

תכנית מספר 256-0720-08

פירוק פעיל של אנטוציאנינים : אפיון התהליך בפרחי ברונפלסיה (Solcanacea) באמצעים ביוכימיים

ופרוטאומיים

מיכל שמיר, חנינית קולטאי ודוד וייס

דוח מסכם

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ולהנהלת ענף פרחים

צמחי נוי, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן
צמחי נוי, מינהל המחקר החקלאי, בית דגן
מטעים וצמחי נוי, הפקולטה לחקלאות, רחובות.

מיכל שמיר
חנינית קולטאי
דוד וייס

Michal Oren-Shamir, Ornamental Horticulture Dept. ARO, Bet Dagan.

E-mail: vhshamir@agri.gov.il

Hinanit Koltai, Ornamental Horticulture Dept. ARO, Bet Dagan.

David Weiss, Horticulture Dept. Agriculture Faculty, The Hebrew University, Rehovot.

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים : לא

חתימת החוקר _____

תקציר

אנטוציאנינים הם קבוצת הפיגמנטים הצמחיים הגדולה ביותר, המונה מאות פיגמנטים בתחום צבעים בין אדום לסגול וכחול. בניגוד לידע המולקולרי המפורט הקיים על הסינתזה, יש מעט מאד ידע על היציבות הפירוק של פיגמנטים אלו ברקמות צמחיות. לאחרונה, אפיינו תהליך פירוק פעיל של אנטוציאנינים בפרחי *Brunfelsia*. ככל הידוע לנו, עבודה זו היא הראשונה המתארת פירוק פעיל, *in planta*, של אנטוציאנינים. במחקר זה המשכנו באפיון תהליך הפירוק ובניית תשתית לעבודה מולקולרית וביוכימית בצמחי ברונפלסיה: א. פתחנו שתי שיטות שונות להתמרה חלופית בפרחי ברונפלסיה, ב. פיתחנו מערכת רגנרציה של הצמחים. ג. אפיינו ביטויים ושיבוט הגנים פראוקסידאז וגלוקוזיגאז לבחינת פעילותם בפרח. ג. בידדנו גנים נוספים ובחינת רמת ביטויים בפרחים. ד. אפיינו את מבנה האנטוציאנינים בעזרת אנליזת MS. ה. אפיינו את החומרים הנדיפים ולא נדיפים, גנים וחלבונים שעולים בזמן פירוק האנטוציאנינים במשך היומיים הראשונים לפתיחת הפרח. בעתיד אנחנו מקווים לאפיין את תהליך הפירוק כולו ולקבוע האם יש קשר בינו לבין תהליכים מטבוליים אחרים המתרחשים בפרח.

רשימת פרסומים :

1. Ayelet Bar-Akiva, Rinat Ovadia, Ilana Rogachev, , Carmiya Bar-Or, Einat Bar, Zohar Freiman, Ada Nissim-Levi, *Natan Gollop*, Efraim Lewinsohn, , Asaph Aharoni, David Weiss, Hinanit Koltai, **Michal Oren-Shamir*** Secondary metabolism during active anthocyanin degradation in Brunfelsia flowers (submitted to New Phytologist).
2. Liberman Raya, Liat Shahar, Ada Nissim-Levi, Dalia Evenot, Moshe Reuveni and **Michal Oren-Shamir**. Plantlet regeneration from Brunfelsia calycina leaf explants. Plant Cell Tissue and Organ Culture, in press.
3. Nissim-Levi Ada, Ayelet Bar-Akiva, Liat Shahar, Victor Gaba, Raya Liberman and **Michal Oren-Shamir**. Transient transformation of Brunfelsia calycina flowers. In preparation.

מבוא (רקע מדעי ומטרות)

אנטוציאנינים הם קבוצת הפיגמנטים הצמחיים הגדולה ביותר, המונה מאות פיגמנטים בתחום צבעים בין אדום לסגול וכחול. פיגמנטים אלו מצטברים בחלליות תאי האפידרמיס, וגוונם משתנה כתלות בתנאי המיקרו-סביבה בחלליות. מסלול הביוסינתזה של האנטוציאנינים כחלק מהמסלול הפנילפרופנואידי נחקר רבות ואופיין במספר צמחי מודל כמו ארבידופסיס, פטוניה ונבטי תירס. עבודות עם צמחים טרנסגניים הראו עליה בריכוז האנטוציאנינים על ידי מניפולציה של ביטוי גנים במסלול. בניגוד לידע המולקולרי המפורט הקיים על הסינתזה, יש מעט מאוד ידע על היציבות הפירוק של פיגמנטים אלו ברקמות צמחיות. למרות עובדה זו, ברור שישנו פירוק של אנטוציאנינים בצמחים וניתן להניח שתהליכי הפירוק משפיעים באופן ניכר על צבע המוצרים החקלאיים.

לאחרונה, אפיינו תהליך פירוק פעיל של אנטוציאנינים בפרחי *Brunfelsia* (Vaknin et al., 2005). ככל הידוע לנו, עבודה זו היא הראשונה המתארת פירוק פעיל, *in planta*, של אנטוציאנינים. פרחי ברונפלסיה משמשים כמודל מצוין למחקר על הפירוק מכמה סיבות: א. הפרחים עוברים שינוי צבע דרמטי ומהיר מסגול כהה עם פתיחתם ועד ללבן יומיים לאחר הפתיחה, ושינוי זה הוא כתוצאה מירידה בריכוז הפיגמנטים ברקמה. ב. תהליך זה של פירוק אנטוציאנינים מתרחש גם כשהפרחים מנותקים מהצמח ביום פתיחתם וטבולים בתמיסת סוכרוז. ג. השתייכות הברונפלסיה למשפחת הסולניים מאפשרת אפיון של חלבונים או גנים על ידי השוואה לספריות של צמחי מודל ממשפחה זו כמו עגבנייה וטבק.

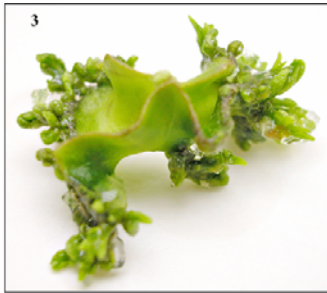
הראנו בעזרת מעבד סינתזת חלבון, שפירוק אנטוציאנינים בפרחים תלוי בסינתזה *de novo* של חלבונים חדשים בשלבים מוגדרים היטב של התפתחות הפרח. החלבונים החדשים הנחוצים לפירוק מסונתזים בין יום פתיחת הפרח ליומיים לאחר הפתיחה. ביום השני, הגמעת הפרחים הסגולים בהירים (לאחר שהחל תהליך הפירוק) במעבדי סינתזת חלבונים, אינה מעכבת עוד את הלבנת הפרחים. בנוסף הראינו שפירוק האנטוציאנינים נפרד מתהליכי ההזדקנות הפרח (Vaknin et al., 2005). מועמדים סבירים כאנזימי פירוק של אנטוציאנינים, בהסתמך על עבודות מחקר בין ומיצי פירות, הם הפראוקסידזות ו- β גלוקוזידאזות. קבוצות אנזימים אלו פועלות ברוב אברוני התא, כולל החלליות.

פירוט הניסויים והתוצאות

א. פיתוח מערכות לבחינת גנים מועמדים כמפרקי אנטוציאנינים.

1א. פיתוח מערכת רגנרציה לצמחי ברונפלסיה על מנת לבחון השפעת גנים מועמדים במערכת של טרנספורמציה קבועה.

פתחנו מערכת רגנרציה של צמחי ברונפלסיה מחלקי עלים צעירים. ניצורונים התקבלו באיכות טובה ביותר במצע של 1 mg/l BA and 0.5 mg/l IAA במדיום MS (30 g/l sucrose, pH 5.7, 7.5 g/l IBA) agar). השרשת הצמחונים התקבלה במצע של MS עם 0.25 to 0.5 mg/l IBA. תהליך הרגנרציה כולה עד לקבלת צמחים מושרשים ערכה 24 שבועות (תמונה 1). אנחנו בשלב של גידול הצמחים לקבלת פריחה. תמונה 1 מציגה שלבים שונים של הרגנרציה מהתחלת התפתחות

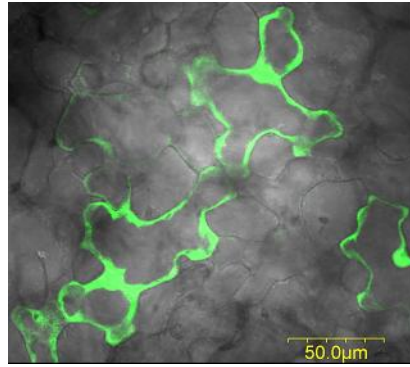


תמונה 1. רגנרציה של צמחי ברונפלסיה. התחלת התפתחות הניצרוניים על העלה הצעיר, ניצרון באורך של כ- 1.5 cm וצמח מושרש.

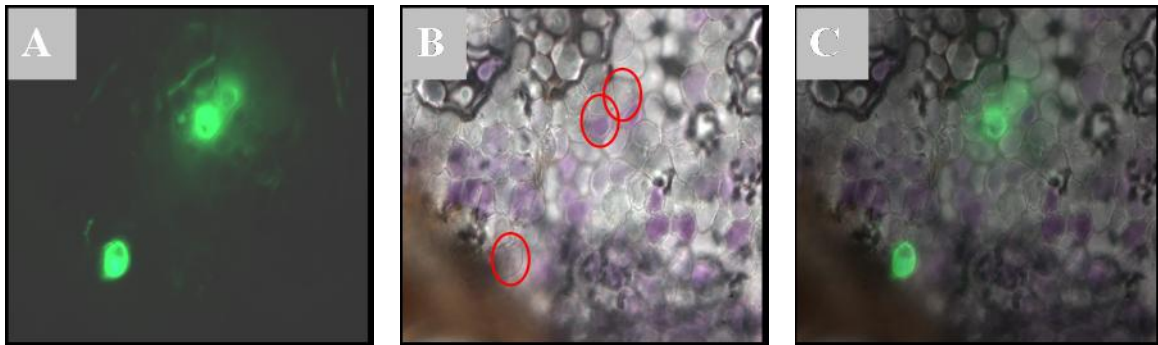
2א. פיתוח טרנספורמציה חלופית בעלי כותרת של ברונפלסיה

פיתוח מערכת התמרה חולפת לפרחים של פרח הברונפלסיה תאפשר בחינה של השפעת גנים ספציפיים שבודדו מהפרחים על פירוק הפיגמנטים. בעזרת מערכת התמרה חולפת ניתן יהיה להשתיק גנים ספציפיים או משפחת גנים בשיטת RNAi silencing ולבחון האם השתקתם מנעה את פירוק הפיגמנטים. לשם כך חשוב שההשתקה תהיה כבר בשלב פתיחת הפרח, לפני סינתזת האנזימים המפרקים פתחנו מערכת התמרה בעזרת חיידקי אגרובקטריום מזן LBA4404 המכילים את הפלסמיד הבינארי- pBIN GFP על ידי הזרקה של החיידקים לעלי הכותרת של פרח ביום הפתיחה. על מנת לקבל ביטוי של הגן שהחדרנו לצמח עם פתיחת הפרח, פתחנו מערכת התמרה חולפת שתבטא בפרחים לפני התחלת פירוק הצבע על מנת שנוכל לבחון את תפקיד הגנים הקנדידטים בתהליך פירוק האנטוציאנינים. לשם כך הדבקנו פקעים של פרחי ברונפלסיה שהיו בשלב של יומיים לפני פתיחה ואכן קבלנו ביטוי החלבון GFP בפרחים סגולים לפני שלב הדהייה (תמונה 2).

למרות הצלחת השיטה, יעילות ההתמרה לא הייתה מספקת לסריקה של גנים קנדידטים, ולכן במקביל עבדנו על פיתוח שיטת התמרה בעזרת ירי חלקיקי זהב עם פלסמיד לביטוי YFP. פלסמיד pSAT6 המכיל גן מדווח YFP תחת בקרת פרומוטר מתמיד 35S שהוחדר לעלי הכותרת בעזרת ירי חלקיקי זהב (תמונה 3). יעילות ההתמרה הייתה גבוהה יותר מזו שנצפתה בשיטת ההתמרה בעזרת אגרובקטריום, אבל חלק גדול מהתאים המותמרים דהו כתוצאה מהירי. לאחר ניסיונות רבים בבחירת שלב ההתפתחות של הפרח ורמת הווקום בתהליך, הצלחנו לקבל התמרה של תאים שצבעם הסגול נשמר (איור 2).



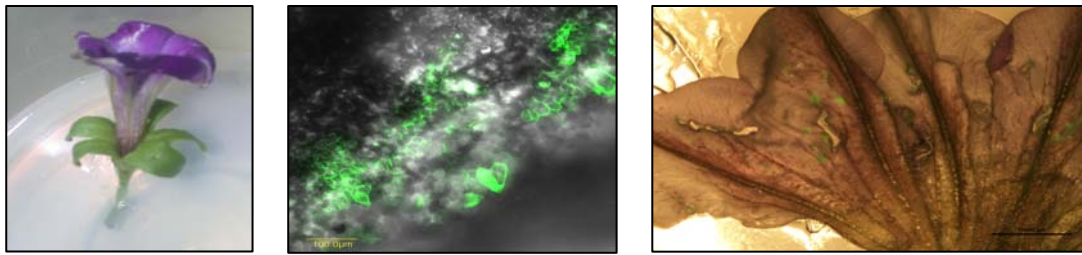
תמונה 2: התמרה חולפת של פרחי ברונפלסיה. פקעי פרונבלסיה יומיים לפני פתיחה עברו אינקובציה למשך מספר שעות עם חיידקי אגרובקטריום המזן LBA4404 עם הפלסמיד pBIN עם וקטור ל-GFP. ביטוי החלבון GFP נראה בפרחים זמן קצר לאחר פתיחתם.



תמונה 3: בדיקת השפעת הטרנספורמציה על תהליך פרוק הצבע. פלסמיד pSAT6 המכיל את הגן המדווח YFP תחת בקרת פרומוטר 35S הוחדר בעזרת ירי חלקיקי זהב לפרחי ברונפלסיה. נצפתה זהירה פלואורסנטית בתאים (A) בהם נותר צבע סגול (B). תמונה (C) היא שילוב של תמונות A ו-B. התאים צולמו במיקרוסקופ בהגדלה פי 40 עם פילטר מתאים.

2א. פיתוח מערכות אלטרנטיביות לבחינת גנים של ברונפלסיה.

למרות ההצלחות בהתמרת פרחי ברונפלסיה, עדין היעילות ואיכות ההתמרה לא מספקים. לכן, המשכנו בפיתוח מערכת אלטרנטיבית לבחינת גנים קנדידטים. מכיוון שפטוניה קרובה מאד לברונפלסיה מבחינה אבולוציונית, והרכב האנטויאנינים בפטוניה גם כן דומה לזה של ברונפלסיה, בחרנו בקו פטוניה סגול V26 כמערכת מוצלחת לבחינת גנים לפירוק האנטוציאנינים. ברור שבמערכת כזו יהיה צורך לבטא את הגנים המועמדים ביתר ולא להשתיקם. עובדה זו תדרוש בידוד של הגנים בשלמותם ושיבוטם בוקטור ביטוי עם פרומוטר 35S. **בתמונה 4** ניתן לראות פרחי פטוניה V26 שעברו אינפילטרציה עם Agrobacterium p35S-GFP gene. בנוסף לפטוניה אנחנו בוחנים גם צמחי טבק טרנסגניים המסנטזים ביתר אנטוציאנינים כמערכת בחינה נוספת. שני הגנים המבוטאים ביתר בצמחי הטבק הם ה-Aft TF ו-1PAP, שניהם מבקרים את סינטזת האנטוציאנינים.



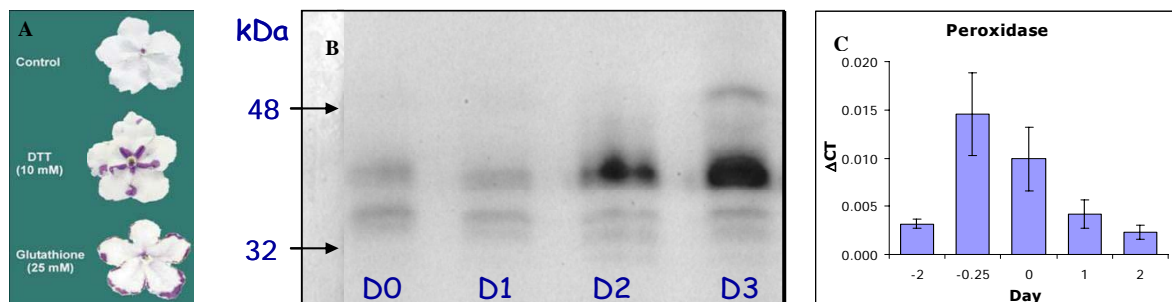
תמונה 4. פרח פטוניה V26 המבטא GFP לאחר אינפילטרציה עם *Agrobacterium p35S-GFP* gene.

ב. בחינת מעורבות פראוקסידאז בפירוק.

1. פראוקסידאז כמועמד לאנזים מפרק אנטוציאנינים.

אחת המשפחות הבולטות כאנזימים מועמדים לפירוק אנטוציאנינים היא משפחת הפראוקסידאזות. **איור 1** מסכם את הממצאים העיקריים המחזקים את האפשרות שפראוקסידאזות מעורבות בתהליך הפירוק *in planta*

בפרחי ברונפלסיה. עיכוב הפירוק התקבל כשהפרחים המנותקים טופלו בחומר מחזור כמו DTT, בגיל פעילות של פראוקסידאז, נמצא איזואנזים אחד שבלט בעליה ניכרת בפעילות שלו בזמן פירוק הצבע. עליה זו בפעילות עוכבה ברובה כשפרחים טופלו בציקלוהצמיד – דבר המעיד על כך שלפחות חלק מהעליה בפעילות היא בגלל יצירת חלבון חדש (תוצאה לא מוצגת) ובבחינת Real Time PCR של הגן המבודד מהפרחים (רצף הגן זהה לרצף החלקי של האיזואנזים שבודדנו) נמצא פיק ברמת הביטוי של הגן בשלב שבדיוק לפני פתיחת הפרח והתחלת הפירוק (**איור 1 ABC**).



איור 1. מעורבות פראוקסידאז בפירוק אנטוציאנינים בברונפלסיה. A צילום פרחים לאחר שלושה ימים, של צמחי ביקורת, פרחים שטופלו בחומר המחזור DTT ופרחים שטופלו בחומר המחזור גלוטטיון. B גיל פעילות של פראוקסידאזות מפרחי ברונפלסיה בימים 0 עד 3 מפתחת הפרח. C real time PCR של הגן הזהה לאיזואנזים של הפראוקסידאז, בזמן פתיחת הפרח ופירוק האנטוציאנינים.

2. שיבוט הגן פראוקסידאז לבחינת השפעת השתקתו בפרחי ברונפלסיה על פירוק האנטוציאנינים

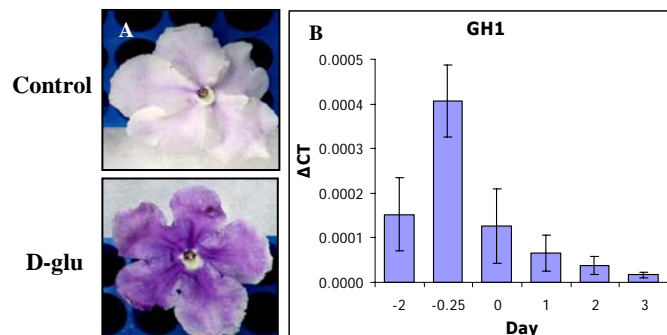
שני קונסטרוקטים ליצירת RNAi נבנו בשתי דרכים שונות על בסיס מקטע של כ-1000 בסיסים המקודד לפראוקסידאז ובודד מפרחי הברונפלסיה בשנת המחקר הראשונה: miR Peroxidase - בו הוכנס מקטע של כ-20 בסיסים למבנה של miR 164b ו-pRNA69-RNAi Peroxidase - בו הוכנס מקטע של כ-400 בסיסים לוווקטור היוצר מבנה של (pRNA69) Stem/loop. מקטע ה-miR Peroxidase שובט בפלסמיד

בינארי ושימש בניסיונות הטרנספורמציה עם חיידקי אגרובקטריום. גם מקטע ה- pRNA69-RNAi Peroxidase שובט בווקטור בינארי לטרנספורמציות עם אגרובקטריום. פלסמיד ה-pRNA69 המשובט שימש בניסיונות הטרנספורמציה בשיטת הירי. ניסיונות של טרנספורמציה לביטוי חולף להשתקת ביטוי פראוקסידאז נעשו בשתי השיטות (אגרובקטריום וירי חלקיקי זהב), עם שני הקונסטרוקטים ליצירת RNAi. הניסויים נעשו עם הביקורות המתאימות ובשיטה של Co transformation עם פלסמיד המכיל גן מדווח. לא נצפה פנוטיפ של עיכוב פרוק הצבע בניסויים אלו והפרחים הטרנספורמנטים איבדו את צבעם במהלך 2-3 ימים כפרחי הביקורת. מכיוון שיעילות הטרנספורמציה הייתה נמוכה בשתי השיטות שפותחו יתכן שזו הסיבה לכך שלא ראינו עיכוב פירוק.

לבחינת המעורבות במערכת יותר יעילה, בודדנו את הגן כולו (1350 bp) ושיבטנו אותו בווקטור pBIN עם פרומוטור p35S. אנחנו בעיצומם של ניסויים של אימפילטרציה של הגן ב- *Agrobacterium* (EHA 105) בפרחי פטוניה V26 וכן בצמחי טבק טרנסגניים כפי שתואר למעלה.

ג. בחינת מעורבות גליקוסיל הידרוקסילאז (GH1) בפירוק.

בעבודה הקדמית מצאנו שמעכב ספציפי של β -glucosidase, D-gluconic acid, מעכב את פירוק האנטוציאנינים בפרחי ברונפלסיה מנותקים (איור 2). בתחילת המחקר בודדנו גן β -glucosidase ועכבנו אחר הביטוי שלו לאורך התפתות הפרח. בשלב מאוחר יותר, לאחר שאפיינו את האנטוציאנינים בעזרת אנליזת MS-MS הבנו שעל מנת שהגלוקוזידאז יפרקו את הפיגמנט העיקרי בפרח, הוא חייב לפעול על השיירים הדיסכרידיים על האנטוציאנינים. קבוצת ההידרוקסילאזות היחידה שפועלת על דיסכרידים היא GH1. בחיפוש אחר גנים המקודדים ל-GH1 נמצא גן אחד ורמת הביטוי שלו דומה לזו של הפראוקסידאז שאותו אנו בוחנים (איור 2). הגן כולו בודד ושובט (1500 bp) בימים אלו לוקטור ביטוי לבחינת השפעתו על פירוק הפיקמנטים בפרחי פטוניה, בדומה לפראוקסידאז. גם בדומה לפראוקסידאז, יש signal peptide לזה המתאים לחלבוני ווקואולה. עובדה זו מחזקת את האפשרות שפעילותו אכן קשורה לפירוק הפיגמנטים המצטברים בווקואולה.

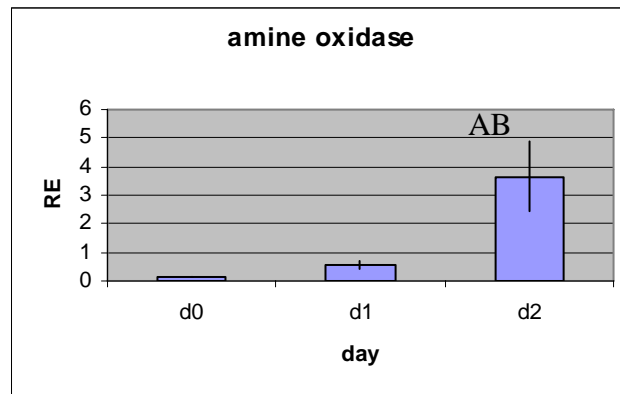
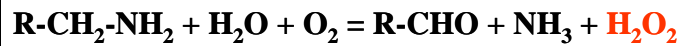


איור 2. מעורבות GH1 בפירוק אנטוציאנינים. A הפרחים צולמו 3 ימים לאחר פתיחת הפרח. הפרח העליון לא טופל והתחתון טופל במעכב הגלוקוזידאזות D-gluconic acid. B PCR של הגן המקודד ל-GH1, בזמן פתיחת הפרח ופירוק האנטוציאנינים.

ד. בידוד גנים מועמדים נוספים לפירוק אנטוציאנינים ובחינת רמת ביטויים בפרח בזמן פירוק הצבע.

Copper amine oxidase

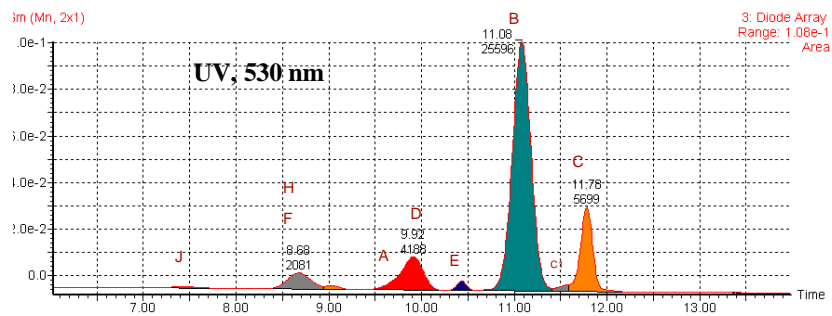
מכיוון שפראוקסידאזות הם מועמדים אפשריים כאנזימים מפרקי אנטוציאנינים, מהידע שלנו בספרות, ואנזימים אלו דורשים מי חמצן לפעילותם, יתכן שריכוז מי החמצן בתאים הצוברים אנטוציאנינים הוא התהליך המגביל את הפירוק. לכן אמין אוקסידאזות, שאחד מתוצריהם הוא מי חמצן (איור 3), יתכן שלאנזימים אלו תפקיד בתהליך הפירוק. בעבודה מוקדמת שלנו בה בחנו עליה בביטוי גנים בברונפלסיה בעזרת היברידיזציה הטרולוגית של ה-cDNA מברונפלסיה על ציפ של תפוח אדמה, נמצאה עליה משמעותית בביטוי גן Copper amine oxidase בזמן פירוק הצבע. מקטע של הגן בודד מברונפלסיה בעזרת פריימרים שתוכנו מאזורים השמורים בכל המשפחה, ובודדו מקטעי cDNA ממקור mRNA מברונפלסייה. גודל המקטע המבודד היה 500bp. רמת ביטוי הגן בפרחים בזמן פירוק הצבע נקבע בעזרת real time PCR (איור 3). ניתן לראות עליה משמעותית ברמת ביטוי הגן עם פירוק האנטוציאנינים. בהמשך נבחן אם לגן זה תפקיד בפירוק במערכת התמרה.



איור 3: ביטוי הגן copper amine oxidase בזמן פירוק אנטוציאנינים בברונפלסיה. יחס כמותי של תעתיקי המקטע AO ביחס לכמות תעתיקי 18S. D0 יום פתיחת עלי הכותרת, D1 יום לאחר הפתיחה, D2 יומיים לאחר הפתיחה.

ה. אפיון כימי מדויק של האנטוציאנינים המצטברים בפרחי ברונפלסיה.

עם התקדמות המחקר בנושא פירוק אנטוציאנינים בברונפלסיה התבהר לנו שישנה חשיבות ראשונה במעלה לאפיון הפיגמנטים בפרח. בעבודה מקדימה אפיינו את האגליקונים, המולקולות הבסיסיות של האנטוציאנינים, אבל חסר האפיון המדויק הכולל את קבוצות הסוכרים והחומצות הקשורות לאגליקונים ומאפיינים את האנטוציאנין הספציפי. אפיון מבנה הפיגמנטים הוא שלב הכרחי וראשוני בבחירת האנזימים המועמדים לפירוק. לכן, למרות שחלק זה לא היה חלק מתכנית המחקר, אפיינו את המבנה של האנטוציאנינים בפרחי ברונפלסיה בשלב מוקדם של ההתפתחות (פרחים פתוחים סגולים כהים) על ידי אנליזת LC MS/MS בשיתוף פעולה עם אסף אהרוני (ועמיתו אילנה רובציב) ממכון וייצמן. איור 4 מציג את רשימת האנטוציאנינים שאופינו.



ID	RT (min)	Tentative assignment	M+	MSMS fragments	Elemental composition	Mass accuracy, mDa	i-Fit	Calculated mass	Reference (NMR analysis)
J	7.54	Delphinidin-O-cafferoyl-rhamnoside-hexoside-O-hexoside; or Delphinidin-O-coumaroyl-dihexoside-O-hexoside	935.2427	773.18 (Dlp-hexoside-deoxyhexoside, acylated with caffeic acid, or Dlp-dihexoside, acylated with coumaric acid); 465.11 (Dlp-hexoside); 303.05 (Dlp)	C42H47O24	3	0.8	935.2457	(1)
F	8.65	Petunidin-O-cafferoyl-rhamnoside-hexoside-O-hexoside; or Petunidin-O-coumaroyl-dihexoside-O-hexoside	949.259	787.21 (Pt-hexoside-deoxyhexoside, acylated with caffeic acid, or Pt-dihexoside, acylated with coumaric acid); 479.12 (Pt-hexoside); 317.06 (Pt)	C43H49O24	2.4	0.7	949.2614	(1)
H	8.67	Delphinidin-O-coumaroyl-rhamnoside-hexoside-O-hexoside	919.2521	757.20 (Dlp-hexoside-deoxyhexoside, acylated with coumaric acid); 465.11 (Dlp-hexoside); 303.05	C42H47O23	1.3	0.5	919.251	(1)
A	9.79	Malvidin-O-cafferoyl-rhamnoside-hexoside-O-hexoside; or Malvidin-O-coumaroyl-dihexoside-O-hexoside	963.2761	801.23 (mlv-hexoside-deoxyhexoside, acylated with caffeic acid, or mlv-dihexoside, acylated with coumaric acid); 493.13 (mlv-hexoside); 331.08 (mlv)	C44H51O24	0.9	1.6	963.2770	(1)
D	9.94	Petunidin-O-coumaroyl-rhamnoside-hexoside-O-hexoside;	933.2649	771.21 (Pt-hexoside-deoxyhexoside, acylated with coumaric acid); 479.12 (Pt-hexoside); 317.06 (Pt)	C43H49O23	1.6	0.8	933.2665	(1)
E	10.48	Petunidin-O-coumaroyl-rhamnoside-hexoside-O-hexoside;	933.2657	771.21 (Pt-hexoside-deoxyhexoside, acylated with coumaric acid); 479.12 (Pt-hexoside); 317.06 (Pt)	C43H49O23	0.8	0.2	933.2665	(1)
B	11.10	Malvidin-O-coumaroyl-rhamnoside-hexoside-O-hexoside;	947.2783	785.23 (mlv-hexoside-deoxyhexoside, acylated with coumaric acid); 493.13 (mlv-hexoside); 331.08 (mlv)	C44H51O23	3.8	1.4	947.2821	(1)
C1	11.60	Malvidin-O-feruloyl-rhamnoside-hexoside-O-hexoside;	977.288	815.24 (mlv-hexoside-deoxyhexoside, acylated with ferulic acid); 493.13 (mlv-hexoside); 331.08 (mlv)	C45H53O24	4.7	1.0	977.2927	(2)
C	11.82	Malvidin-O-coumaroyl-rhamnoside-hexoside-O-hexoside;	947.2809	785.23 (mlv-hexoside-deoxyhexoside, acylated with coumaric acid); 493.13 (mlv-hexoside); 331.08 (mlv)	C44H51O23	1.2	3.1	947.2821	(1)

איור 4: אפיון אנטוציאנינים בפרחי ברונפליסיה. אנתוציאנינים מוצו מפרחי ברונפליסיה לאחר פתיחתם ואופינו ב-UPLC-qTOF-MS/MS. נצפתה התאמה בין כרומטוגרמת הבליעה ב-530 nm (גרף עליון) המבוססת בערכי בליעה לבין כרומטוגרמות ה-MS המבוססות באחוזים. צבע הפרחים מורכב מעשרה אנתוציאנינים של שלושה אנתוציאנידינים- דלפינידין (J,H,G), פטונידין (F,D,E), מלבידין (A,B,C1,C). מבנה האנתוציאנינים נקבע בהתאמה לזמני היציאה השונים מהקולונה (RT). נקבע היון המולקולרי (M+) והפרגמנטים השונים המרכיבים אותו (MSMS fragments). בהתאמה, נקבעו הנוסחה המולקולרית (Elemental composition) והמסה המחושבת (Calculated mass) המתאימות ביותר לפי I-Fit הנמוך ביותר. המבנה הסופי נקבע לאחר השוואה למבנה אנתוציאנינים מפטוניה.

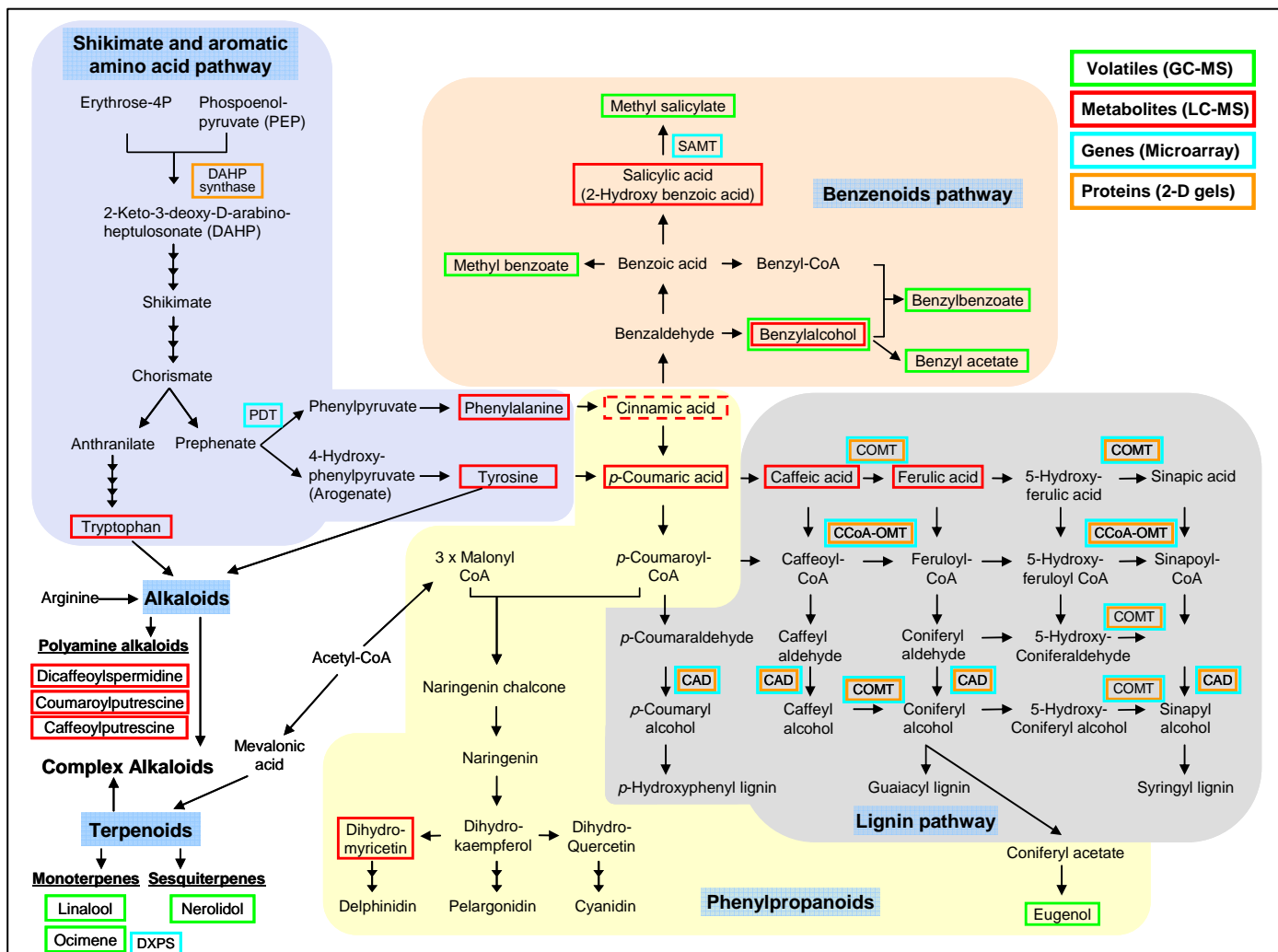
1. שינויים במטבוליזם שינוי בזמן פירוק האנתוציאנינים בברונפליסיה.

במשך שלוש שנות המחקר עשינו הרבה מאוד ניסויים לאפיון את התופעה של פירוק האנתוציאנינים וגם לבחון האם יש קשר בין פירוק זה למסלולים מטבוליים אחרים הפעילים בפרח במקביל. ראינו במשך המחקר שהפרחים עוברים שינויים מספר במקביל להלבנתם: הם נהיים ריחניים מאוד, וריחם מתגבר במשך היוםיים הראשונים לאחר פתיחתם, ועלי הכותרת גדלים. ראינו שהגדילה של עלי הכותרת היא כתוצאה מהתרחבות התאים ולא חלוקה של תאים חדשים (תוצאות לא מוצגות). בנוסף לזה ראינו שיש

ליגנין לאורך העורקים של עלי הכותרת (תוצאות לא מוצגות), ומכיוון שהעורקים גדלים סביר מאוד להניח שיש יצירה של ליגנין בפרחים. **איור 5** מסכם את השינויים שמצאנו שמתרחשים בפרחי ברונפלסיה בזמן פירוק האנטוציאנינים ביומיים הראשונים לאחר פתיחת הפרחים. ניתן לראות מהאיור שיש הפעלה של מסלול השיקימט המקדים את מסלול הפנילפרופנואיד. כמו כן המסלולים ליצירת חומרים נדיפים ממשפחת הבנזואידים וכן מסלול ליצירת ליגנין מוגברים מאוד. מכאן שיתכן שהמסלולים ליצירת הנדיפים והליגנין הם כתוצאה מאינדוקציה של מסלול השילימט. אפשרות אחרת ואולי פחות סבירה היא, שהמסלולים של יצירת בנזואידים וליגנינים מוזנים על ידי תוצרי פירוק של האנטוציאנינים: שלוש החומצות האורגניות coumari acid, caffeic acic, ferulic acid הם שיירים של האנטוציאנינים בברונפלסיה (**איור 4**). יתכן שפירוק הפיגמנטים מוביל להוצאת השיירים מהווקואולות והם השמשים להזנת שני המסלולים. על מנת לבחון איזון מהתיאוריות נכונה, יהיה צורך לסמן חומרי ביניים לאורך המסלולים לעקבו אחר הסימון. עבודה זו תשמש כתשתית להמשך העבודה על ברונפלסיה, ללימוד תהליך פירוק האנטוציאנינים וכן ללימוד הקשר בין מסלולי מטבוליטים שניוניים שונים.

מסקנות והשלכותיהן על המשך העבודה

במשך שלוש שנות המחקר יצרנו תשתית להמשך עבודה עם צמחי ברונפלסיה. צעד זה היה חיוני מכיוון שלא הייתה אינפורמציה מולקולרית על צמחים אלו. בנוסף לכך פתחנו מערכת רגנרציה שתשמש בעתיד לבחינה של גנים והשפעתם על פירוק האנטוציאנינים בפרחים. כשלב ביניים שפתחנו מערכת טרנספורמציה חלופית לפרחי ברונפלסיה, לבחירת הגנים שאותם נבחן במערכת קבועה. מכיוון שמערכת הטרנספורמציה החלופית בברונפלסיה לא הייתה יעילה מספיק, אנו בוחנים את הגנים המועמדים בפרחי פטוניה. בהמשך אנו מקווים לקבל תשובות ברורות לגבי שני הגנים אותם אנו בוחנים בימים אלו ולאפיין את תהליך הפירוק של אנטוציאנינים בברונפלסיה מחינה מולקולרית. עבודה זו עשויה לשמש כבסיס למחקרים בפירות וניסיונות לעיכוב פירוק הצבע בפירות וצמחים אחרים.



איור 5. אנליזה רב-שכבתית של השינויים במטבוליזם שניוני המתרחשים בפרחי ברונפליסיה במשך היומיים הראשונים לאחר פתיחת הפרח. הסכמה מסכמת מסלולים שונים. גנים, חלבונים ומטבוליטים שעלו באופן משמעותי ממוסגרים. הסכמה מסכמת תוצאות מ-GC-MS, LC-MS, ציפים, וגילים 2D. צבע המסגרת מסמן באיזו שיטה אופייני הגן, חלבון או מטבוליט. הקיצורים הם:

Enzymes: SAMT, Salicylic acid carboxyl methyltransferase; COMT, Catechol O-methyl transferase; CCoA-OMT, Caffeoyl-CoA O-methyl transferase; CAD, Cinnamyl-alcohol dehydrogenase; DAHP synthase, 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate; PDT, Prephenate dehydratase; DXPS, 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase.

תשובות לשאלות מנחות

1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח

א. פיתוח מערכת לבחינת מעורבות גנים מועמדים בתהליך פירוק האנטוציאנינים. ב. בידוד ואפיון גנים מועמדים. ג. אפיון האנטוציאנינים בפרחים. ד. בחינת כל התהליכים המתרחשים בפרח בזמן פירוק הפיגמנטים להבנת התהליך והקשר בינו לבין תהליכים אחרים בפרח.

2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח

א. פתחנו שתי שיטות שונות להתמרה חלופית בפרחי ברונפלסיה, ב. בפיתוח מערכת רגנרציה של הצמחים. ג. אפיון ביטויים ושיבוט הגנים פראוקסידאז וגלוקוזיגאז לבחינת פעילותם בפרח. ג. בידוד גנים נוספים ובחינת רמת ביטויים בפרחים. ד. אפיון מבנה האנטוציאנינים בעזרת אנליזת MS. ה. אפיון החומרים הנדיפים ולא נדיפים, גנים וחלבונים שעולים בזמן פירוק האנטוציאנינים במשך היומיים הראשונים לפתיחת הפרח.

3. המסקנות המדעיות והשלכותיהן להמשך המחקר

פתחנו תשתית להמשך עבודה על ברונפלסיה: מערכת רגנרציה ואפיון מטבוליטי גנומי פרוטאומי של התהליכים המתרחשים במקביל לפירוק. אנחנו בשלבים מתקדמים של בחינת גנים מועמדים והשפעתם על תהליך הפירוק.

4. הבעיות שנתרו לפתרון

בעתיד אנחנו מקווים לאפיין את תהליך הפירוק כולו ולקבוע האם יש קשר בינו לבין תהליכים מטבוליים אחרים המתרחשים בפרח.

5. הפצת הידע

הידע ממחקר זה הופץ בסמינר בנווה יער ובסמינר במחלקה למדעי הצמח במכון וייצמן. בנוסף יש שלושה מאמרים בפרסום ובהכנה מעבודה זו.

6. אני ממליץ לפרסם את הדו"ח רק בספריות.