך היה פחות מ-20% (איור 11). תוצאות אלו תומכים במסקנה שהפקנו מניסויי הדיסקים של עלים שהגן SiR יותר יעיל בפעולת הנטרול של סולפיט בצמח.



**איור 11** השפעת טיפול בדפי SO<sub>2</sub> באור לעומת טיפול בחושך נזק בעלים (א), הערכת נזק בעלים לפי שטח עלים הפגוע (ב), ירידה הנזק כתוצאה מטיפול בחושך (ג)

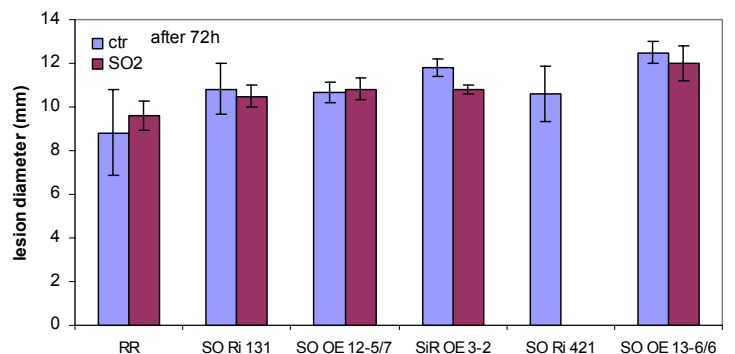
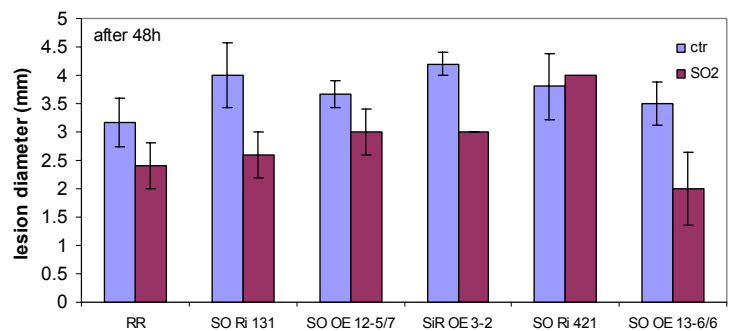
### חשיפה ממושכת לדפי SO<sub>2</sub> בחושך מפחיתה התפשטות בוטריטיס

טיפול ממושך של 15 שעות בדפי SO<sub>2</sub> בחושך עם עלים מודבקים עם בוטריטיס הצליח לדכא את גדילת הפיטרייה משמעותית עד כ-40 שעות אחרי ההדבקה (איור 12), אך גרם לתמותה של 100% של העלים בהם השתיקו את הגן SO (קווי Ri).



איור 12 השפעה של טיפול בדפי SO<sub>2</sub> במשך 15 שעות בחושף על נזק בעלים והתפשטות הליז'ון. הפנל העליון ללא דפים המשחררים גז"ח, והתחתון בתוספת דפים משחררי גז"ח. הפנלים הימניים עם הדבקה בבוטריטיס. הגרף מימין מתאר את גודל התפשטות הפטרייה ומשמאל את רמת הנזק מגז"ח.

בהמשך הניסוי, אחרי 48, התפשטות הפטרייה הייתה עדיין מעוכבת כתוצר מהטיפול בדפי SO<sub>2</sub> (איור 13). אולם עם הזמן ואחרי 24 שעות נוספות הליז'ון התפשט ולא ניתן להבחין בהבדלים יותר, כך שהעיכוב היה זמני בלבד. בכוונתנו להמשיך וללמוד את הטיפול בדפי SO<sub>2</sub> בפירות של צמחים טרנסגניים בהם שונה SO ו-SiR שאנו מצפים לקבל בהמשך.

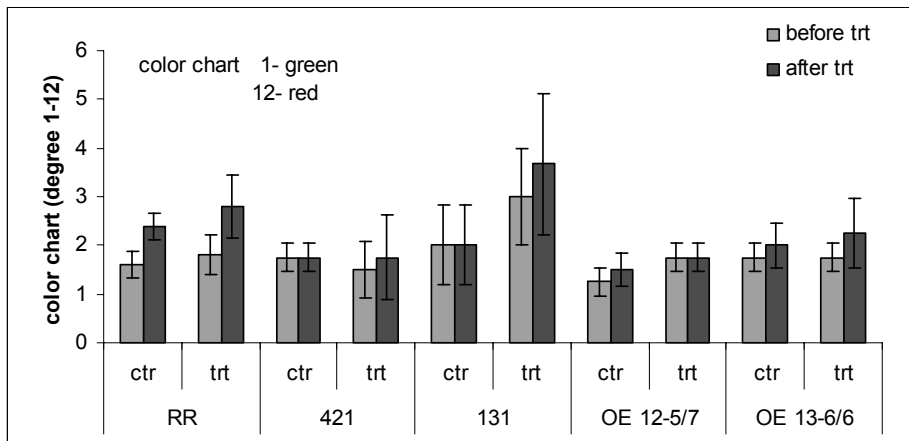


התאמה רמת הסולפיט ומשך הטיפול

בהתחלה נבדקו הפירות בשלושה שלבי התפתחות (אדום, כמעט אדום ושבירת צבע) לאחר חשיפה לרמה גבוהה (10 ח"מ) של  $SO_2$  למשך 4.5 שעות (ראה נספח איור 4). מיד אחרי הטיפול הופיע שקע מסביב לחיבור של עלי הגביע שהתחזק אחרי יום וחצי. הקו Ri 421 כמו כן קו OE 13-6/6 וטיפוס הבר RR הראו סימני הנזק בעיקר בשלב הכמעט אדום. שינוי בזמן החשיפה לשעתיים וחצי ב-10 ח"מ ולאחר מכן שמירת הפרי למשך 14-16 שעות נוספות (תוצאות לא הוצגו) עדיין נצפה נזק, ולכן קיצרנו את זמן החשיפה לשעתיים בלבד ללא הופעת נזק. טיפול זה נבחר להמשך המחקר.

השפעה של  $SO_2$  על פרמטרים של איכות ומטבוליים בפרי העגבנייה

לצורך אבחון השפעה של הגז הרעיל  $SO_2$  על איכות ומטבוליים בפרי העגבנייה ביצענו שלושה ניסויים במתכונת דומה. לניסויים שימשו פירות בודדים של שני קווים בעלי ביטוי יתר של הגן SO (OE 12-5/7, OE 13-6/6), שני קווים שעברו השתקת הגן (Ri 421, Ri 131) וכביקורת טיפוס הבר RR. הפירות נקטפו בשלב שבירת צבע מוקדמת ועברו לטיפול ב- $SO_2$  כמתואר למעלה. אחרי הטיפול הפירות אוכסנו בטמפי' של 12 מ"צ. נבדקו מספר פרמטרים קשורים להבשלה והתפתחות הפרי, כדי להבטיח הבשלה תקינה אחרי הטיפול ב- $SO_2$ . נקודה חשובה הייתה לאתר ולאפיין נזקים והפרעות היכולים לפגוע בתהליך ההבשלה ושמירת הפרי.

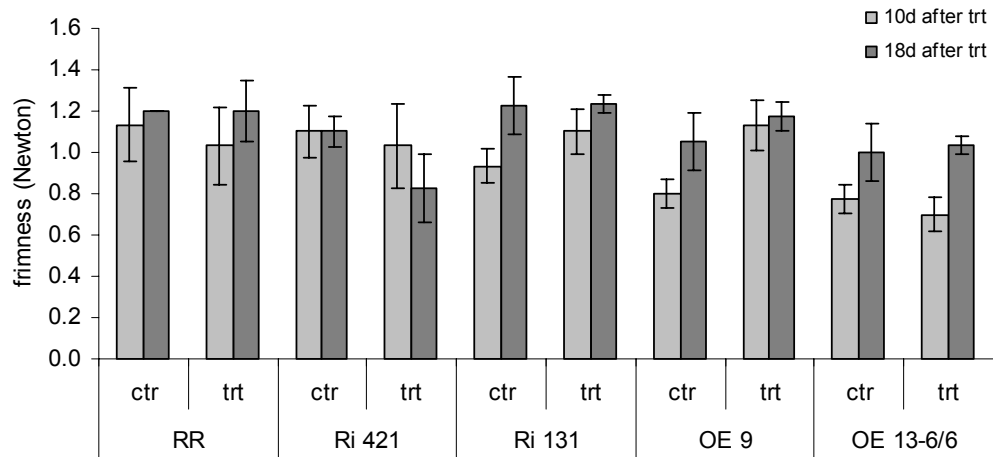
שינוי צבע הפרי

טיפול ב- $SO_2$  לא הוביל לשינוי משמעותי בצבע הפרי בתום הטיפול (איור 14). בתווך ארוך יותר של 10 ימים הפרות הבשילו בצורה תקינה והגיעו לצבע אדום מלא (דירוג 12) ללא הבדלים בין קווי המוטנטים השונים או הטיפולים (נספח איור 5), לכן לטיפול בגדי"ח עד 10 ח"מ אין השפעה על התפתחות הצבע בהבשלת הפרי.

**איור 14.** השפעת טיפול ב- $SO_2$  על שינוי צבע בפרי העגבנייה בקווים מהונדסים של SO (OE ו-Ri) בהשוואה לטיפוס הבר RR

מוצקות הפרי

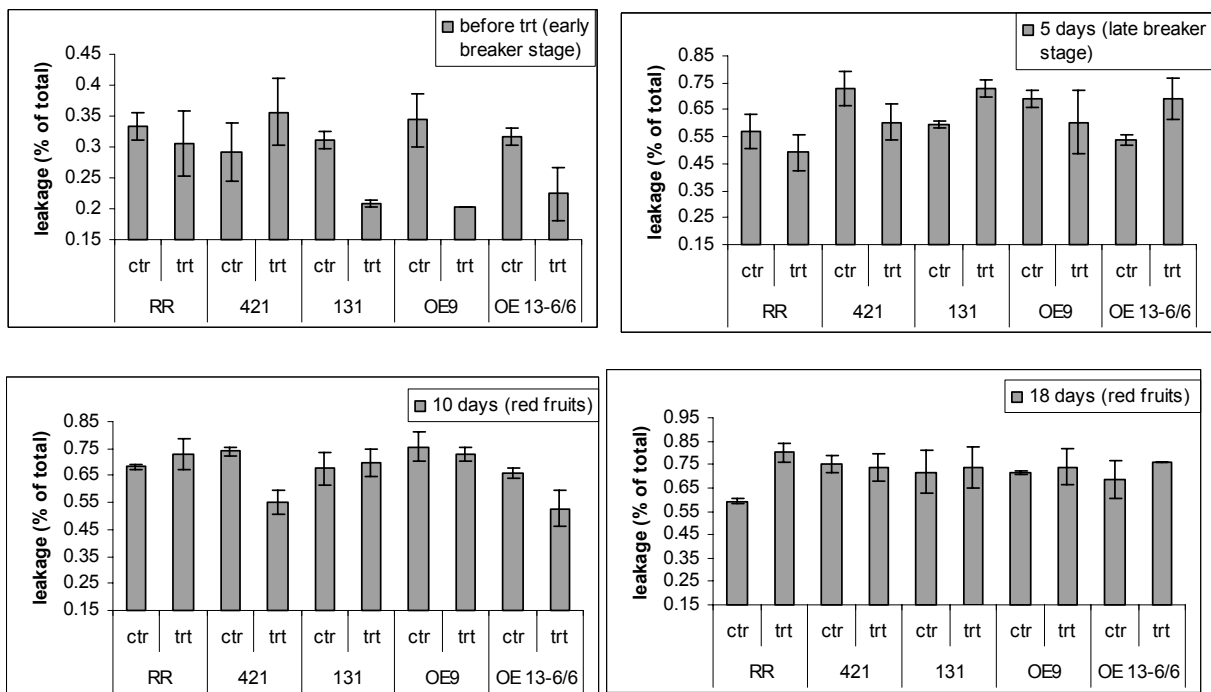
התרככות הפרי שימש כמדד לנזק ברקמת העגבנייה עקב טיפול ב- $SO_2$  (איור 15). לא נצפו הבדלים מובהקים בין הקווים והטיפול בגדי"ח, גם בשלב המוקדם בהבשלה עם הגעה לצבע מלא (10 ימים אחרי הטיפול) וגם לטווח יותר רחוק בהמשך הבשלת הפרי (18 ימים אחרי הטיפול).



**איור 15.** השפעת טיפול ב-SO<sub>2</sub> על התרככות הפרי 10 ו-18 יומיים אחרי הטיפול

דליפת אלקטרוליטים (electrolyte leakage)

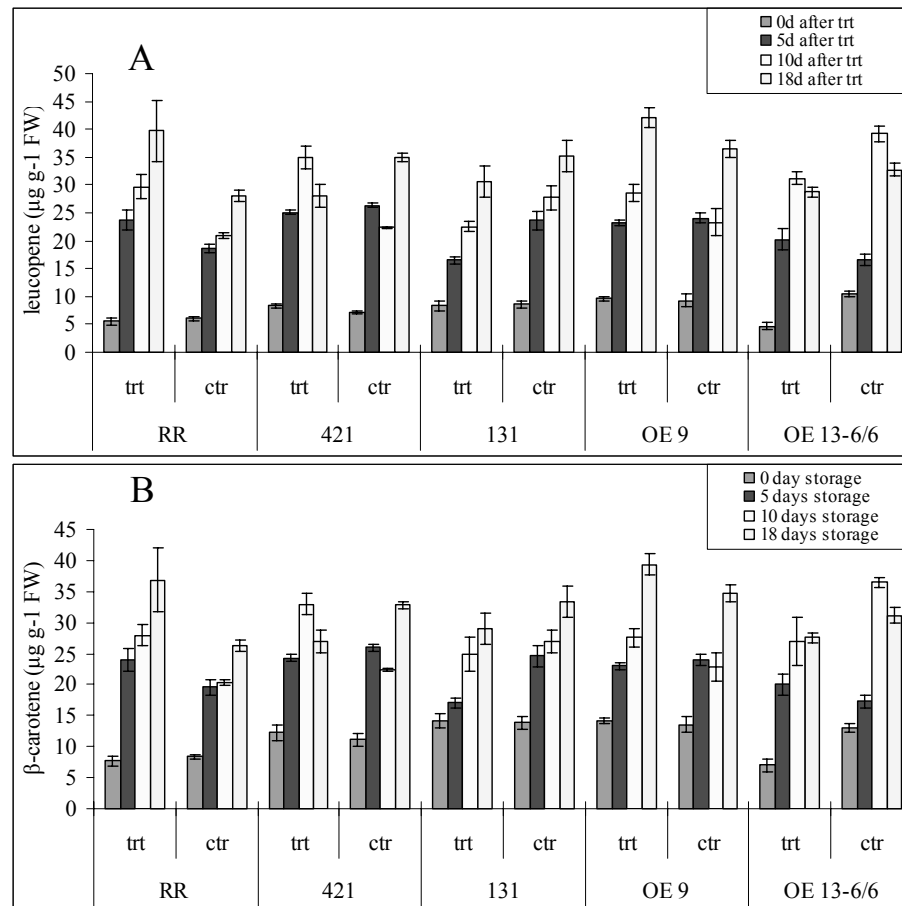
נבדקה השפעת טיפול ב-SO<sub>2</sub> על תקינות הרקמות באמצעות בדיקת שלמות הממברנה. הבשלת הפרי הובילה לעליה בדליפות אלקטרוליטים ללא קשר לטיפול ב-SO<sub>2</sub> או לרקע הגנטי (איור 16). הבדלים זניחים בין הטיפולים נובעים ככל הנראה מהבדלים בהבשלת הפרי ולא כתוצאה מהטיפול ב-SO<sub>2</sub>. נראה על כן, שטיפול ברמה גבוהה של גדי"ח של 10 ח"מ למשך שעתיים לא גרם לנזק ויזואלי לקליפת הפרי. וגם לא בפריקרב של הפרי כפי שבא לידי ביטוי בבדיקה זו (איור 16).



**איור 16.** השפעת טיפול ב-SO<sub>2</sub> והבשלת הפרי על דליפת אלקטרוליטים כמדד לנזק ברקמת הפרי

## תכולת ליקופן ובטא קרוטן בפרי העגבנייה

תכולות ליקופן ובטא קרוטן בפרי נמצאו בהתאמה עם דירוג הוויזואלית של צבע הפרי (ראה נספח איור 6). בזמן האחסון, אחרי טיפול ב-SO<sub>2</sub>, תכולת הפיגמנטים האדומים-כתומים גברה עם הזמן ועם הבשלת הפרי (איור 17). לא נמצאו הבדלים משמעותיים בין קווי העגבניות ובתגובה לטיפול ב-SO<sub>2</sub>.



**איור 17.** השפעת טיפול ב-SO<sub>2</sub> והבשלת הפרי על תכולת ליקופן ובטא קרוטן במצעית הפרי

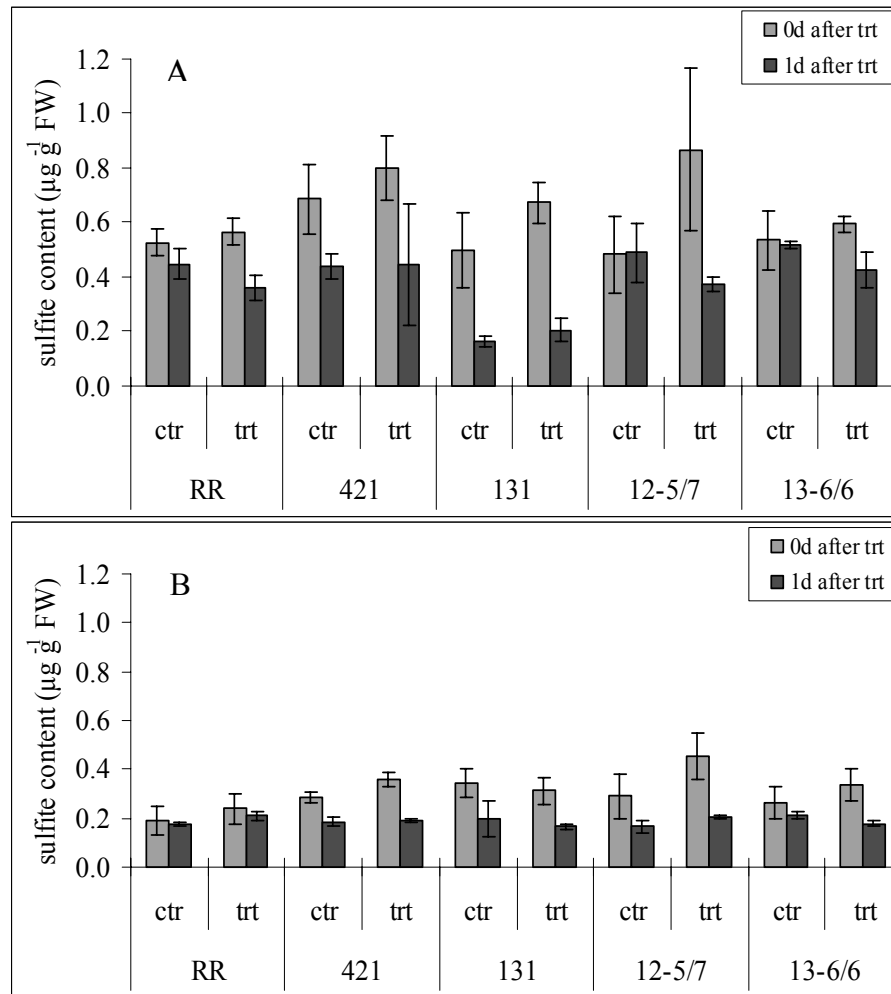
## תכולת סולפיט

השוואה בין שתי שיטות לקביעת סולפיט (ראה איור 7 בנספח) נתן עדיפות לשיטת pararosanilin על שיטת ה-DTNB, בגלל יציבותם ואמינותם של התוצאות. לפיכך בהמשך המחקר השתמשנו בשיטה הנייל בלבד. רמת הסולפיט לא השתנתה עקב הטיפול ב-SO<sub>2</sub> בקליפה כמו גם במצעית הפרי (איור 18). כן נמצאו הבדלים משמעותיים בין הרקמות, כך שבקליפה רמת הסולפיט הייתה בערך פי שתיים מהנמצא במצעית. רמות הסולפיט היו נמוכות מגבול השאריות הסובלני של 10 מיקרוגרם לגרם משקל טרי (Smilanick et al., 1990a). בנוסף נקבעה מחצית החיים של SO<sub>2</sub> ל-24-36 שעות לכן השאריות פחתה ברוב המקרים כבר אחרי אחסון של יום בלבד (Smilanick et al., 1990b).

ניתן לסכם שהטיפול בגד"ח לא השפיע על מראה החיצוני של הפרי כמו כן על שלמות הרקמות בפרי. תהליך ההבשלה התרחשה בצורה תקינה ללא עיכוב או הקדמה. כמו כן לא נמצאה שאריות משמעותית של



סולפיט בקליפה או מצעית הפרי ולפיכך נראה שטיפול ב- $\text{SO}_2$  ברמות שנבחנו על ידנו לא תפגע בפרי ולא תעלה משמעותית את רמות הסולפיט בפרי. מובן שעל הפירות להישטף לפני האכילה.



**איור 18:** תכולת סולפיט בקליפה (A) ובמצעית הפרי (B) של עגבניות מיד ויום אחרי טיפול ב- $\text{SO}_2$ .

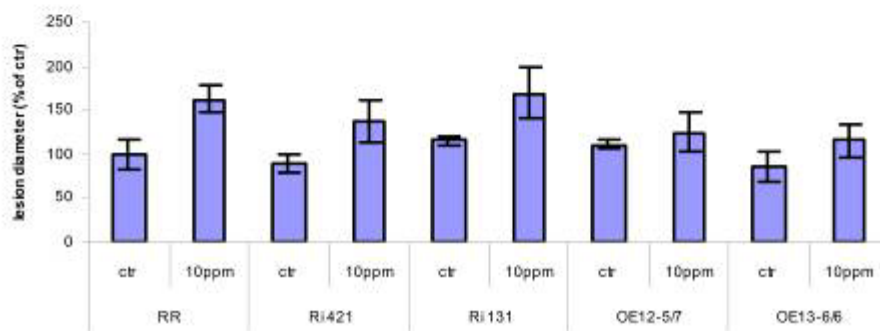
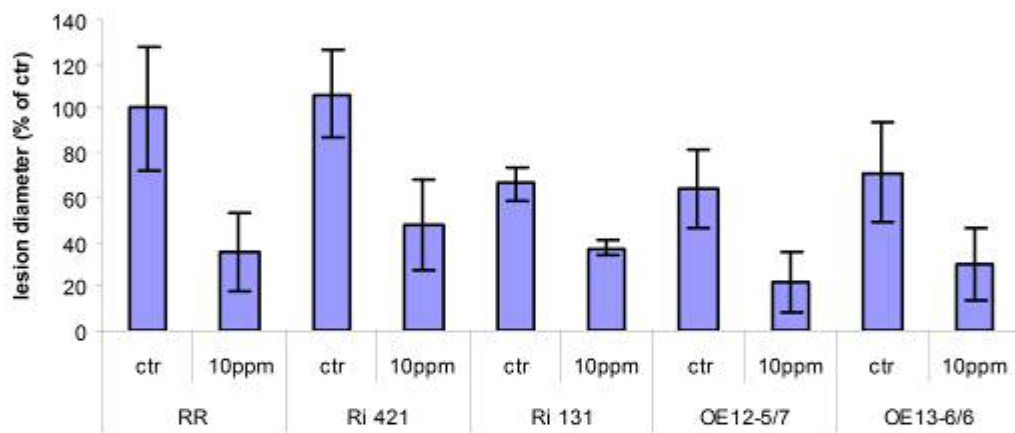
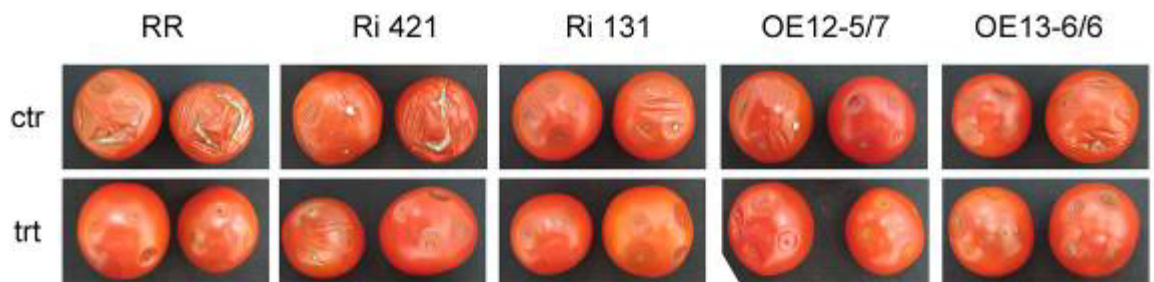
### טיפול בגד"ח מונע התפשטות בוטריטיס בפרי העגבניה

ריכוז גבוה של  $\text{SO}_2$  עשוי להשמיד נבגים עמידים של פטריות פתוגניות הנוכחות על הפרי לפני שמתאפשרת חדירתם לתוך הרקמה. ריכוז נמוך של  $\text{SO}_2$  משמיד תפטירים שהם רגישים יותר לטיפול (Gabler et al., 2005), וכך נמנעת הדבקה מפרי לפני בעת האחסון.

הפטרייה הפתוגנית, *Botrytis cinerea* הגורמת למחלת העובש האפור, תוקפת מגוון רב של צמחים בשלבים שונים של התפתחותם (Lichter et al., 2003). טיפול ברמות נמוכות של  $\text{SO}_2$  יכולות לגרום להישרדות חלקי התפטירים בעוד שריכוזים גבוהים יכולים לגרום לנזק בפרי.

פירות מטיפוסים שונים המבטאים את הגן סולפיט אוקסידאז (SO) ביתר או בחסר הודבקו בנבגי הפטרייה ע"י פציעת הפרי לצרכי הדבקותו, בשלב ההבשלה (צבע אדום) והושוו לפרי מטיפוס הבר. יישום בגד"ח (שעתיים ב-10 ח"מ) הקטין את גידול הפטרייה ללא קשר לרקע הגנטי של העגבנייה. בפירות ביקורת שרק נפצעו ולא הודבקו, טיפול בגד"ח הגדיל את קוטר הפגיעה בהשוואה לפירות שנפצעו ולא טופלו בגד"ח.

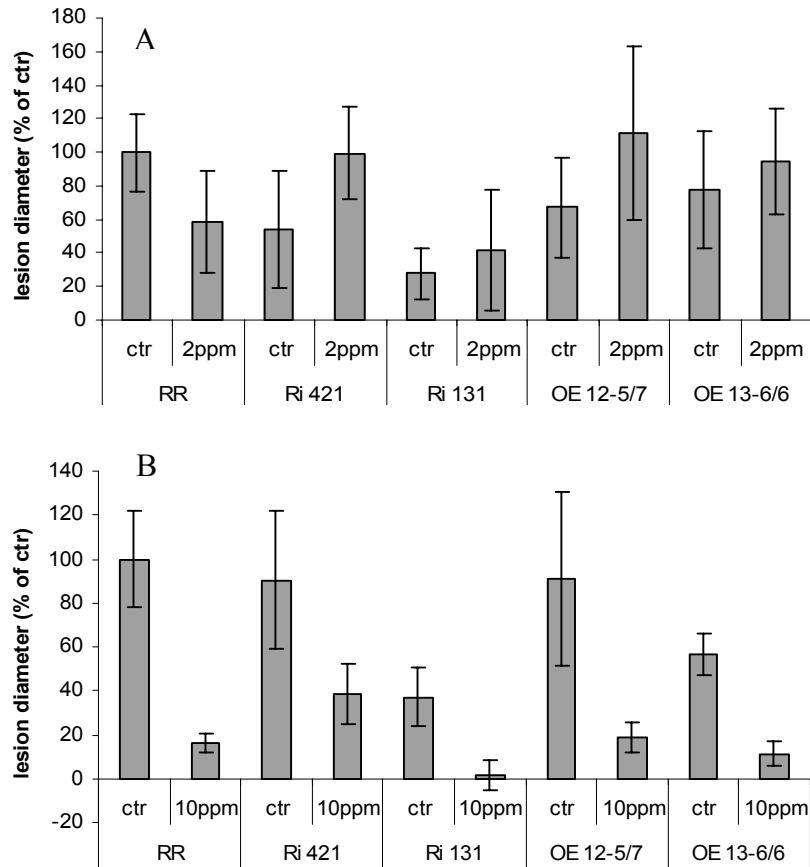
מתוכם נפגעו פחות פירות בהם בוטא הגן SO ביתר (איור 19). השפעת הפגיעה של גד"ח והביקורת ללא הדבקה הופחתה מהשפעת הגדלת הפגיעה בפירות שהודבקו, והפרש זה בגודל הפגיעה יוחס להתפשטות הפטרייה. התוצאות המוצגות בחלק העליון של איור 19 מבטאות הפרש זה.



**איור 19.** צילום פירות וביטוי כמותי של התפשטות בוטריטיס בפירות מודבקים אחרי טיפול ב-10 ח"מ גד"ח למשך שעתיים בהשוואה לפרות שלא טופלו בגד"ח (2 פנלים עליונים). אפקט של פגיעת הפרי ללא הדבקה בוטריטיס אך לאחר וטיפול בגד"ח (MOCK, 2 פנלים תחתונים).

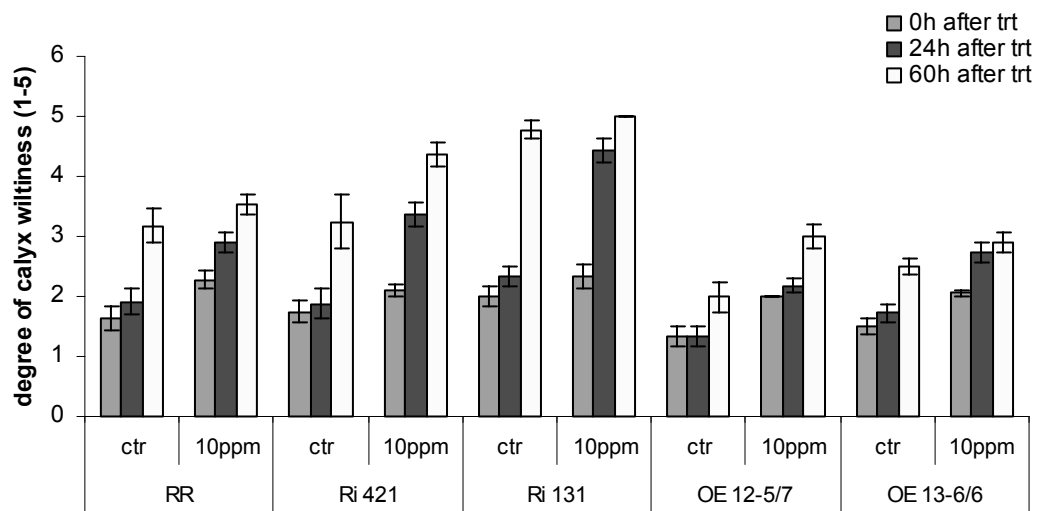
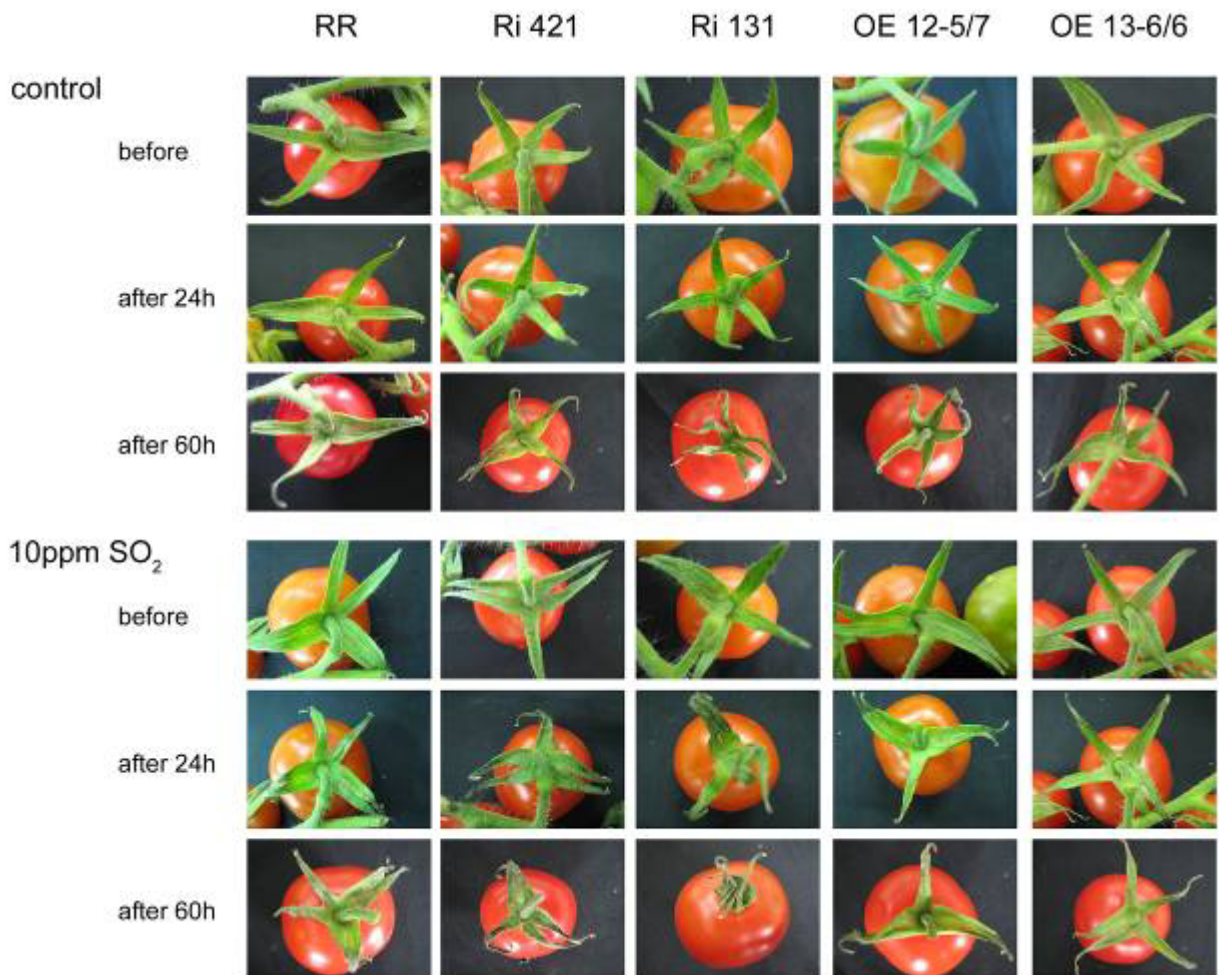
טיפול בגד"ח במוצר עגבניית באשכולות

חלק ניכר ממכירת העגבניות כולל גם פרי העגבנייה הנמכר כיחידה אחת הכוללת אשכולות בגבעול ועלי הגביע הקשורים לפרי. לפיכך קיימת חשיבות למראה יפה וטרי של עלי הגביע המועדף ע"י הצרכן. טיפול ב-SO<sub>2</sub> עלול להשפיע לרעה על המראה הכללי ורעננות האשכול. לבדיקה של השפעת האידוי בגד"ח במראה האשכול ביצענו אידוי של האשכולות ברמה של 2 ח"מ למשך 3 שעות. נמצא שטיפול זה לא הפחית את התפשטות הבוטריטיס בפרי (איור 20A) בעוד שאידוי ב- 10 ח"מ לשעה עיכב את גדילת הפטרייה משמעותית (איור 20B).



**איור 20.** ביטוי נטו (בניכוי ההתפשטות בפציעה ללא הדבקה) כמותי של התפשטות נגיעות בוטריטיס 60 שעות אחרי טיפול ב-SO<sub>2</sub>. (A) 2 ח"מ ל- 3 שעות ו-(B) 10 ח"מ לשעה.

ביצענו יישום ברמה הגבוהה להמשך אפיון הנזק בעלי הגביע והתאוששותם אחרי טיפול ב-SO<sub>2</sub>. השפעת רמת הביטוי של SO בתגובה לשימוש ב-SO<sub>2</sub> מודגמת באיור 21 בו מוצגת עמידות עלי הגביע לאידוי בגד"ח ברמה של 10 ח"מ למשך שעה. בדיקה שבוצעה 24 ו-60 שעות לאחר האידוי מדגימה שעלי הגביע של פירות בצמחים שבטאו SO ביתר (OE 12-5/7, OE 13-6/6) היו עדיפים במראה בהשוואה לאלה של טיפוס הבר וכאלה המבטאים את SO בחסר (Ri 421, Ri 131) (איור 21). ביטוי יתר של SO הקנה לעלי הגביע עמידות לנבילה בהשפעת הטיפול בגד"ח. מעניין שגם שהטיפוסים שביטאו את SO ביתר היו רעננים יותר גם בצמחים שלא טופלו בגד"ח בהשוואה לטיפוסים האחרים כפי שבא לידי ביטוי 24 ו-60 שעות לאחר הטיפול (איור 21 פנל תחתון).



**איור 21.** השפעת ביטוי SO על רעננות עוקץ הפרי עם וללא שימוש בגד"ח. פנל עליון: צילומי פרי אחרי טיפול ב-SO<sub>2</sub> 10 ח"מ למשך שעה) ואחסון למשך 60 שעות בטמפ' של 25 מ"צ. פנל תחתון: ביטוי כמותי של רעננות העוקץ לפי דירוג וויזואלי של ההתייבשות (1- מראה טרי, טורגור מלא, 2- קצוות העלים נבולים, 3- עלים נבולים, 4- רוב חלקי העלה יבשים, 5- עלים יבשים לחלוטין).

## סיכום תוצאות:

תוצאות אלה מדגישות את הפוטנציאל של שימוש בגד"ח למניעת התפשטות מחלות פטרייתיות (כפי שהודגם בבוטריטיס וגם באטרקנוז ראה דו"חות קודמים) מצד אחד, ואת חשיבות הביטוי של הגנים אשר תוצריהם יכולים לנטרל סולפיט, כפי שהודגם בביטוי יתר של SO, מצד שני. מאמץ רב הושקע גם בשיבוט הגנים SIR, MST1, MST2 ו-SQD1 בעגבנייה ובייצור קונסטרוקטים מתאימים לביטוי ביתר ולהשתקת הגנים בעגבנייה. הצלחנו לקבל קווים מהונדסים הומוזיגוטים לביטוי הגן SiR שמאפשרים לנו את המשך המחקר. בשלב זה אנו מייצרים צמחים מהונדסים עבור הגנים MST1, MST2 ו-SQD1.

בגלל מגבלות גודל הדוח נכללו בגוף הדוח עבודות שנעשו לגבי השפעת תצורותיו השונים של סולפיט הן כגד"ח המוזרם ישירות או באמצעות פלסטיק לאריזה המשחרר גד"ח ואו באמצעות החדרת סולפיט והשפעותיה על התפשטות פטריות פתוגניות, וחלקי הצמח שנחשפו לסולפיט. לכן העבודה היותר מולקולארית שנעשתה הופיעה בדוחות הקודמים ובניסוח. בנספח מופיעים איורים המתארים את עבודת רשת גנים המווסתת ומגיבה לסולפיט. נמצא שהזרקת סולפיט גורם לאינדוקציה של SO, SIR, MST1, 2, SQD1 ו-APR1-3 כמו גם APR1-2 ו-APS1-2 המכוון לניטרול סולפיט והפיכתו לסולפט (באמצעות SO) או תיוסולפט (באמצעות ST) (ראה איורים 1-16 A Figure) באפנדיקס כמו גם (Supplemental 11).

במערכת של 13 איורים נוספים ב- SUPPLEMENTAL

אנו מציגים 3 שיטות מתוכן 2 בדיקות אנזימטיות לבדיקת סולפיט בצמח (Sup1) שכללה בידוד וניקוי חלבוני SIR ו-OASL (Sup13). כמו גם ייצור שיטה חדשה לקביעת APR וקביעה אלטרנטיבית של פעילות SO (Sup2-3) ושל OASL (Sup 4). פיתחנו והוכחנו שיטה חדשה לקביעת SIR ו-ST (Sup 5-6) וקביעה אנזימטית של תיוסולפט (Sup 7) sulfite network ושיטות נוספות לקביעת פעילות ST. ב-10 sup מוצג הטרנסקריפט היחסי של גנים השייכים ל- homeostasis genes כפי שבאו לידי ביטוי במוטנט של SO בו נראת קומפנסציה פוטנציאלית חיובית של הטרנסקריפט של SIR ו-MST2 ושילית של שלושת ה-APR המייצרים סולפיט לצורך וויסות רמת הסולפיט בצמח. מבחינה מדעית הצגנו מערכת גנים הפועלים יחד לניטרול סולפיט באופן בו מתגברת פעילותם של SO, SIR, SQD1, MST1-2 המנצלים סולפיט ומופחתת פעילותם של APR 3 שונים הפועלים להגברת סולפיט (ראה בניסוח 7 ו-8 A Figure) באפנדיקס כמו גם (Supplemental 11).

## 6. ספרות מצוטטת

1. Anonymous. (1986). GRAS status of sulfating agents for use on fresh and frozen foods revoked. Federal Register 51, 25021.
2. Anonymous. (1989). Pesticide tolerance for sulfur dioxide. Federal Register 54, 20125-20126.
3. Brychkova, G., Xia, Z., Yang, G.H., Yesbergenova, Z., Zhang, Z., Davydov, O., Fluhr, R., and Sagi, M. (2007). Sulfite Oxidase protects plants against sulfur dioxide toxicity. Plant J. in press.
4. Clary, C.D., Schmidtgal-McMillan, D., and Petrucci, V.E. (2005). A method for reducing the amount of sulfur used to produce golden raisins. Applied Engineering. in Agriculture 21, 473-477.
5. Eilers, T., Schwarz, G., Brinkmann, H., Witt, C., Richter, T., Nieder, J., Koch, B., Hille, R., Hansch, R., and Mendel, R.R. (2001). Identification and biochemical characterization of *Arabidopsis thaliana* sulfite oxidase - A new player in plant sulfur metabolism. Journal of Biological Chemistry 276, 46989-46994.
6. Gabler, F.M., Smilanick, J.L., Ghosop, J.M., and Margosan, D.A. (2005). Impact of postharvest hot water or ethanol treatment of table grapes on gray mold incidence, quality, and ethanol content. Plant Disease 89, 309-316.
7. Hansch, R., and Mendel, R.R. (2005). Sulfite oxidation in plant peroxisomes. Photosynthesis Research 86, 337-343.
8. Kopriva, S. (2006). Regulation of sulfate assimilation in Arabidopsis and beyond. Ann Bot (Lond) 97, 479-495.
9. Li Y and Zhao M. 2006. Simple methods for rapid determination of sulfite in food products. Food Control 17, 975-980.
10. Lichter, A., Zhou, H.W., Vaknin, M., Dvir, O., Zutchi, Y., Kaplunov, T., and Lurie, S. (2003). Survival and responses of Botrytis cinerea after exposure to ethanol and heat. Journal of Phytopathology 151, 553-563.
11. Papenbrock, J., and Schmidt, A. (2000). Characterization of two sulfurtransferase isozymes from Arabidopsis thaliana. Eur J Biochem 267, 5571-5579.
12. Ribereau-Gayon, P., Dubourdiou, D., Doneche, B., and Lonvaud, A. (1999). The use of sulfur dioxide in must and wine treatment. In Handbook of Enology (New York: John Wiley and Sons, Ltd. ), pp. 179-203.
13. Sanda, S., Leustek, T., Theisen, M.J., Garavito, R.M., and Benning, C. (2001). Recombinant Arabidopsis SQD1 converts udp-glucose and sulfite to the sulfolipid head group precursor UDP-sulfoquinovose in vitro. J Biol Chem 276, 3941-3946.
14. Tsakraklides, G., Martin, M., Chalam, R., Tarczynski, M.C., Schmidt, A., and Leustek, T. (2002). Sulfate reduction is increased in transgenic Arabidopsis thaliana expressing 5'-adenylylsulfate reductase from Pseudomonas aeruginosa. Plant J 32, 879-889.
15. Winkler, A.J., and Jacob, H.E. (1925). The utilization of sulfur dioxide in the marketing of grapes. Hilgardia 1, 107-131.
16. Smilanick, JL; Harvey,-JM; Hartsell,-PL; Henson,-DJ; Harris,-CM; Fouse,-DC; Assemi,-M (1990a) Influence of sulfur dioxide fumigant dose on residues and control of postharvest decay of grapes. Plant Disease. 74, 418-421.
17. Smilanick,-JL; Harvey,-JM; Hartsell,-PL; Henson,-DJ; Harris,-CM; Fouse,-DC; Assemi, M (1990b) Factors Influencing Sulfite Residues in Table Grapes After Sulfur Dioxide Fumigation. Am. J. Enol. Vitic. 41:2:131-136
18. Yesbergenova, Z., Yang, G., Oron, E., Soffer, D., Fluhr, R. and Sagi, M. (2005) The plant Mhydroxylases aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase have distinct reactive oxygen species signatures and are induced by drought and abscisic acid. Plant J. 42, 862-876.

## 7. 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.

<p><b>מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.</b></p> <p>מטרתנו הכללית היא להגביר את יעילות השימוש בגד"ח כחומר למניעת התפתחות מחלות באחסון בעגבנייה כמודל לשימוש בפירות וירקות אחרים. מטרותינו הספציפיות הן:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. אופטימיזציה של ביטוי SO בפרי העגבנייה בתגובה לחשיפה לגד"ח.</li> <li>2. להשפיע על יכולת הנטרול של סולפיט בפרי כדי להקנות הגנה לרקמות הפרי מנוקי סולפיט.</li> <li>3. קביעת מטבוליטים שהינם תוצאה של טיפולים בגד"ח בעגבנייה.</li> </ol>
<p>עיקרי הניסויים והתוצאות:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- ייצרנו צמחים הומוזיגוטים שמבטאים את SO<sub>2</sub> ו-SiR ביתר ובחסר (קושי בייצור האחרונים בגלל נטייה לטאליות). צמחי SIR בחסר נמצאים כרגע ביצור זרעים להמשך המחקר.</li> <li>- הצגנו את היתרון לביטוי יתר של SO<sub>2</sub> ו-SiR לנטרול סולפיט.</li> <li>- הדגמנו את הפוטנציאל של שימוש ב-SO<sub>2</sub> למניעת התפשטות מחלות אחסון (הודגם בבוטריטיס וקולוטטריקום).</li> <li>- הדגמנו את השפעת טיפול ב-SO<sub>2</sub> על נזק שיכול להופיע בפרי ובעלי הגביע ואת חשיבות הביטוי של גנים (בחלקי הצמח הנמכר באשכולות) אשר תוצריהם יכולים לנטרל סולפיט.</li> <li>- נמצא שריכוז סולפיט בקליפה ובפרי לאחר טיפול זניח ואינו בר השפעה על המטבוליטים שנבחנו.</li> </ul>
<p>מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?</p> <p>הדגמנו את הפוטנציאל של שימוש בגד"ח למניעת התפשטות מחלות אחסון (הודגם בבוטריטיס וקולוטטריקום) ואת חשיבות הביטוי של גנים (בפירות וגם בחלקי צמח ירוקים) אשר תוצריהם יכולים לנטרל סולפיט (הודגם SO<sub>2</sub> ו-SiR). הצגנו מערכת גנים הפועלים יחד לניטרול סולפיט באופן בו מתגברת פעילותם של SIR SO MST1-2 SQD1 SIR SO המנצלים סולפיט ומופחתת פעילותם של APR 3 שונים הפועלים להגברת סולפיט</p>
<p>בעיות שנתרו לפתרון/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתורה לביצוע תוכנית המחקר? להמשיך ולכיייל את ריכוז SO<sub>2</sub> באידוי למניעת מחלות מצד אחד ונזק לפרי מצד שני בקווים שמבטאים את הגן SiR ביתר או בחסר. בדיקת השפעת גנים נוספים (ל-SO<sub>2</sub> ו-SiR) העשויים להשפיע על נטרול גד"ח (סולפיט).</p>
<p>הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: <b>פרסומים בכתב</b> - <u>ציטט</u> ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; <b>פוטנטים</b> - יש לציין שם ומס' פטנט; <b>הוצאות וימי עיון</b> - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי. מאמר בהכנה, עדיין אין פירסום!</p>
<p><b>פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)</b></p>
<p>√ רק בספריות</p>
<p>ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)</p>
<p>חסוי – לא לפרסם</p>
<p>האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? - לא בשלב זה</p>

## Appendix



**A-Fig. 1** Morphological description of T<sub>0</sub> generation of OE SiR lines. (A) line #2, left - leaf, middle - flowers, right – fruits; (B) line #14, left – leaf, right - flower branch, (C) line #11, left leaf, right – fruit development, (D) line #3, left – leaf, right – forked fruit branch



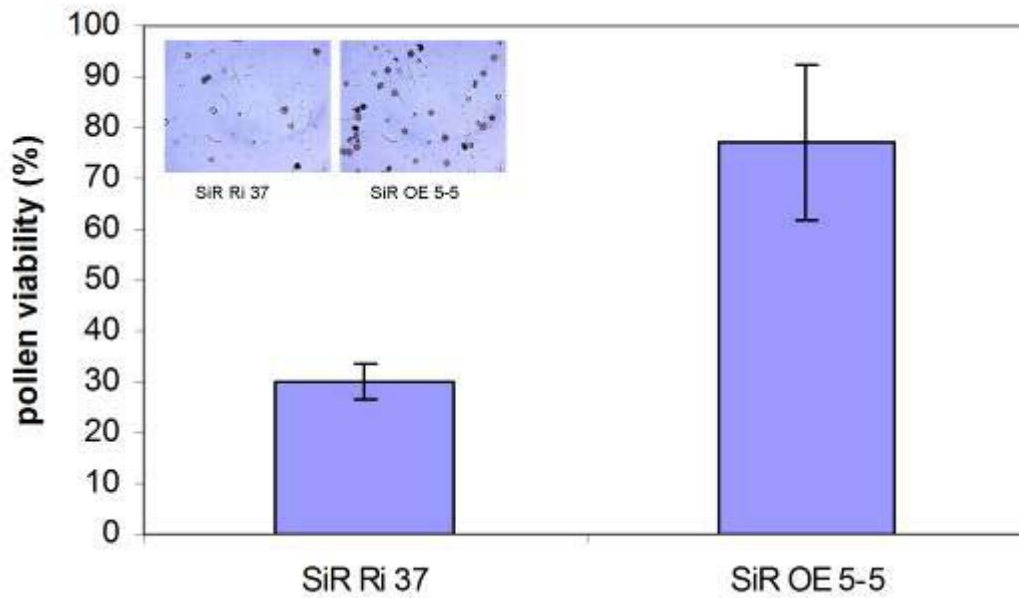
**A-Table 1.** Characterization of transgenic T<sub>0</sub>-lines transformed for SiR

Gene expression	Code no #	first fruit harvest (days after transplanting)	Total no of fruits	Total fruit weight (g)	Ave fruit weight (g)	Kanamycine resistant (No of plants)	Kanamycine sensitive (No of plants)	Germination rate
OE	1	68	14	299.1	21.4	0	10	n.d.
OE	2	66	37	612.3	16.5	0	35	30
OE	3	52	75	627.7	8.4	18	6	n.d.
OE	4	73	42	498.3	11.9	0	27	56
OE	5	52	40	476.4	11.9	43	38	94
OE	6	73	15	155.2	10.3	13	3	80
OE	7	59	26	329.7	12.7	8	6	76
OE	8	73	13	170.7	13.1	5	1	28
OE	9	113	24	178.4	7.4		n.d.	28
OE	10	55	27	308.5	11.4	42	16	82
OE	10A	55	27	295.0	10.9		n.d.	n.d.
OE	11	63	49	578.3	11.8	41	20	75
OE	12	73	17	247.2	14.5	27	16	88
OE	13	170	8	65.9	8.2		n.d.	n.d.
OE	14	61	25	275.4	11.0	22	5	70
OE	15	132	3	11.9	4.0		n.d.	n.d.
OE	16	92	32	283.8	8.9		n.d.	12
OE	17	84	17	150.4	8.8	1	1	36
OE	18	104	14	163.7	11.7	6	0	72
OE	19	88	22	240.8	10.9	10	9	92
OE	20	84	19	205.1	10.8	13	4	96
OE	21	88	27	324.2	12.0	13	8	96
OE	22	80	25	287.4	11.5	15	8	96
OE	23	124	35	276.5	7.9	0	5	52
OE	24	110	19	238.1	12.5	0	18	80
OE	25	70	28	390.5	13.9	0	21	100
OE	26	101	64	146.7	2.3	15	5	92
OE	27	71	18	140.9	7.8	4	12	84
OE	28	73	11	78.4	7.1	10	10	88
OE	29	92	25	256.1	10.2	16	2	80
OE	30	92	21	240.6	11.5	12	6	80
OE	31	78	7	64.9	9.3		n.d.	8
OE	32	78	3	22.5	7.5		n.d.	n.d.
OE	33	125	1	5.3	5.3		n.d.	n.d.
OE	34	102	2	11.6	5.8		n.d.	n.d.
OE	35	105	2	18.2	9.1		n.d.	n.d.
OE	36	n.d.					n.d.	n.d.
OE	42	n.d.					n.d.	n.d.
OE	43	90	3	16.0	5.3		n.d.	n.d.
OE	44	110	3	31.5	10.5		n.d.	n.d.
OE	45	74	16	239.4	15.0	9	5	96
OE	46	92	3	25.8	8.6		n.d.	n.d.
OE	47	94	6	75.3	12.6		n.d.	8
Ri	37	157	few	5.4	5.4			4
Ri	38	73	16	252.1	15.8	0	185	100
Ri	39	76	26	378.9	14.6	0	145	97
Ri	40	n.d.				116	32	99
Ri	41	dead						

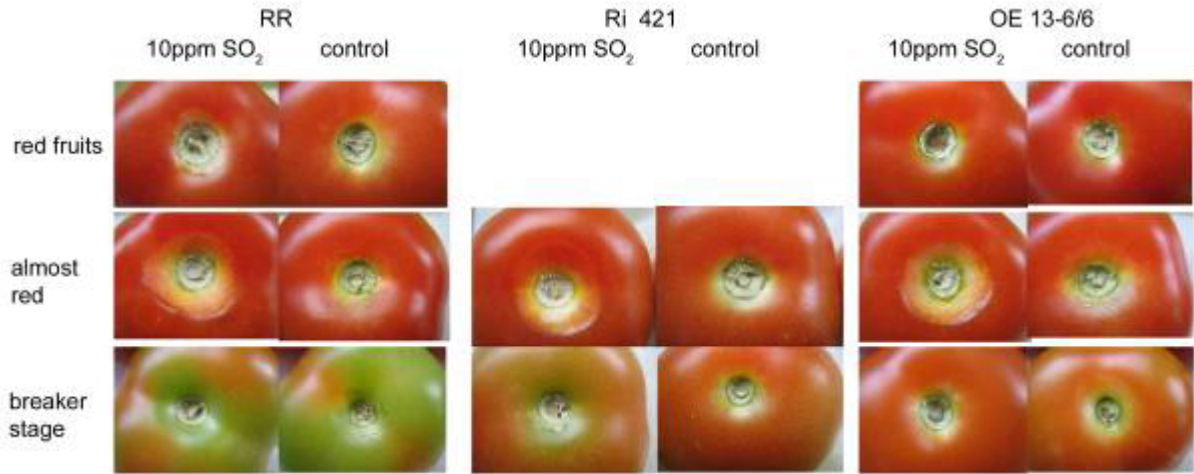
n.d. = not determined



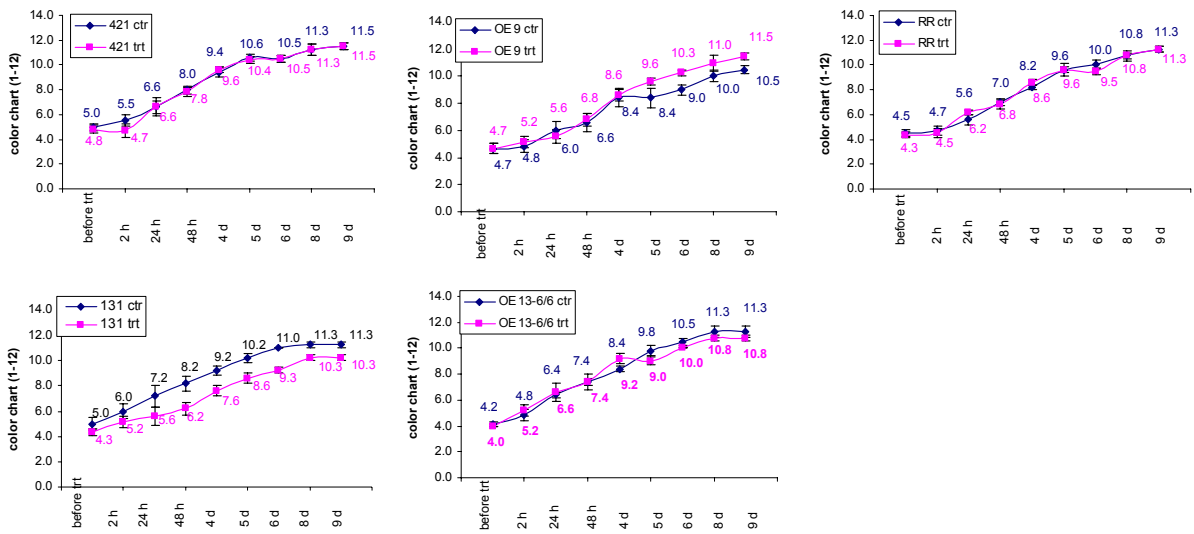
**A-Fig. 2** Fruits of SiR Ri line #40, beginning of abortion (left), all fruits are aborted premature (right).



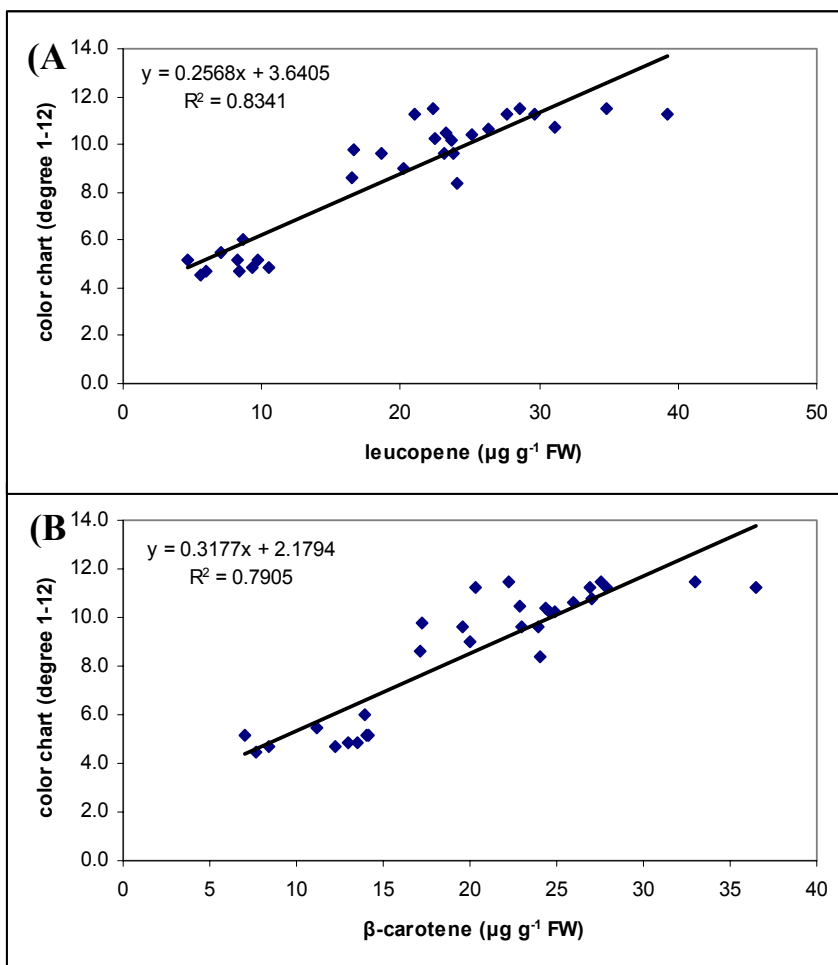
**A-Fig. 3** Pollen viability in plant T<sub>0</sub> SiR Ri 37 in comparison to T<sub>1</sub> SiR OE 5-5 (homozygous). Inserts: pollen quantity and appearance after MTT stain (viable pollen is colored dark pink to purple).



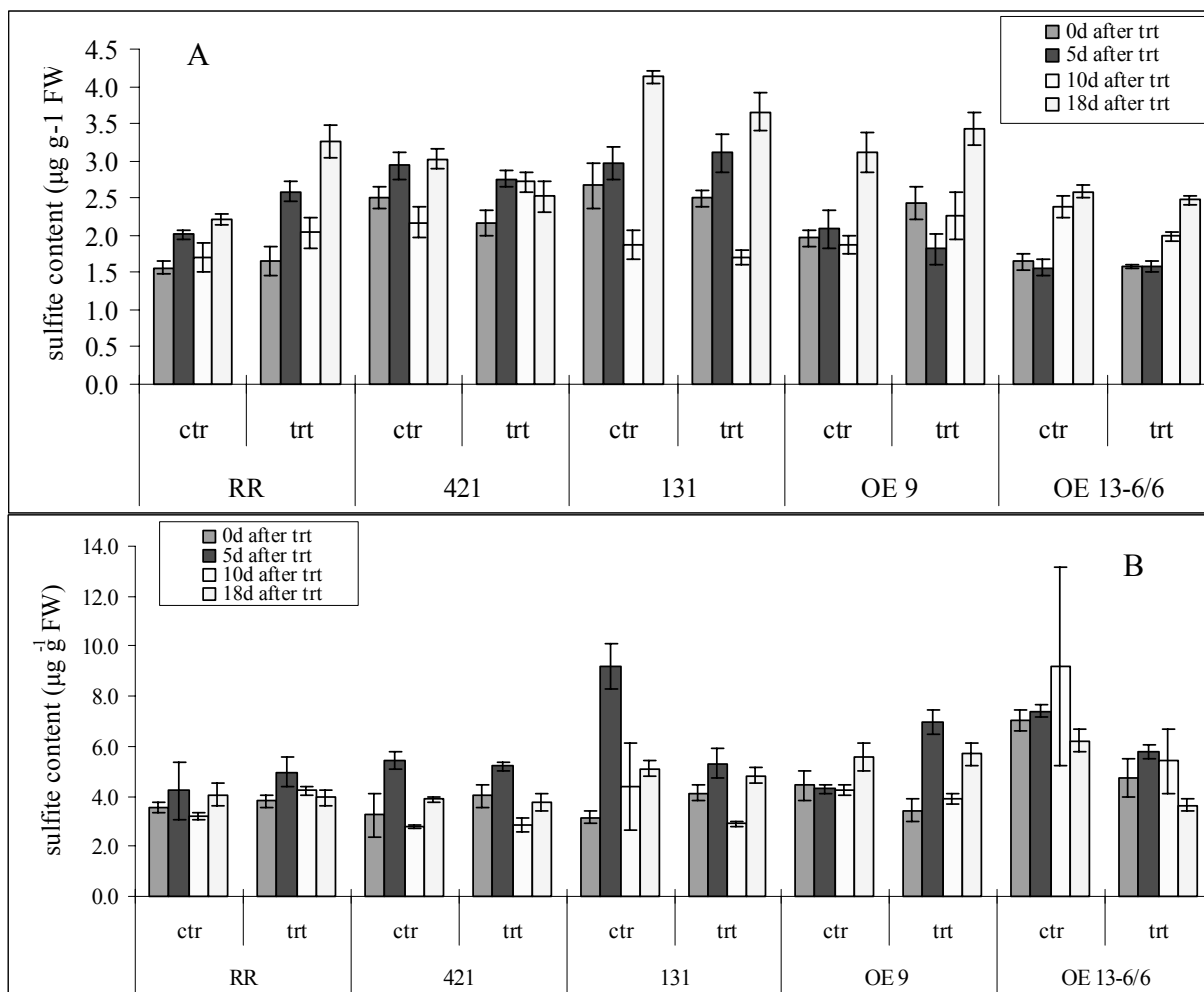
**A-Fig. 4** Damage observation on tomato fruits after SO<sub>2</sub> fumigation. Fruits in 3 ripening stages of wild type (RR), Ri 421 and OE 13-6/6 lines were treated with 10ppm SO<sub>2</sub> for 4.5h. Control fruits were kept in equal conditions with ventilated air. Subsequent treatment, fruits were stored at 25<sup>0</sup>C and pictures were taken 1.5 days after treatment.



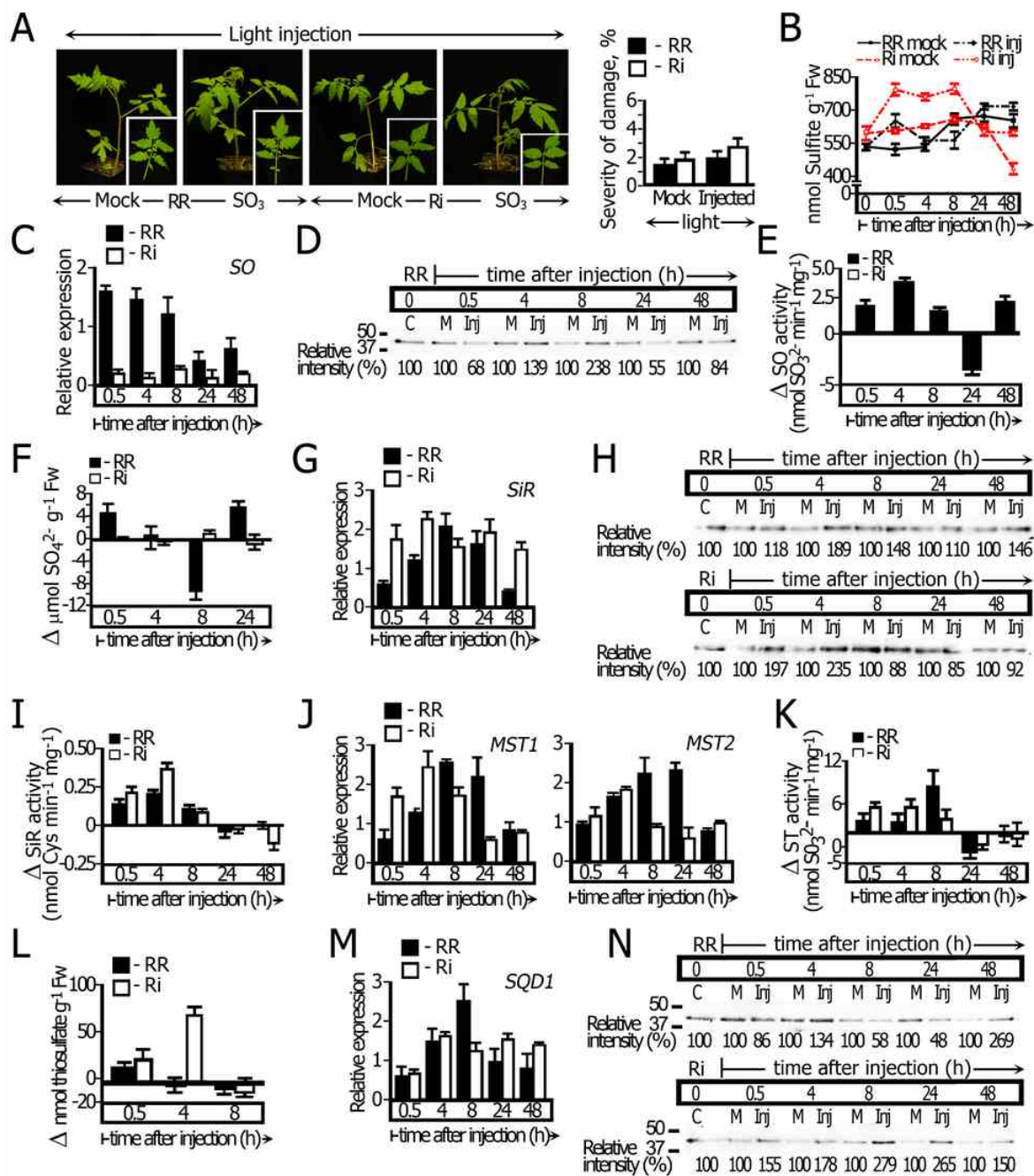
**A-Fig. 5** Fruit color development during 9d of storage after SO<sub>2</sub> treatment with 10ppm for 2h. Values are means±SE (n=4-6).



**A-Fig. 6** Correlation between visual observation by color chart and the content of leucopene (A) and  $\beta$ -carotene (B) in tomato fruits



**A-Fig 7.** Sulfite content of tomato fruits (A) and peel (B) after SO<sub>2</sub> treatment (10ppm for 2h) determined by the DTNB method



A Fig. 8. Sulfite network enzymes response to sulfite injection of 0.5 mM in RR (Wild-type) and **SO impaired plants (Ri)**.

(A) The effect of 0.5 mM sulfite injection on 6-weeks old RR and **SO-Ri plants** vs mock injection with water documented 72 h after injection under normal day/night regime (left) and presented as a severity of damage (right).

(B) Sulfite level in RR and **SO-Ri** mutants after injection with water (mock) and sulfite (inj). Error bars indicate SE (n=3).

qRT-PCR analysis of *SO* (C), *SiR* (G) *MSTs* (J) and *SQD1* (M) genes. The relative expression after normalization to *TFIID* is presented as a relative expression to corresponding mock injected plants at corresponding time point (set as 1.0). Error bars indicate SE (n=3).

Response of SO (**D**), SQD1 (**N**) and SiR (**H**) proteins to injected sulfite. Proteins (10 µg per lane) were fractionation by SDS-PAGE (SO and SQD1) or native-PAGE (SiR) followed by immunoblotting with corresponding antibodies. C – non-injected control, M – mock injected, Inj – sulfite injected plants.

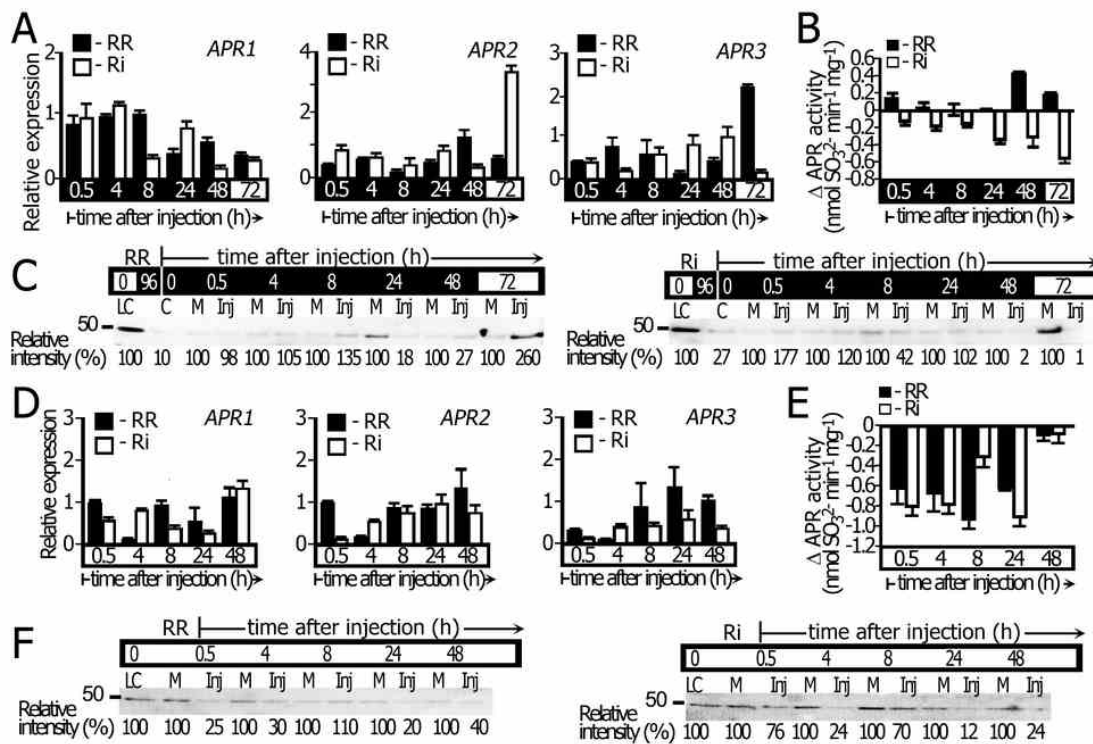
(**E**) Activity of SO enzyme assayed using ferricyanide reduction reaction is presented as delta of activity of sulfite vs mock injected plants ( $\Delta Inj$ ) at each time point in wild-type and SO Ri mutants. The starting SO activities were  $10.8 \pm 0.26$  nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> and  $1.7 \pm 0.48$  nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> for RR and Ri, respectively. Error bars indicate SE (n=6).

(**F**) Sulfate and (**L**) thiosulfate response to injection is presented as  $\Delta Inj$  at each time point. Sulfate content in the beginning of injections was  $12.5 \pm 0.27$  µmol g<sup>-1</sup> Fw and  $19.8 \pm 1.92$  µmol g<sup>-1</sup> Fw for RR and Ri plants, respectively. Thiosulfate content in control plants was  $23.8 \pm 2.26$  nmol g<sup>-1</sup> Fw and  $59.5 \pm 1.36$  nmol g<sup>-1</sup> Fw for RR and Ri plants, respectively. Error bars indicate SE (n=6).

(**I**) Specific SiR activity in response to injection was determined by kinetic coupled SiR-OAS cysteine generation reaction and presented as  $\Delta Inj$  at each time point. The starting SiR activities were  $0.8 \pm 0.09$  nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> and  $1.09 \pm 0.08$  nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> for RR and Ri, respectively. Error bars indicate SE (n=6).

(**K**) The effect of sulfite injection on specific sulfite dependent tungstate-inhibited thiosulfate generating sulfurtransferase (ST) activity was assayed as SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> disappearance and presented as  $\Delta Inj$  at each time point. The starting TgST activities were  $3.74 \pm 0.40$  nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> and  $5.66 \pm 0.57$  nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> for RR and Ri, respectively. Error bars indicate SE (n=6).

Plant	Levels prior the injection, (n=6)				
	SO activity, nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup>	SiR activity, nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup>	ST activity, nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup>	Sulfate, µmol g <sup>-1</sup> Fw	Thiosulfate, nmol g <sup>-1</sup> Fw
RR	10.8±0.26	0.8±0.09	3.74±0.40	12.5±0.27	23.8±2.26
Ri	1.7±0.48	1.09±0.08	5.66±0.57	19.8±1.92	59.5±1.36



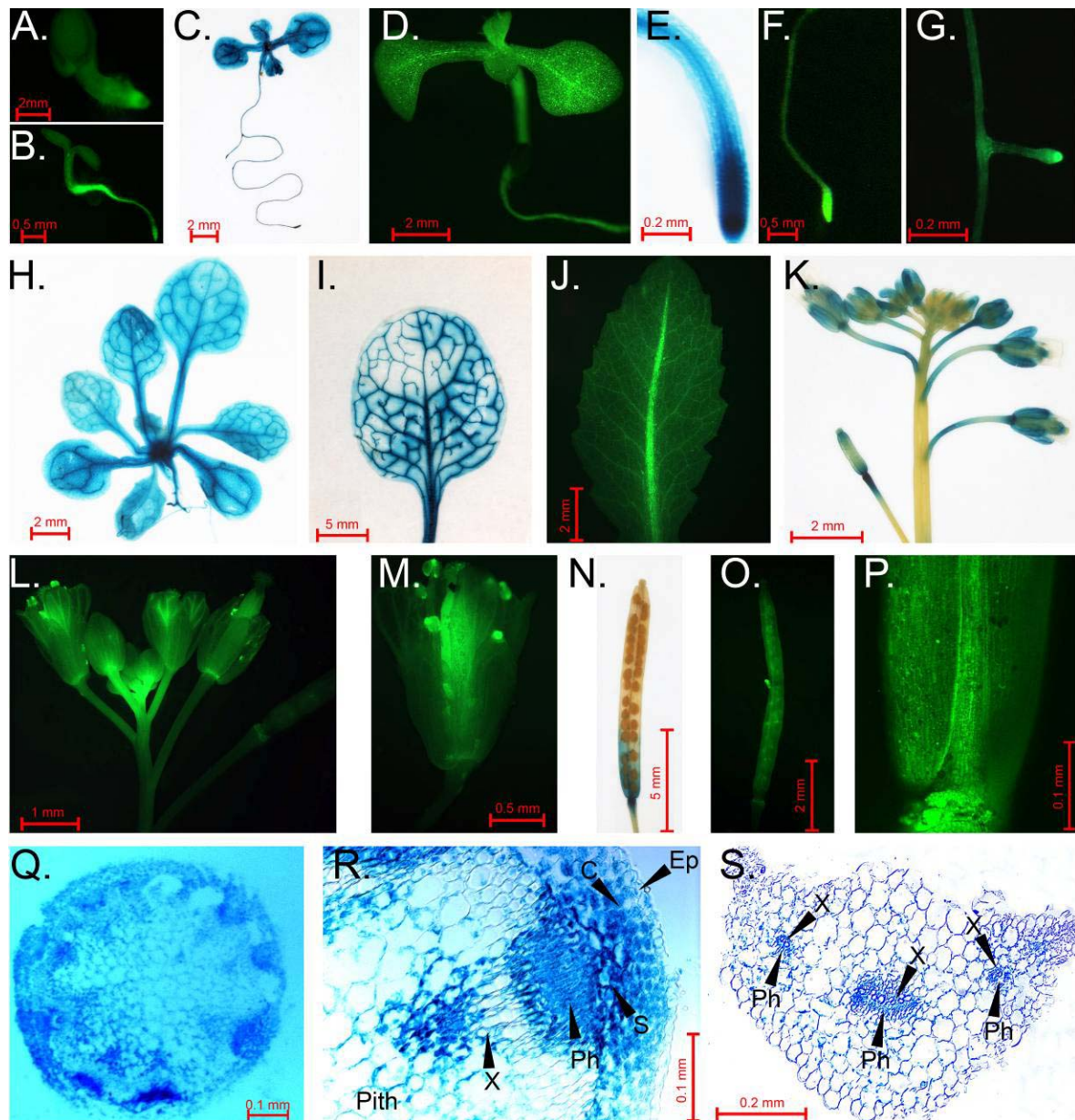
A Fig. 9. Response of the sulfite producing enzyme APR to sulfite injection coupled in RR and **SO impaired plants**.

qRT-PCR analysis of *Tomato* APRs genes response to sulfite injection in the dark (A) or under normal conditions (D). The relative expression after normalization to *TFIID* is presented as a relative expression to corresponding mock injected plants at corresponding time point (set as 1.0). Error bars indicate SE (n=3).

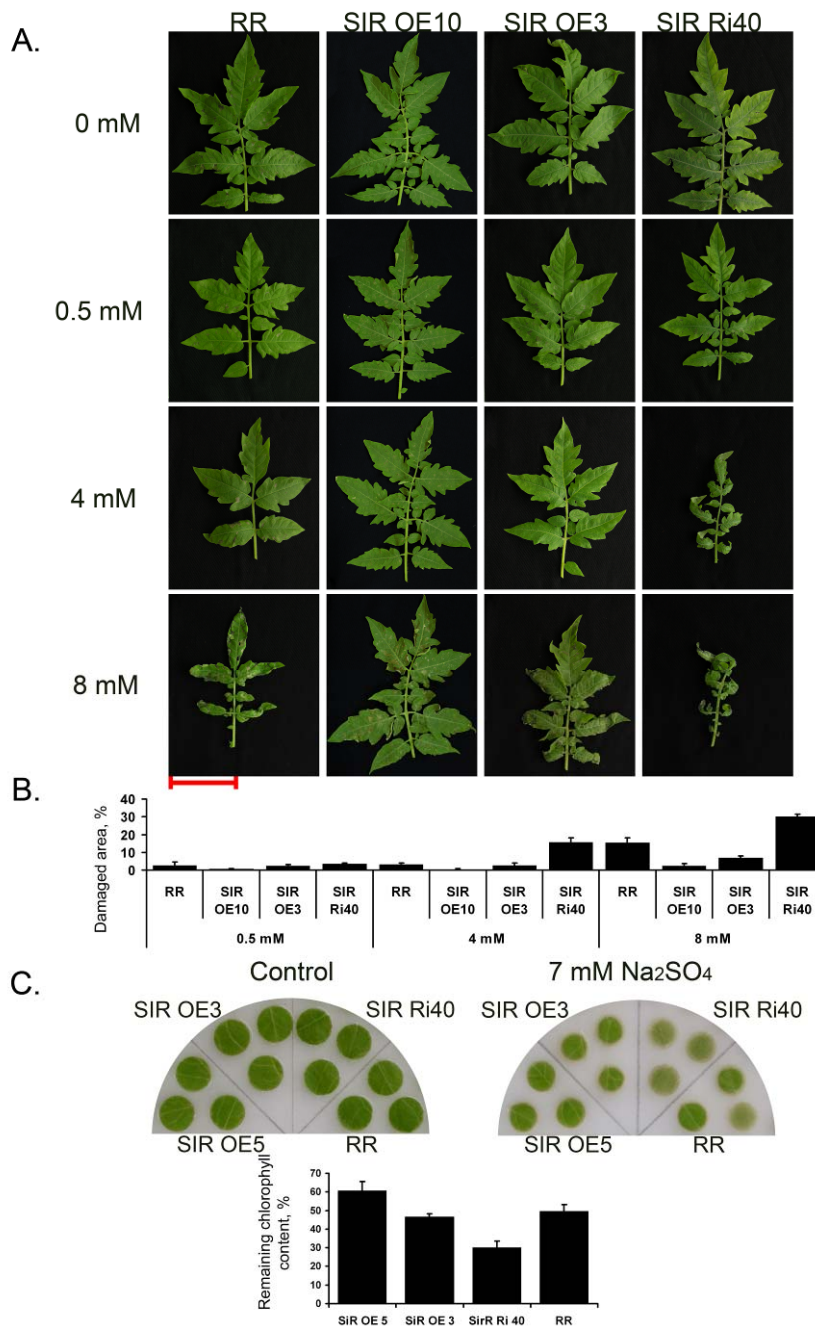
APR enzyme activity response to sulfite injection in RR and *SO*- Ri tomato plants upon sulfite injection in the dark (B) and under normal conditions (E) is presented as  $\Delta$ Inj at each time point. The starting APR activities upon dark injection were  $0.73 \pm 0.07 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  and  $0.90 \pm 0.21 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  for RR and Ri, respectively. The starting APR activities upon injection under normal conditions were  $1.01 \pm 0.09 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  and  $1.30 \pm 0.11 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  for RR and Ri, respectively. Error bars indicate SE (n=6).

Response of APR proteins in RR and *SO*-Ri mutants to sulfite injection in the dark (C) or under normal conditions (F). 10  $\mu\text{g}$  proteins were fractionated by SDS-PAGE under denaturing conditions and immunoblotted with APR specific antibodies.



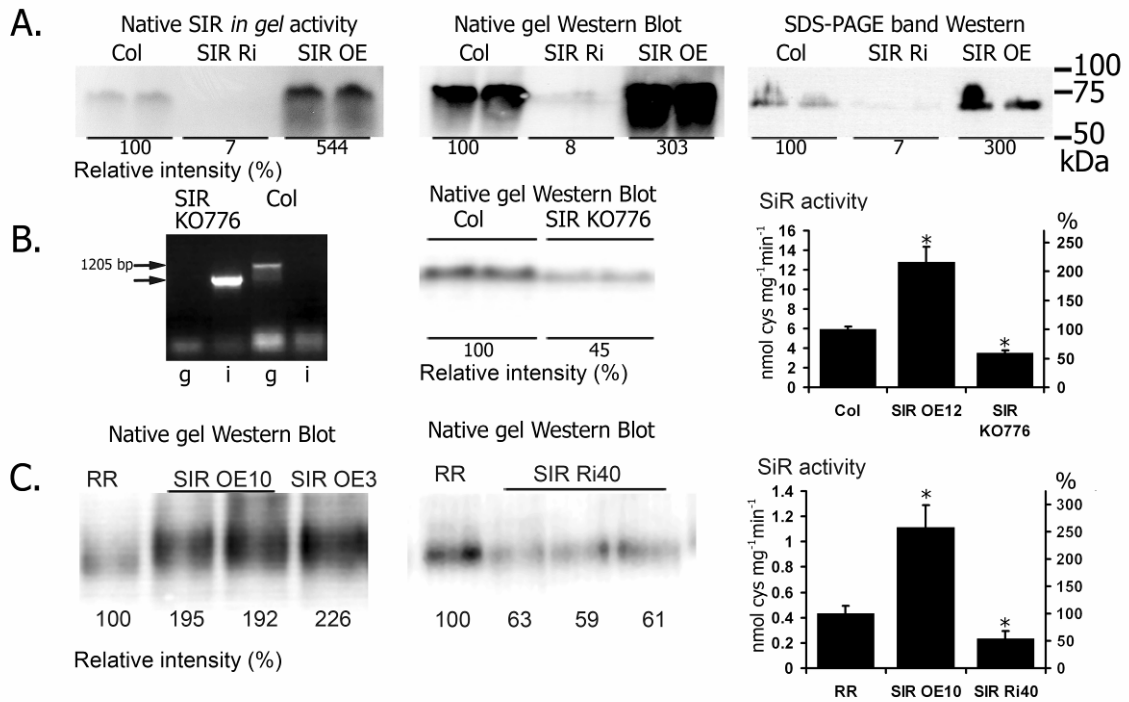


A. Fig.10. Activity of the 2 kb SiR promoter region fused with the reporter genes at different developmental stages of Arabidopsis plants. A., B. and D. – Seedlings expressing Dronpa under the SiR promoter control in 1, 3 and 10 days of development. C. and E. – GUS activity in 10-day-old seedling and its root tip, respectively, F. and G. – Dronpa fluorescence in a main root tip (F.) and in an adventive root (G.) of 10-day-old seedling, H.– GUS staining in whole plant in the age of 3 weeks (the root part was removed), I. and J. - GUS and Dronpa expression in rosette leaves of transgenic plants, K. and L. - inflorescences of transgenic plants expressing GUS and Dronpa, respectively, M. – a flower with activity of Dronpa, N. and O. - siliques of plants expressing GUS and Dronpa, respectively, P. – Dronpa expression in basal part of a silique, Q. and S. - GUS staining in flowering stalk and in leaf petiole, R. – GUS activity in a bundle of flowering stalk. Ep – epidermis, C - cortex chlorenchyma, S - S-cells, Ph - phloem zone; X - xylem zone.



A Fig.11. Toxicity of sulfite for tomato **plants with modulated SiR activity**. A. - Responses of wild-type (RR), SiR over-expression (SIR OE3) and SiR RNA interference lines (SIR Ri40) to sulfite injections. Leaves were collected and photographed in 24h after injections with different concentrations of sodium sulfite. Scale bar corresponds to 5 sm. B. – Data on damage level of tomato leaves summarized from three experiments. Damaged area was calculated as a discrepancy between a percentage of damage area on sulfite treated leaves and the same value of their controls injected only with water. Bars are average  $\pm$  SE (n=3). Asterisks show statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) from wild-

type. C. – Sulfite damage of tomato leaf disk developed after overnight incubation. The level of remaining chlorophyll is shown as a mean± SE.

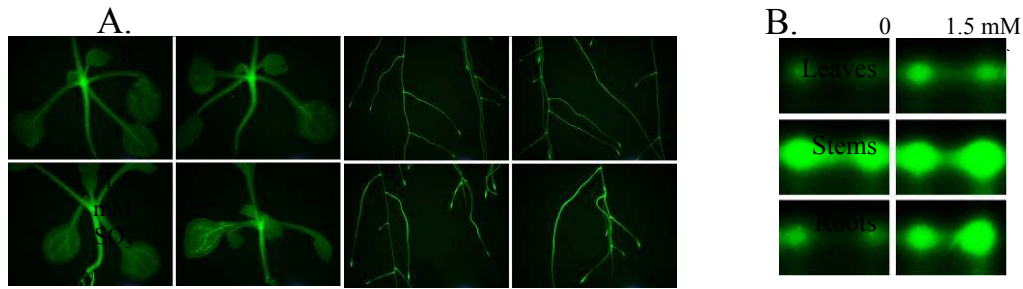


A Fig. 12 SiR expression in wild-type and mutated lines with modulated SiR activity.

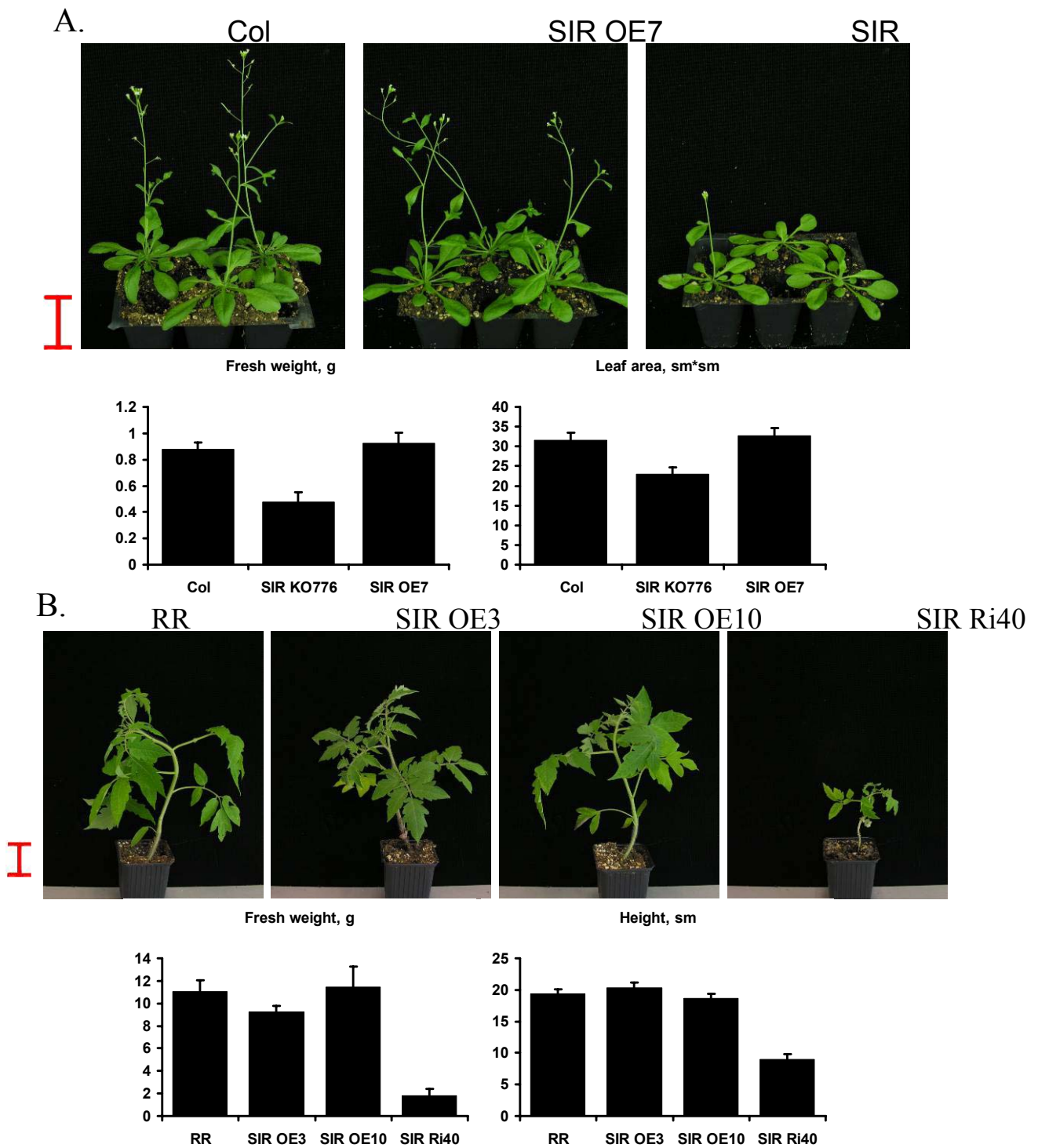
A. - SiR activity (left) and SiR protein level (middle) in Arabidopsis wild-type (Col), SiR RNA interference lines (SIR Ri) and SiR over-expression lines (SIR OE). SiR activity in gels was validated by SDS-PAGE Western (right).

B. – Characterization of SIR-KO776 as a T-DNA insertion line with decreased SiR activity. Identification of the line (left) was carried out using PCR with 2 pairs of primers: to the insertion and to the genomic region surrounding the site of the insertion (g). In addition, the line was verified with Western-immunoblotting (middle) and SiR activity assay (right).

C. – Modulation of SiR protein level (left and middle) and SiR activity (right) in tomato SiR over-expressing (SIR OE) and RNA interference (SIR Ri) lines. The average relative intensity is shown for Western blot and SiR activity in gel. Values on the SiR activity histograms are mean ± SE (n=3).

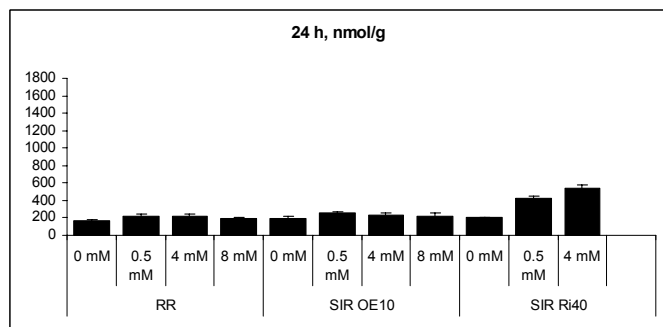
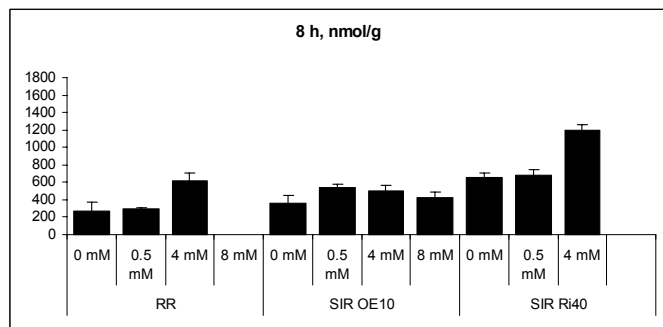
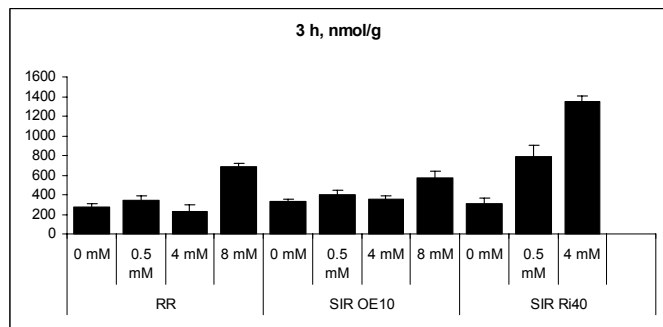
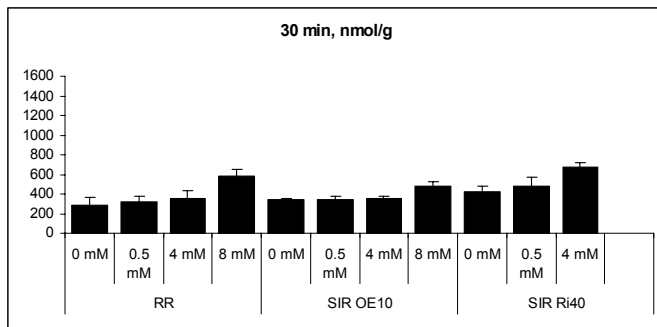


A. Fig 13– Induction of the Dronpa gene under control of the SiR promoter in plants treated by sodium sulfite. Plants were transferred to sulfite containing medium in the age of 6 days. Pictures of seedlings were taken on the 4<sup>th</sup> day. The enhanced Dronpa fluorescence was detected in the treated plants (the lower panel) in comparison with the control plants (the upper panel) transferred to the medium without sulfite. B. – Fluorescence of Dronpa isolated from plants treated with sulfite. Proteins were extracted from different parts of seedlings (leaves, stems and roots) and were loaded on native polyacriamide gel. Pictures of the area containing Dronpa were taken using blue light for illumination.

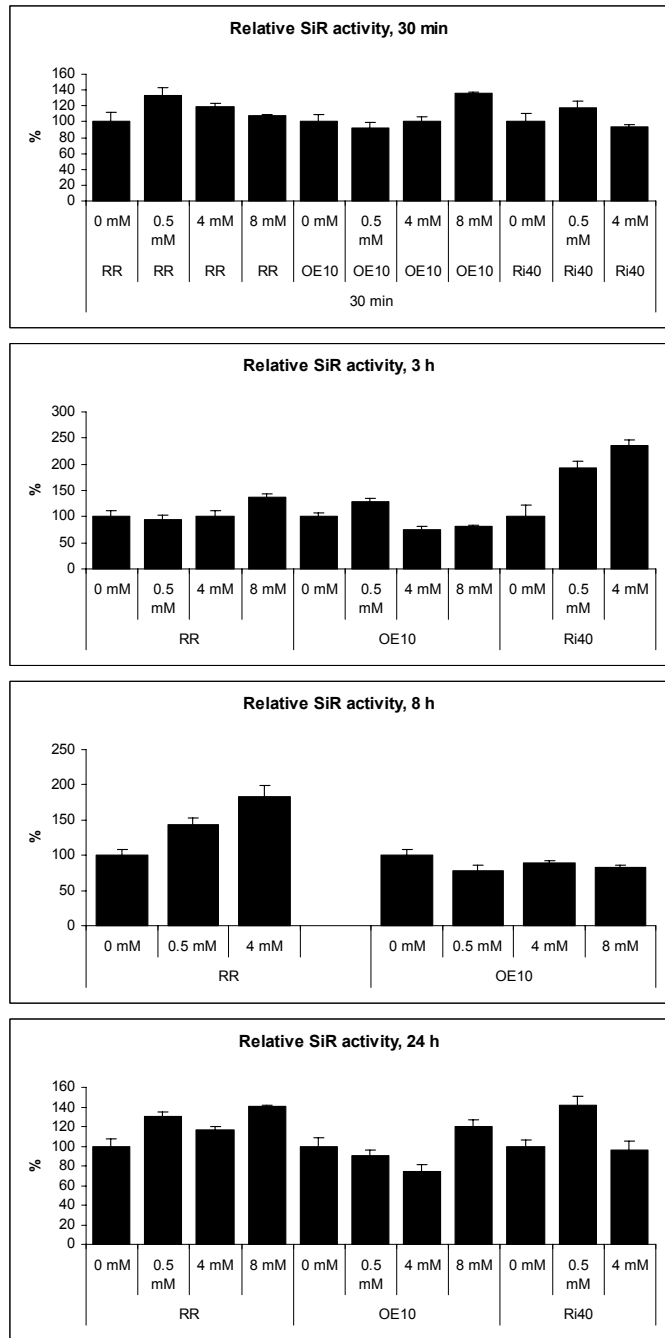


A Fig. 14. Phenotype of plants with modulated SiR activity. A. – Arabidopsis plants with over-expressed (SIR OE7) and suppressed SiR level (SIR KO-776) in the age of 1 month. Fresh weight of plants and leaf area are shown. The values are mean  $\pm$  SE (n=6). B. – Tomato plants transformed with the constructs for over-expression (SIR OE3 and 10) and RNA interference (SIR Ri40) of SiR gene. The age of the plants is 1.5 month. Fresh weight and height of plants are

shown in the histograms as mean values  $\pm$  SE (n=7). The scale bars correspond 2 sm.



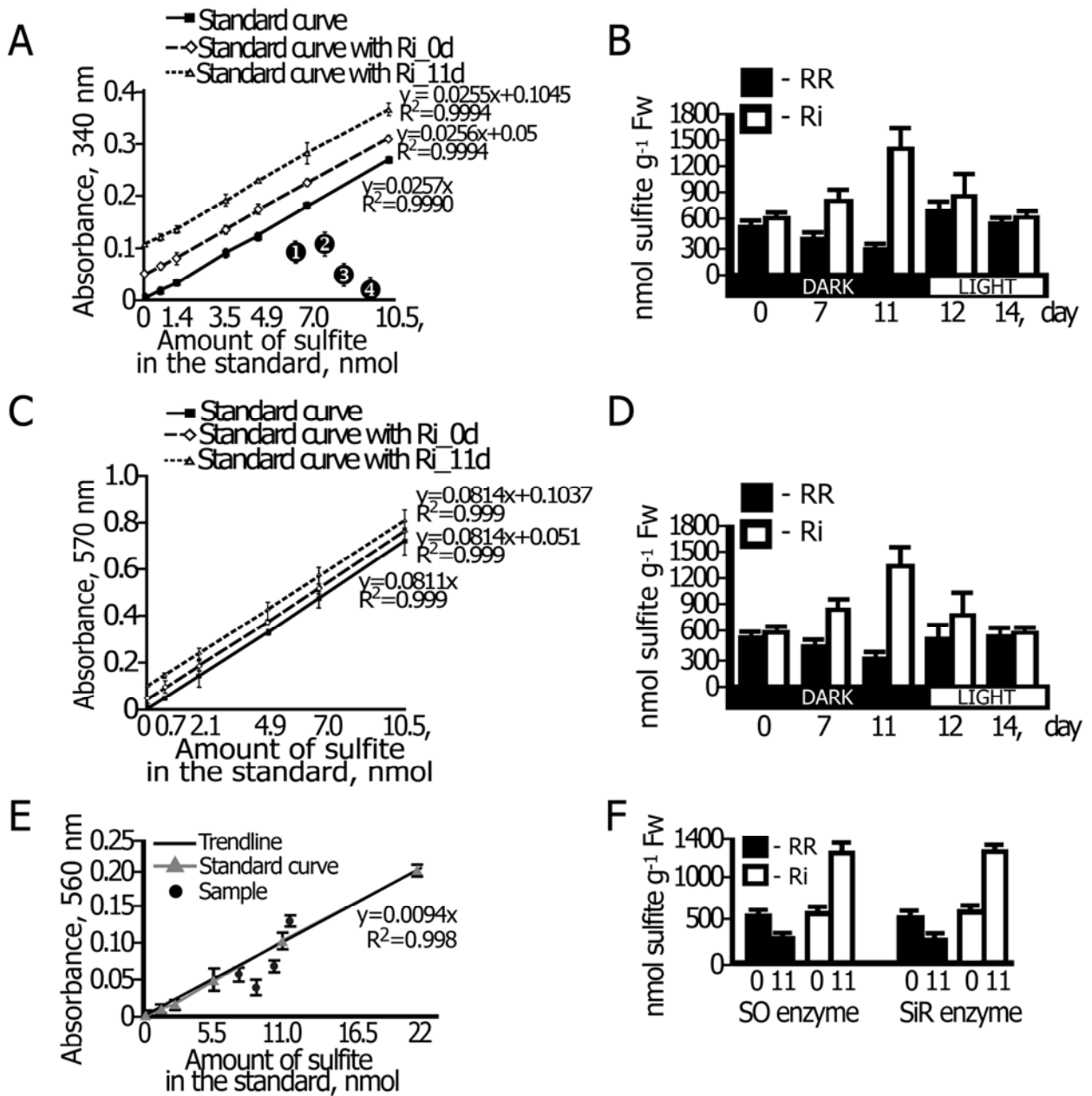
A Fig. 15 Sulfite content in tomato plants after sulfite injections.



A Fig. 16. SiR activity in tomato plants after sulfite injections.



SUPPLEMENTAL FIGURES



**Supplemental 1.** Comparison of different sulfite detection methods.

(A) Detection of sulfite using sulfite SO/NADH-POD coupled reaction method. Verification of sulfite detection by chicken sulfite oxidase by linearity of standard curve with and without deproteinized plant salt solution extracted with 0.5 mol Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 0.05 mol Tris-HCl, pH 8.3 from SO (Ri) mutants after 0d and 11d of dark incubation. In black circles is the comparison of different methods of sulfite extraction done from SO Ri 11 d dark-treated sample. ① - sulfite extracted from plant sample in 0.05 mol Tris-HCl, pH 8.3; ② - sulfite extracted from plant sample in 0.5 mol 0.05 mol Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.05 mol Tris-HCl, pH 8.3); ③ - sulfite extracted from plant sample in 0.05 mol MOPS, pH 7.0; ④ - sulfite

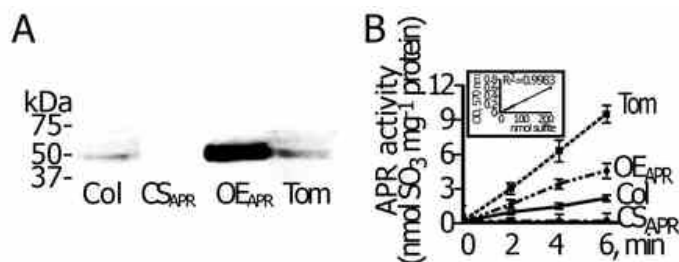
extracted from plant sample in 0.1N HCl, followed by neutralization by 0.08 N NaOH and substitution by 0.05 mol Tris-HCl, pH 8.3.

(C) Detection of sulfite was assayed using PRA system. The reliability of the system was verified by linearity of standard curve with and without deproteinized plant salt solution extracted with 0.5 mol Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.05 mol Tris-HCl, pH 8.3) from *SO* (Ri) mutants after 0d and 11d of dark incubation.

Comparison of sulfite detection with two different methods: SO/NADH-POD coupled reaction method (B) and PRA detection system (D). Detection of sulfite in RR and *SO* (Ri) mutants during dark stress and recovery afterward was done in the same samples with both methods. The data were from three biological replicates. Error bars indicate SE.

(E) Detection of sulfite by SiR/OASTL coupled reaction as amount of produced cysteine. Verification of sulfite quantification by linearity of standard curve produced with SiR/OASTL enzymes purified from Arabidopsis OE<sub>SiR</sub> plants. As <•> are presented OD of tomato samples.

(F) Sulfite detection using sulfite SO/NADH-POD coupled reaction method vs SiR/OASTL coupled reaction in wild-type and *SO* (Ri) mutants after 0d and 11d of dark incubation. The data were from three biological replicates. Error bars indicate SE.

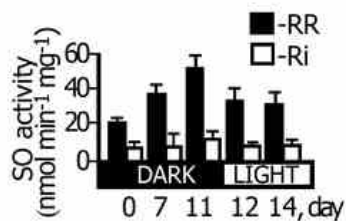


**Supplemental 2.** Verification of APR detection systems for Tomato plants.

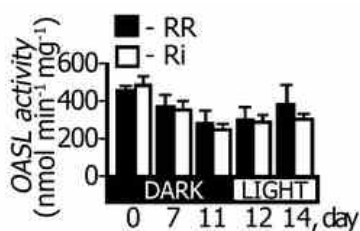
(A) Conformation of APR specific antibodies match to Tomato proteins by immunoblotting of *Arabidopsis* and Tomato proteins (10 µg) fractionated by SDS-PAGE under denaturing conditions;

(B) Conformation of the linearity and reliability of the modified APS-dependent sulfite generating APR activity kinetic assay. The sulfite standard curve is presented in square.

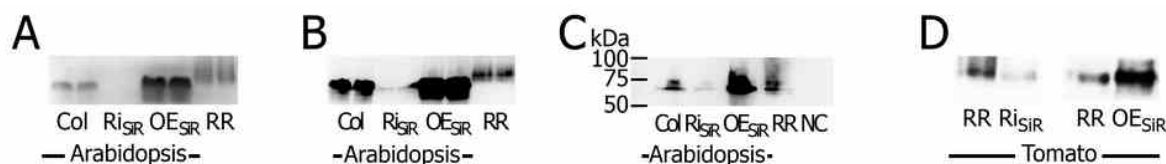
Col - wild-type *Columbia*, CS<sub>APR</sub> – plants with Co-suppression of *APR* gene, OE<sub>APR</sub> – plants over-expressing *APR* under 35S promoter, RR – wild-type tomato plants.



**Supplemental 3.** Sulfite oxidase activity assayed by ferricyanide reduction in RR and *SO*-Ri plants during extended dark treatment and subsequent recovery period. The data were from eight biological replicates. Error bars indicate SE.



**Supplemental 4.** O-acetyl-serine lyase activity in RR and *SO*-Ri plants during extended dark treatment and subsequent recovery period. Error bars indicate SE (n=3).



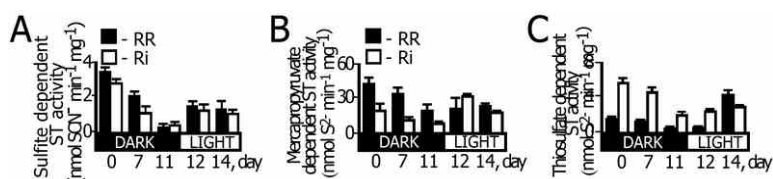
**Supplemental 5.** New direct SiR *in gel* activity detection method.

(A) SiR *in gel* activity visualized by brown PbS precipitation after protein fractionated under native conditions;

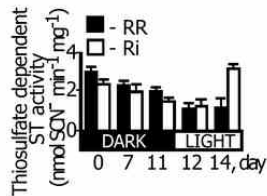
(B) Immunoblotting with SiR antibodies after protein fractionation by native-PAGE;

(C) Refraction of bands detected with PbS in SDS-PAGE followed by immunoblotting with SiR antibodies, Col- wild-type Columbia, Ri<sub>SiR</sub> – *SiR* RNAi plants, OE<sub>SiR</sub> – plants, overexpressing *SiR* under 35S promoter, RR – wild-type tomato plants, NC – negative control;

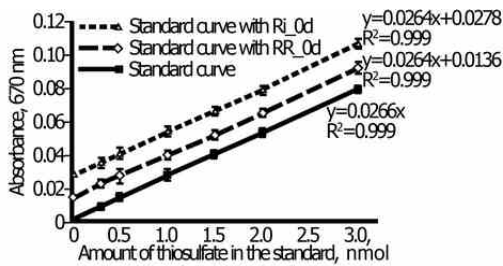
(D) Reliability of SiR antibodies by immunoblotting with protein extracted from RR, *SiR* RNAi (Ri<sub>SiR</sub>) and overexpression OE<sub>SiR</sub> tomato plants came after native-PAGE fractionation. 10 µg micrograms of protein were loaded in each lane.



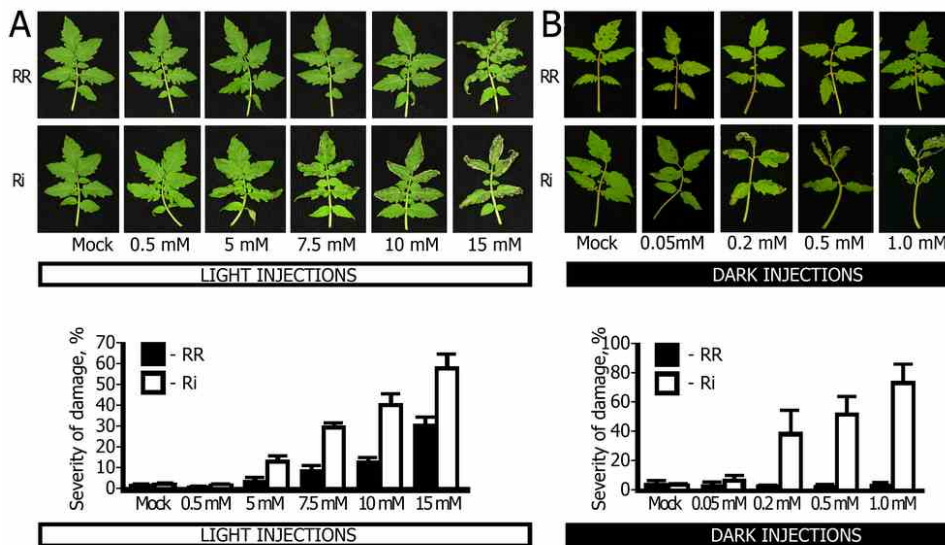
**Supplemental 6.** Sulfite dependent thiosulfate generating sulfurtransferase (TgST) activity based on  $\text{SCN}^-$  disappearance (A), mercaptopyruvate dependent (B) and thiosulfate dependent (C) rhodanase activity of MST enzymes of wild-type (RR) and *SO*-compromised plants (Ri) during dark treatment and subsequent recovery.



**Supplemental 6.** Thiosulfate dependent sulfite and  $\text{SCN}^-$  generating sulfurtransferase (ST) activity based on  $\text{SCN}^-$  appearance of wild-type (RR) and *SO*-compromised plants (Ri) during dark treatment and subsequent recovery.

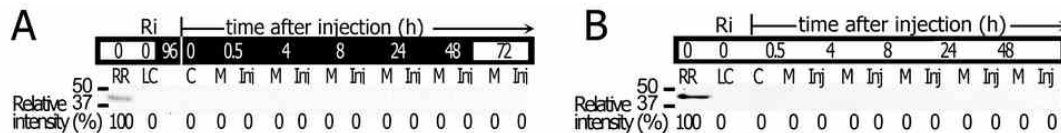


**Supplemental 7.** Detection of thiosulfate using bovine liver Rhodanase, typeII. Verification of thiosulfate detection using bovine liver Rhodanase was done by linearity of standard curve with and without deproteinized plant salt solution extracted from wild-type and *SO* (Ri) mutants grown under control day/night conditions.

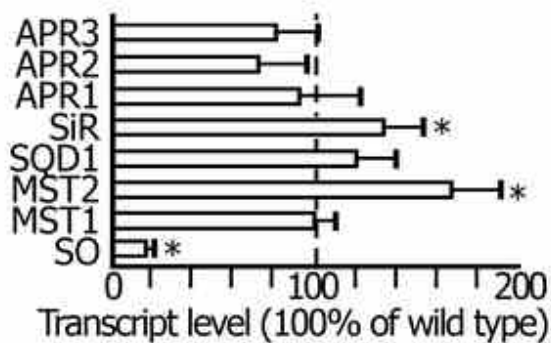


**Supplemental 8.** Injection of different sulfite concentrations in fully expended tomato leaves.

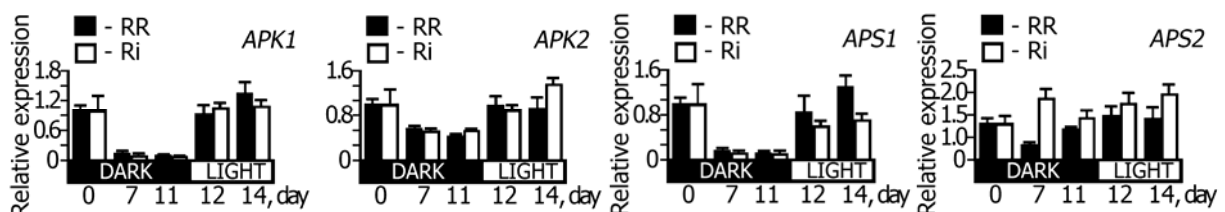
(A) The effect of sulfite injection in plants grown under normal day/ night regime was documented 1 week after the injection (upper insert) and presented as a severity of damage (lower insert). (B) The effect of sulfite injection on 5-day dark-treated plants was documented 24 h after subsequent recovery under normal day/night regime followed 2 extra days of dark incubation after injections (upper insert), and estimated as a severity of damage (lower insert). The severity of damage was calculated in 5 leaves from 2 individual experiments, and presented as mean±SE.



**Supplemental 9.** Response of SO proteins in *SO-Ri* mutants to sulfite injection in the dark (A) or under normal conditions (B). 10 µg proteins were fractionated by SDS-PAGE and immunoblotted with SO-specific antibodies.

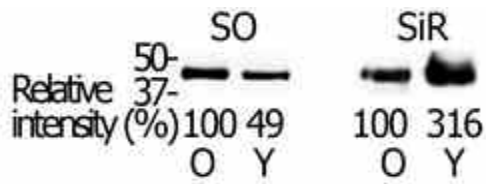


**Supplemental 10.** Level of *APRs*, *SiR*, *SO*, *MST1*, *MST2* and *SQD1* transcripts in wild-type and *SO*-compromised plants under normal growth conditions. The relative expression after normalization to *TFIID* (*SGN-U329249*) is calculated by comparison to corresponding transcript in wild-type plants (set as 1.0). Error bars indicate SE (n=12).

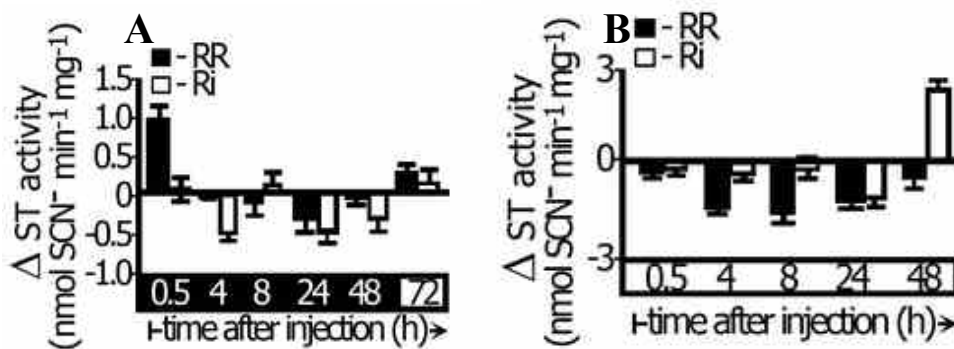


**Supplemental 11.** qRT-PCR expression analysis of the *APK1*, *APK2*, *APS1* and *APS2* transcripts in wild-type and *SO*-compromised plants during 11 d of dark treatment and recovery period under normal day/night regime. The relative

expression after normalization to *TFIID* (*SGN-U329249*) is calculated by comparison with that of day 0 (set as 1.0). Error bars indicate SE (n=6).



**Supplemental 12.** Level of SO and SiR proteins in wild-type tomato plants in old (O) and young (Y) leaves. 10  $\mu\text{g}$  proteins were fractionated by SDS-PAGE (SO) and by native-PAGE (SiR) and immunoblotted with SO- and SiR specific antibodies.



**Supplemental 13.** Thiosulfate dependent sulfite and SCN<sup>-</sup> generating sulfurtransferase (ST) activity based on SCN<sup>-</sup> appearance of wild-type (RR) and *SO*-compromised plants (Ri) during sulfite injection coupled with the dark treatment (A) or under normal day/light conditions (B).

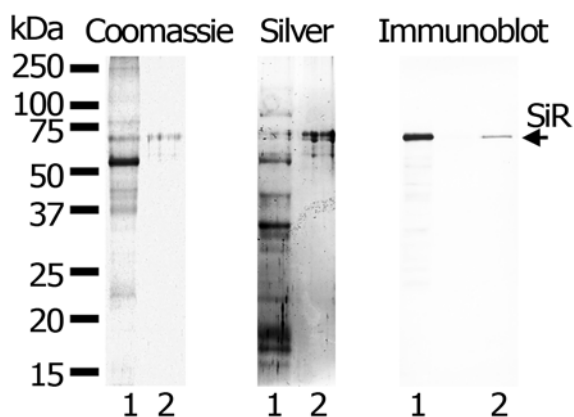


Table. 5. Purification of Sulfite Reductase from Arabidopsis OE<sub>SiR</sub> Leaves

	Total protein (mg)	Total SiR activity (nmol min <sup>-1</sup> )	Specific SiR activity (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protein)	Purification (fold)
Crude extract	66.50	631.75	9.50	1.0
55°C-heated + 35-65% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	30.90	605.64	19.60	2.1
Sephadex G-25	17.57	426.02	24.25	2.6
Hydroxyapatite 0-400 mM P-gradient	1.62	391.72	241.8	25.5
Hydroxyapatite 0-125 mM P-gradient	0.05	55.39	1051.0	110.6

**Supplemental 14.** Purification of Sulfite Reductase from Arabidopsis OE<sub>SiR</sub> plants.

Proteins corresponding to the same activity (0.1 μmol min<sup>-1</sup>) were separated on 15% discontinuous SDS-PAGE Coomassie blue R-250 (left) or silver stained (middle) as well as immunoblotted with polyclonal antiserum antibodies against SiR (right). Samples were loaded as follows: (1) Crude protein extract from Arabidopsis OE SiR plants (10.53 μg). (2) SiR fraction with purification factor 110 (0.1 μg).

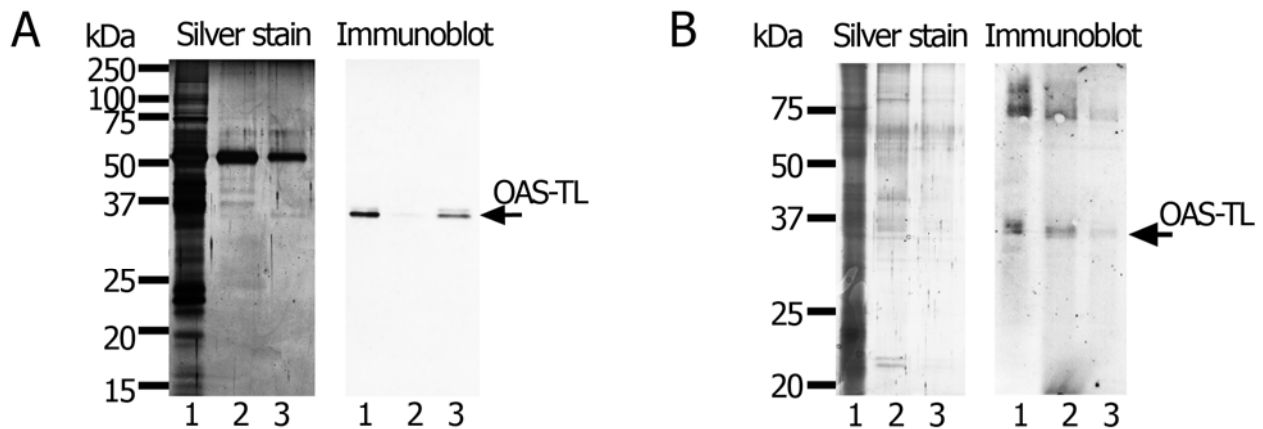


Table. 3. Purification of O-Acetylserine (Thiol) Lyase from Arabidopsis OE<sub>SIR</sub> Leaves

	Total protein (mg)	Total OAS-TL activity ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )	Specific OAS-TL activity ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ )	Purification (fold)
Crude extract (Arabidopsis)	66.40	54.45	0.82	1.0
65°C-heated + 35-65% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	19.20	43.97	2.29	2.8
Sephadex G-25	16.63	40.91	2.46	3.0
Hydroxyapatite 0-200 mM P-gradient	1.04	36.37	34.84	42.5
Hydroxyapatite 0-125 mM P-gradient	0.11	11.38	101.60	123.9

Table. 4. Purification of O-Acetylserine (Thiol) Lyase from Tomato OE<sub>SIR</sub> Leaves

	Total protein (mg)	Total OAS-TL activity ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )	Specific OAS-TL activity ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ )	Purification (fold)
Crude extract (Tomato)	85.70	36.51	0.43	1.0
65°C-heated + 30-70% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	38.55	32.77	0.85	2.0
Sephadex G-25	10.23	12.59	1.23	2.9
Hydroxyapatite 0-400 mM P-gradient	1.06	11.05	10.46	24.6
Hydroxyapatite 0-200 mM P-gradient	0.26	6.96	26.75	62.8
Hydroxyapatite 0-125 mM P-gradient	0.14	7.02	51.60	122.9

**Supplemental 15.** Purification of O-acetylserine (thiol) lyase (OAS-TL) from Arabidopsis (A) and Tomato (B) OE<sub>SIR</sub> plants. Proteins corresponding to the same activity ( $5.0 \text{ mkmol min}^{-1}$ ) were separated on 15% discontinuous SDS-PAGE and silver stained or immunoblotted with polyclonal antiserum antibodies against cytosolic OAS-TL. In case of Arabidopsis (A), samples were loaded as follows: (1) Crude proteins extract ( $6.1 \mu\text{g}$ ). (2) OAS-TL fraction with purification factor 43 ( $0.14 \mu\text{g}$ ). (3) OAS-TL fraction with purification factor 124 ( $0.05 \mu\text{g}$ ). In case of Tomato plants (B), samples were loaded as follows: (1) Crude proteins extract ( $11.74 \mu\text{g}$ ). (2) OAS-TL fraction with purification factor 63 ( $0.19 \mu\text{g}$ ). (3) OAS-TL fraction with purification factor 123 ( $0.09 \mu\text{g}$ ).