

דו"ח שנתי (דו"ח מסכם)
לתכנית מחקר מספר 430-0102-08

בנושא:

לימוד בקרת התפתחות הצבע בעלי הכותרת של ליזיאנתוס באמצעות אור במטרה
להבטיח פתיחת פרחים עם צבע מלא באגרטל

**Studying the light control of color development in Lisianthus
flower petals for providing fully colored flowers in the vase**

מוגש:

לקרן המדען הראשי - מו"פ מוצרים ליצוא - פרחים

מאת:

שמעון מאיר¹, סוניה פילוסוף-הדס¹, בטינה קוכאנק¹, אמנון לרס¹, דוד וייס², שושנה סלים¹,
תמי צדקה¹ ושאול בורד¹

¹המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר הקטיף, מרכז וולקני, בית דגן; ²מכון רוברט סמית למדעי
הצמח וגנטיקה בחקלאות, הפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה, האוניברסיטה
העברית בירושלים

**Shimon Meir¹, Sonia Philosoph-Hadas¹, Bettina Kochanek¹, Amnon
Lers¹, David Weiss², Shoshana Salim¹, Tami Zadka¹ and Shaul Burd¹**

¹Dept. of Postharvest Science of Fresh Produce, ARO, The Volcani Center, Bet-
Dagan; ²The Robert H. Smith Institute of Plant Sciences and Genetics in Agriculture,
The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot

e-mail: shimonm@volcani.agri.gov.il

הנני מאשר שהממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים.

חתימת החוקר

א. תקציר

1. הצגת הבעיה: במספר פרחי קטיף הנקטפים כאשר גבעול הפריחה נושא פרחים בשלבי התפתחות שונים, מופיעה הבעיה של העדר צבע מלא בתפרחות הנפתחות באגרטל, דבר הפוגם באיכות המופע שלהם. כדי לפתור את הבעיה נלמדה בקרת התפתחות הצבע בעלי הכותרת של ליזיאנתוס באמצעות עוצמת האור.

2. מטרות המחקר: המטרה הכללית הייתה לאפיין בפרחי ליזיאנתוס את ביטוי הגן/גנים במסלול הביוסינתזה של האנתוציאנינים המבוקרים ע"י עוצמת האור, ואת השפעות הגומלין האפשריות בין עוצמת האור לנוכחות עלים ו/או סוכר בתמיסת האגרטל. מטרות המחקר בשנים א' ו- ב': 1) לימוד הבקרה הפיסיולוגית של ביטוי הצבע ע"י עוצמת האור בצמחי עציץ ובפרחים קטופים של ליזיאנתוס; 2) בחינת השפעת עוצמת האור על השינויים ברמה ובהרכב של האנתוציאנינים והפלבונולים בפרחי ליזיאנתוס, על ביטוי הגנים המעורבים בביוסינתזה של אנתוציאנינים, על רמת הפיגמנטציה בפרחים מנותקים (ללא עלים) ובפרחים קטופים עם עלים והשפעת תוספת סוכר באגרטל במערכות אלה. מטרות המחקר בשנה ג': 1) בירור האיברים (עלים או עלי כותרת) הקולטים את סיגנל האור והשפעת אופן הקליטה על ביטוי הגנים של ביוסינתזת האנתוציאנינים; 2) בחינת השפעות האור, בגומלין עם נוכחות עלים וסוכר בתמיסה, על ביטוי הגנים של מסלול הביוסינתזה של האנתוציאנינים בעלי כותרת.

2. מהלך ושיטות עבודה: בוצעו ניסויים בשלוש מערכות של פרחי ליזיאנתוס: צמחי עציץ, פרחים קטופים (ענף קטוף) ופרחים מנותקים עם וללא עלים. נבדקה תכולת האנתוציאנינים בעלי כותרת בשלבים שונים של התפתחות הפרח, בתנאי הארה שונים (בית-רשת או פיטוטרון בהשוואה לחדר התצפית), בפרחים עם וללא עלים וכן עם וללא נוכחות של סוכרוז בתמיסת האגרטל. נלקחו דגימות למיצוי RNA מעלי הכותרת, ונבדק הביטוי באנליזת Northern או semi-quantitative RT-PCR, של מספר גנים המקודדים לאנזימי מפתח במסלול הביוסינתזה של האנתוציאנינים בשלבי התפתחות שונים של הפרח. כן בוצעה אנליזת HPLC של אנתוציאנינים ופלבונולים.

3. תוצאות עיקריות: צבע עלי הכותרת של זני הליזיאנתוס שנבחנו, הן בפרחים על הצמח והן בפרחים קטופים, אכן מושפע מעוצמת האור. צבע הפקעים המתפתחים ונפתחים באגרטל בעוצמת אור נמוכה היה חיוור ורחוק מאוד מהצבע האופייני בפרחים הנפתחים בחלקת הגידול או בתנאי תאורה טבעיים בחוץ. התקבלה שונות מסוימת במידת ההשפעה של תאורה נמוכה על ביטוי חלק מהגנים בניסויים שונים בשתי מערכות הבדיקה. ניסויים עם פרחים מנותקים הראו שקליטת סיגנל האור הגבוה מתרחשת גם בעלים וגם ישירות בעלי הכותרת. בנוסף, נצפתה השפעת גומלין בין האור לסוכר בהגברת הצבע, כיוון שהוספתו לתמיסת האגרטל הגבירה את התפתחות הצבע גם בפרחים (עם וללא עלים) שהתפתחו באור גבוה. למרות זאת, נמצא שהסוכרוז בתמיסה הפחית את ביטוי הגנים.

4. מסקנות והמלצות: התוצאות שהתקבלו עד כה תומכות בהשערת המחקר לגבי בקרת התפתחות הצבע ע"י עוצמת ההארה במהלך התפתחות הפרח. התוצאות מעידות על רמת ביטוי נמוכה של כל הגנים במסלול הביוסינתזה של אנתוציאנינים, ותומכות בקיומו של גורם בקרה מרכזי (פקטור שעתוק) שמבוקר הן ע"י שלב התפתחות הפרח והן ע"י עוצמת האור ומבקר את הביטוי של כלל הגנים במסלול או רק את חלקם. לצורך בירור השערה זו יש לבדד את הגן לפקטור השיעתוק הנ"ל ולבחון את השפעת שלב ההתפתחות ועוצמת האור על ביטויו. השפעת הסוכרוז בהגברת עוצמת הצבע של עלי הכותרת של פרחי ליזיאנתוס אינה נובעת מהגברת הביוסינתזה של האנתוציאנינים, אלא נובעת כנראה מהשפעת הסוכרוז על תהליכים מטבוליים בסיסיים או על ייצובם של הפיגמנטים. נראה לכן שלסוכר, בניגוד לאור, אין תפקיד בקרתי כסיגנל במערכת זו.

רשימת קיצורים:

ANS = anthocyanidin synthase; **BA** = benzyladenine; **CHI** = chalcone isomerase; **CHS** = chalcone synthase; **DFR** = dihydroflavonol-4-reductase; **F3H** = flavanone-3-hydroxylase; **F3'H** = flavonoid-3'-hydroxylase; **F3'5'H** = flavonoid-3',5'-hydroxylase; **FLS** = flavonol synthase; **3GT** = flavonoid-3-glycosyltransferase; **HL** = high light; **8-HQC** = 8-hydroxyquinoline citrate; **LL** = low light; **PAL** = phenylalanine ammonia-lyase; **STS** = silver thiosulfate.

ב. מבוא, רקע מדעי קצר ומטרות המחקר לתקופת הדו"ח:

עוצמת צבע הפרח הוא המרכיב העיקרי בבחירת זר הפרחים מבין המינים והזנים השונים המוצעים למכירה בחנות הפרחים. מספר פרחי קטיף בעלי מקבץ של תפרחות צבעוניות כמו ליזיאנתוס, לוע ארי, מרווה, דלפיניום, תורמוס ועוד, נקטפים כאשר גבעול הפריחה נושא פרחים בשלבי התפתחות שונים, מפרח ראשון פתוח ועד למספר גבוה של פקעים סגורים. פרחים אלה נפתחים באגרטל (בתנאי אור נמוך) ללא הצבע המלא המתקבל בפרחים שנפתחים בחלקת הגידול או בפרחים שנקטפו בשלב פתיחה מלאה. לכן, הבעיה של העדר צבע בפרחי קטיף אלה מופיעה בעיקר בתפרחות הנפתחות באגרטל אצל הצרכן, דבר הפוגם באיכות המופע שלהם. בליזיאנתוס, כמו גם בפרחים אחרים, הבעיה מחמירה עוד יותר לאחר ישום טיפול ההטענה לאחר הקטיף המאפשר את הארכת משך חיי האגרטל. הטיפול שפיתחנו כולל הטענה בחומר משמר (8-HQC) בתוספת של סוכרוז שנמצא משפר את פתיחת פרחי ליזיאנתוס באגרטל, STS המעכב את פעילות האתילן (שמגביר הזדקנות בפרחי ליזיאנתוס), וציטוקינין שדוחה את הזדקנות הפרחים. טיפול זה גורם לדחיית הזדקנות הפרחים וכמישת ענף הקטיף, ועל כן מאפשר פתיחה של פקעים רבים יותר באגרטל, שרבים מהם נפתחים בצבע דהוי ולעיתים אף ללא צבע כלל. הליזיאנתוס מהווה צמח מודל אידיאלי ללימוד וחקר הבעיה שתוארה לעיל בשל הסיבות הבאות: (א) הוא גידול חשוב מבחינה חקלאית; (ב) יש מידע רב לגבי הפיגמנטים של עלי הכותרת, כולל מסלול הביוסנתזה שלהם והאנזימים המעורבים ביצירתם; (ג) רוב הגנים המקודדים לאנזימים המעורבים במסלול הביוסנתזה של הפיגמנטים בליזיאנתוס זהו ושובטו; (ד) קיימות מערכות טרנספורמציה לפרח זה שתאפשרנה את יישום התוצאות שיתקבלו במחקר הנוכחי.

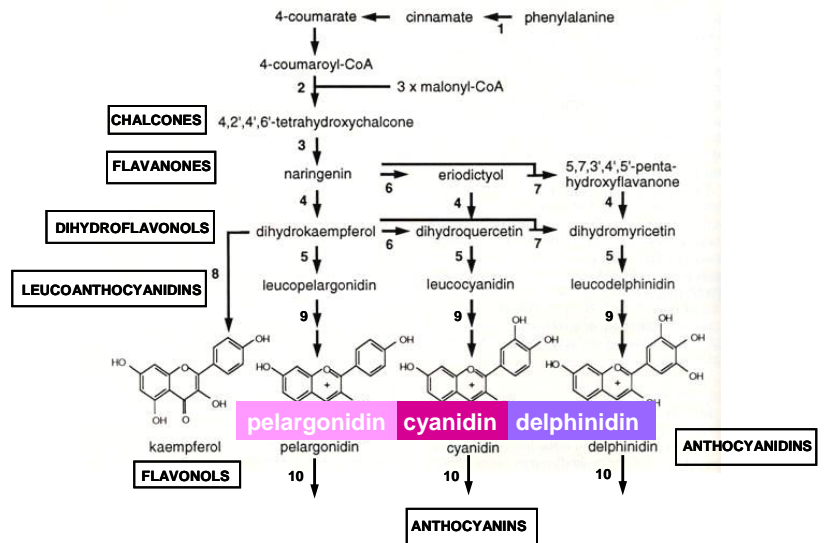
מסלול הביוסנתזה של האנתוציאנינים בפרחים - האנזימים, הגנים המעורבים וגורמי הבקרה:

הפיגמנטים האחראים על ביטוי הצבע בליזיאנתוס הם אנתוציאנינים הנוצרים מהאנתוציאנידים הבאים (סכמה 1): delphinidin כחול-סגול; cyanidin אדום-ארגמן; pelargonidin ורוד, כאשר פרחים לבנים מאופיינים בהעדר אנתוציאנינים ומכילים פלבונולים. באופן טבעי הופעת הצבע והצטברות האנתוציאנינים בפרחי ליזיאנתוס מתרחשים בעלי הכותרת החיצוניים החשופים לאור, והתהליך מגיע לשיאו במועד פתיחת הפרחים. לעומת זאת הדיהידרופלבונונים, המהווים את חומרי המוצא לאנתוציאנידים הנ"ל (ראה סכמה 1), נוצרים ומצטברים בכל שלבי התפתחות הפקע, ומגיעים לשיא הצטברותם בפקעים לבנים בגודל בינוני. כאשר מתחילה סינתזה של אנתוציאנינים, חלה ירידה ברמת חומרי המוצא. בסכמה 1 מתואר מסלול הביוסנתזה של האנתוציאנינים, כולל תוצרי הביניים והאנזימים המעורבים. מרבית הגנים המקודדים לאנזימים במסלול (8 מתוך ה-10 הממוספרים בסכמה 1) בודדו כבר מפרחי ליזיאנתוס (איור 1).

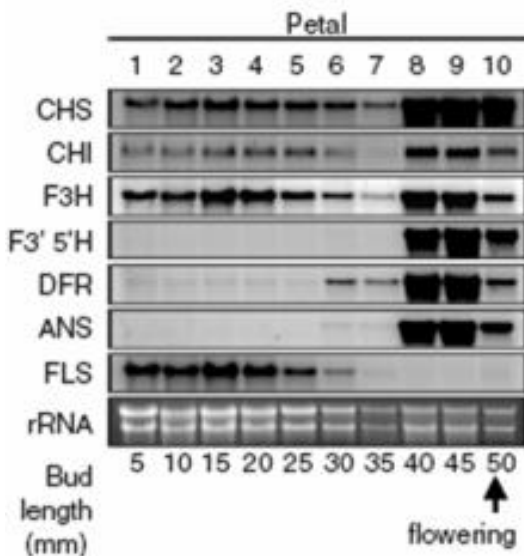
המחקרים בליזיאנתוס מראים, שבתנאי אור טבעי, הבקרה של ביטוי הגנים המקודדים לאנזימים המעורבים במסלול הביוסנתזה של האנתוציאנינים היא בקרה התפתחותית ויש הפרדה ברורה בין סינתזת

הפלבונולים לסינתזת האנתוציאנינים. הגנים לאנזימים המוקדמים במסלול, *PAL*, *CHS*, *CHI*, *F3H* (אנזימים מס' 1, 2, 3, 4, בהתאמה), באים לידי ביטוי גבוה בכל שלבי התפתחות הפרח (מפקע צעיר ועד לפרח פתוח), ללא קשר ישיר לעוצמת הצבע ולרמת האנתוציאנינים (איור 1). לעומת זאת, הגנים המקודדים לאנזימים המאוחרים יותר, *DFR*, *F3'5'H*, *ANS* (אנזימים מס' 5, 7, 9, בהתאמה), מופעלים בשלבי ההתפתחות המאוחרים של הפרח, במקביל להצטברות האנתוציאנינים ולביטוי הצבע (איור 1). לגבי הגן המקודד לאנזים מס' 10, *3GT*, שטרם בודד מליזיאנתוס, אין מידע עדיין. בנוסף, דווח שהזנה של פקעי פריחה של זני ליזיאנתוס שונים לפני הופעת צבע, בלויקואנתוציאנידינים, שהם תוצרי האנזים *DFR* והקדמים של האנתוציאנידינים (סכמה 1), מובילה לצבירת צבע בפקעים בהתאם לזן. המחקרים שתוארו לעיל מצביעים על כך שיש מתאם חיובי ברור בין ביטוי הגנים השונים במסלול לרמת התוצרים המתקבלים; כך שהבקרה העיקרית של סינתזת האנתוציאנינים היא ברמה של ביטוי הגנים. תוצאות אלו מציעות שסינתזת הפלבונולים בפרחי ליזיאנתוס מבוקרת באופן עצמאי מסינתזת האנתוציאנינים. בנוסף, נראה שסינתזת האנתוציאנינים בליזיאנתוס אינה מוגבלת בתהליכים שעד שלב יצירת *CHI* (גן מס' 3 בסכמה 1), ועיקר הבקרה מתבטא כנראה רק לאחר שלב יצירת ה-*DFR* (גן מס' 5 בסכמה 1). מאחר והגנים של שלושת האנזימים האחרונים במסלול (*DFR*, *ANS*, *3GT*) נתונים תחת בקרה מתואמת או קיימים כקומפלקס פונקציונאלי, נראה שהם עשויים לשמש כגנים מתאימים לבירור מנגנון בקרת סינתזת האנתוציאנינים וצבירת הצבע בפרחי ליזיאנתוס בתנאי אור נמוך הקיים בפנים הבית (באגרסל) וזו הייתה ההיפותיזה העיקרית בבסיס המחקר.

- 1 = phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*)
- 2 = chalcone synthase (*CHS*)
- 3 = chalcone isomerase (*CHI*)
- 4 = flavanone-3-hydroxylase (*F3H*)
- 5 = dihydroflavonol-4-reductase (*DFR*)
- 6 = flavonoid-3'-hydroxylase (*F3'H*)
- 7 = flavonoid-3',5'-hydroxylase (*F3'5'H*)
- 8 = flavonol synthase (*FLS*)
- 9 = anthocyanidin synthase (*ANS*)
- 10 = flavonoid-3-glycosyltransferase (*3GT*)



סכמה 1: מסלול הביוסינתזה של האנתוציאנינים והאנזימים המעורבים בשלבים השונים.



איור 1: ביטוי הגנים המקודדים לאנזימים המעורבים במסלול הביוסינתזה של האנתוציאנינים במהלך התפתחות הפרח בליזיאנתוס שגדל שבתנאי אור טבעי. תוצאות עפ"י:

Noda, N., Kanno, Y., Kato, N., Kazuma, K., Suzuki, M. (2004). Regulation of gene expression involved in flavonol and anthocyanin biosynthesis during petal development in lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). *Physiol Plant* 122: 305-313.

מטרות המחקר: המטרה הכללית הייתה לאפיין את ביטוי הגן/גנים במסלול הביוסנינתזה של האנתוציאנינים המבוקרים ע"י עוצמת האור, ואת השפעות הגומלין האפשריות בין עוצמת האור לנוכחות עלים ו/או סוכר בתמיסת האגרטל. העדר ביטוי של גנים אלו בפרח הקטוף המוצב בעוצמת אור נמוכה של חדר התצפית יתכן ומהווה את המגבלה לביטוי הצבע בפקעי ליזיאנתוס הנפתחים באגרטל.

מטרות אלה בוצעו בהתאם למטרות המשנה שהוגדרו בכל שנה, כמפורט להלן:

מטרות המחקר לשנה א': (1) לימוד הבקרה הפיסיולוגית של ביטוי הצבע בפרחים ע"י עוצמת האור; (2) שיבוט הגנים והכנת גלאים לבחינת ביטוי של גנים המעורבים בשלבים שונים של סינתזת האנתוציאנינים; (3) אפיון ביטוי הגנים הנ"ל בהשפעת עוצמת האור.

מטרות המחקר לשנה ב': (1) המשך לימוד הבקרה הפיסיולוגית של ביטוי הצבע ע"י עוצמת האור בצמחי עציץ ובפרחים קטופים של ליזיאנתוס; (2) בחינת השפעת עוצמת האור על השינויים ברמה ובהרכב של האנתוציאנינים והפלבונוולים בפרחי ליזיאנתוס; (3) בחינת השפעת עוצמת האור על ביטוי שאר הגנים ששובטו בשנת המחקר הראשונה בזני ליזיאנתוס שונים (בפרחי קטיף ובצמחי עציץ) והמעורבים בביוסנינתזה של האנתוציאנינים; (4) בחינת השפעת עוצמת האור על רמת הפיגמנטציה בפרחים מנותקים (ללא עלים) ובפרחים קטופים עם עלים והשפעת תוספת סוכר באגרטל במערכות אלה.

מטרות המחקר לשנה ג': (1) המשך לימוד השפעת עוצמת האור על ביטוי הגנים במסלול הביוסנינתזה של האנתוציאנינים בפרחי ליזיאנתוס קטופים; (2) בירור ההבדלים בהשפעות האור הנקלט ישירות ע"י עלי הכותרת בפרח או ע"י העלים; (3) בירור האם בשני אופני הקליטה האור הגבוה משפיע על אותם הגנים של ביוסנינתזה האנתוציאנינים; (4) בחינת המעורבות של סוכר בתמיסה בבקרת הביטוי של הגנים במסלול הביוסנינתזה של האנתוציאנינים; (5) בחינת השפעות האור על פרחים עם וללא עלים והשפעות הגומלין עם נוכחות סוכר בתמיסה על ביטוי הגנים של מסלול הביוסנינתזה של האנתוציאנינים בעלי כותרת.

ג. פירוט הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו:

1.1. סיכום תוצאות משנה א':

בשנה הראשונה למחקר בוצעו ניסויים בשתי מערכות של פרחי ליזיאנתוס: צמחי עציץ ופרחים קטופים. נבדקה תכולת האנתוציאנינים בעלי כותרת בשלבים שונים של התפתחות הצבע ובתנאי הארה שונים (בית-רשת או חממה בהשוואה לחדר התצפית). נלקחו דגימות למיצוי RNA מעלי הכותרת, ונבדק הביטוי של מספר גנים המקודדים לאנזימי מפתח במסלול הביוסנינתזה של האנתוציאנינים, בשלבי התפתחות שונים של הפרח.

התוצאות שהתקבלו הראו שצבע עלי הכותרת של 3 זני הליזיאנתוס שנבחנו ('New purple', 'אקו כחול' ו'גלבע'), אכן מושפע מעוצמת האור, וככל שהפרח נחשף לתאורה נמוכה בשלב התפתחות מוקדם יותר - רמת האנתוציאנינים בעלי הכותרת שלו הייתה נמוכה יותר. לכן צבע הפקעים המתפתחים ונפתחים באגרטל בחדר תצפית היה חיוור ורחוק מאוד מהצבע האופייני לזן שמתקבל בגידול בבית רשת/שדה. תוצאות דומות התקבלו הן בפרחים על הצמח במערכת של צמחי עציץ והן בפרחים קטופים. בנוסף, הוכנו גלאים ל-7 גנים במסלול הביוסנינתזה של האנתוציאנינים בעזרת הפלסמידים שהתקבלו מהחוקר היפני Naonobu Noda, שהכילו את הרצפים המלאים של ה-cDNAs המייצגים את הגנים הנ"ל, ובוצעו אנליזות ביטוי ל-3 מהגנים המעורבים בשלבים המאוחרים במסלול (*ANS DFR* ו-*F3'5'H*). הממצאים הראו שביטויים של 3 גנים אלה נמוך יותר בפרחים שנפתחו בחדר התצפית (עוצמת אור נמוכה) בהשוואה לביטויים הגבוה בפרחים שנפתחו בחממה או בבית-רשת (עוצמת אור גבוהה). השינויים בביטוי הגנים המקודדים ל-3 אנזימי מפתח במסלול הביוסנינתזה של

האנתוציאנינים ואשר דווחו כמבוקרים ע"י עוצמת האור, תאמו את הממצאים שהתקבלו לגבי השפעת עוצמת האור על רמת האנתוציאנינים. נראה לכן שהתוצאות שהתקבלו עד כה מאשרות את השערת המחקר לגבי בקרת התפתחות הצבע ע"י עוצמת ההארה במהלך התפתחות הפרח.

2.2. סיכום תוצאות משנה ב':

בשנה השניה למחקר המשכנו בביצוע ניסויים בשתי המערכות של פרחי ליזיאנתוס, צמחי עציץ ופרחים קטופים. נבדקה תכולת האנתוציאנינים בעלי כותרת בשלבים שונים של התפתחות הפרח, בתנאי הארה שונים (בית-רשת או פיטוטרון בהשוואה לחדר התצפית), בפרחים עם וללא עלים וכן עם וללא נוכחות של סוכרוז בתמיסת האגרטל. בשנה זו השלמנו את אנליזות הביטוי שהתחלנו בשנה א' ובחנו בעזרת אנליזת Northern או semi-quantitative RT-PCR, את השינויי הביטויים של שני גנים נוספים במסלול הביסיתנזה של אנתוציאנינים: *F3H*, *CHS*, וכן של הגן *FLS* שמוביל לסינתזת הפלבונולים, בשלבי התפתחות שונים של הפרח. כן בוצעה אנליזת HPLC של אנתוציאנינים ופלבונולים.

התוצאות העיקריות שהתקבלו הראו שוב שצבע עלי הכותרת של זני הליזיאנתוס שנבחנו ('New purple', 'אקו כחול', 'קיוטו סגול' ו'מאריצ'י'), הן בפרחים על הצמח והן בפרחים קטופים, הושפע מאוד מעוצמת האור. צבע הפקעים המתפתחים ונפתחים באגרטל היה חיזור ורחוק מאוד מהצבע האופייני בפרחים הנפתחים בחלקת הגידול או בתנאי תאורה טבעיים בחוץ. בנוסף, התוצאות הראו שעוצמת הצבע (תכולת האנתוציאנינים) בפרחים שהתפתחו בפיטוטרון ובבית-הרשת הייתה דומה מאוד, דבר המעיד על כך שהאור ולא הטמפרטורה, הוא אכן הסיגנל הדומיננטי הגורם להתפתחות הצבע. ההשערה שייטכן והירידה בעוצמת הצבע בפרחים שנפתחו בחדר תצפית נובעת כתוצאה מהסטת מסלול הביסיתנזה של האנתוציאנינים לכיוון של יצירת פלבונולים חסרי צבע, הופרכה. מתוצאות הרכב הפלבונולים בפרח נראה שלמרות העליה המעטה בתכולת הקמפרול שהוא הפלבונול העיקרי בפרח, שהתקבלה בהשפעת האור הנמוך של חדר התצפית, לא ניתן להסביר את הירידה בתכולת האנתוציאנינים בתנאים אלה בהטיית המסלול לכיוון הפלבונולים חסרי הצבע.

התקבלה שונות מסויימת בביטוי של חלק מהגנים בניסויים שונים בשתי מערכות בדיקה - עם פרחים בצמחי עציץ מהזן 'New purple' ובפרחים קטופים מזן 'אקו כחול'. בשתי המערכות התקבל בניסוי אחד ביטוי מופחת של גנים מסוימים באור נמוך, והביטוי של גנים אחרים לא השתנה ואף עלה מעט, ובניסוי אחר הביטוי של כל הגנים היה נמוך בצורה משמעותית.

התוצאות מהניסויים שבוצעו בפרחים קטופים עם או ללא עלים ועם או ללא סוכר בתמיסת האגרטל מצביעות על כך שקליטת סיגנל האור מתרחשת הן דרך העלים והן ישירות באמצעות עלי הכותרת, ויש השפעת גומלין בין האור לבין נוכחות סוכר בתמיסת האגרטל. לראשונה הודגם שתוספת סוכר לתמיסת האגרטל הגבירה את התפתחות הצבע גם בפרחים (עם וללא עלים) שהתפתחו באור גבוה.

התוצאות שהתקבלו בשנה השניה תמכו בהשערת המחקר לגבי בקרת התפתחות הצבע ע"י עוצמת ההארה במהלך התפתחות הפרח. בנוסף התוצאות העידו על רמת ביטוי נמוכה של כל הגנים במסלול הביסיתנזה של אנתוציאנינים בהשפעת הדגרה באור נמוך, והצביעו על האפשרות של קיום גורם בקרה מרכזי (פקטור שעתוק) שמושפע ע"י עוצמת האור ומבקר את הביטוי של כלל הגנים במסלול. כיוון שבשני ניסויים נפרדים התקבלו השפעות שונות של עוצמת האור על ביטוי של מספר גנים, הועלתה ההשערה שייטכן שפקטור שעתוק כזה מבקר את ביטויים רק של חלק מהגנים במסלול. בנוסף, יתכן וההבדלים נובעים מהשפעה שונה של סיגנל האור שנקלט בעלים בהשוואה לקליטתו בעלי הכותרת, והנושא נבחן בשנה ג' למחקר.

3.ג. פירוט התוצאות משנה ג':

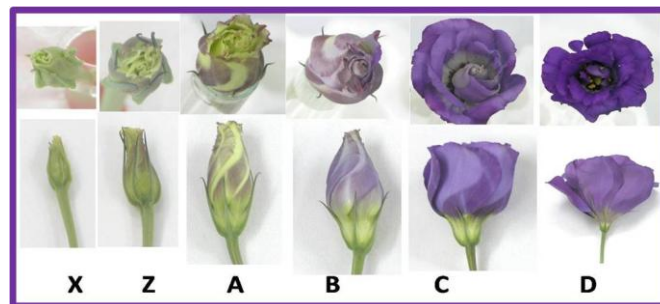
1.3.ג. בחינת השפעת תנאי ההארה בשילוב עם הסרת עלים ונוכחות סוכר בתמיסה על התפתחות הצבע בפרחי

ליזיאנתוס קטופים ועל ביטוי הגנים במסלול הביוסניתזה של האנתוציאנינים

התוצאות שהתקבלו בשנה ב' למחקר הצביעו על כך, שאכן בתנאי אור גבוה ישנה עליה מסוימת בתכולת האנתוציאנינים גם בפרחים מנותקים ללא עלים, אך תוספת של סוכר במבחנה, בתלות בריכוזו, הגבירה את תכולת האנתוציאנינים בצורה משמעותית מעבר להשפעת האור. כאשר ריכוז הסוכרוז במבחנה היה 2% עוצמת הצבע בתנאי אור גבוה הייתה גבוהה יותר מאשר בנוכחות של 1% סוכרוז.

נשאלת השאלה האם השפעת האור, הנקלטת ישירות ע"י עלי הכותרת בפרח, דומה להשפעתו כאשר הוא נקלט ע"י העלים, והאם בשני אופני הקליטה הוא משפיע על אותם הגנים של ביוסניתזה האנתוציאנינים. בנוסף, לא ברור האם לסוכר יש מעורבות בבקרת הביטוי של גנים האלו. כדי לבדוק אפשרויות אלה, חזרנו על הניסוי משנה ב' עם עוקצי פרחים מנותקים של ליזיאנתוס מזנים 'מאריצי' ו'מינואט סגול כהה', עם או ללא עלים, שהתפתחו בשתי עוצמות אור - בפיטורון (עוצמת אור גבוהה) ובחדר התצפית (עוצמת אור נמוכה), עם וללא 2% סוכרוז בתמיסה. הניסוי הראשון בוצע עם פרחי הזן 'מאריצי' כאשר כל הפרחים המנותקים (עם וללא שני עלים) הודגרו בתמיסת סוכרוז 2% באור גבוה (פיטורון) או באור נמוך (חדר התצפית).

בניסוי השני שבוצע עם עוקצי פרחים מנותקים של הזן 'מינואט סגול כהה' נבחנה השפעת האור בגומלין עם השפעת הסוכרוז בתמיסה ונוכחות של שני עלים על הגבעול. בשני הניסויים שלב התפתחות הפקע בזמן הניתוק היה שלב A, ותכולת האנתוציאנינים בעלים נמדדה בשלב D (פרח פתוח). הגדרות שלבי ההתפתחות של הפרח מפורטות באיור 2. בנוסף, נלקחו דוגמאות להפקת RNA מעלי כותרת בשלבים השונים של התפתחות הפרח מהטיפולים השונים (פרחים עם או ללא עלים, עם או ללא סוכר באגרטל), ונבחן ביטוי הגנים של ביוסניתזה האנתוציאנינים בהשפעת טיפולים אלה בשלבי התפתחות B, C ו-D (איור 2).



איור 2: הגדרת שלבי ההתפתחות השונים של פרחי ליזיאנתוס מזן 'אקו כחול' של שגדלו בחממה אצל המגדל (בתנאי אור גבוה), עפ"י מופע ועוצמת צבע ממבט מעל (פנל עליון) וממבט מהצד (פנל תחתון).

התוצאות המובאות באיור 3 (זן מאריצי) מראות שהאור הגבוה העלה את רמת האנתוציאנינים בפרח ללא עלים ועם עלים. נוכחות של שני עלים וגוטיביים בגבעול באור נמוך העלתה במידה מועטה את רמת האנתוציאנינים, לעומת השפעה סינרגיסטית לשילוב של אור גבוה ונוכחות עלים בגבעול. השפעת נוכחות עלים ועוצמת ההארה על ביטוי הגנים של ביוסניתזה האנתוציאנינים מובאת באיור 4. התוצאות מראות שבפרחים ללא עלים נמצאה עליה מועטה בלבד בביטוי הגנים *CHI*, ו-*DFR* בהשפעת האור הגבוה (פיטורון) בהשוואה לאור הנמוך (חדר התצפית), ובמקביל הביטוי של הגנים *CHI*, *F3H*, ו-*F3'5'H* ירד במידה מועטה. נוכחות עלים בלבד (בתנאי אור נמוך בחדר התצפית) די היה בה כדי להשפיע על ירידה בביטוי הגן *CHS*, הגברת ביטוי הגנים *CHI* ו-

DFR בשלבים B ו-C והגברת ביטוי הגן ANS בשלבים C ו-D. בנוכחות עלים התקבלה הגברה משמעותית של הגנים *CHI*, *CHS*, *F3H* ו-DFR בכל שלבי ההתפתחות, ושל הגן ANS בשלבים C ו-D (איור 4).

התוצאות שהתקבלו בניסוי זה עם הזן 'מאריצי' מחזקות את הממצאים לגבי קליטת סיגנל האור ע"י העלים, שכן התקבלה עלייה ברמת האנתוציאנינים בנוכחות עלים גם בעוצמת אור נמוכה. תוצאה זו מציעה שתי אפשרויות: א. העלים מגיבים ומעבירים סיגנל גם בעוצמת אור נמוכה; ב. העלים מעבירים סיגנל אחר לביטוי גנים של אנתוציאנינים בפרח (ללא תלות בסיגנל האור), ובאור גבוה הסיגנל הזה מוגבר.

יש לציין שפקעי הזן 'מאריצי' בשלב A (השלב בו הפקעים נותקו מצמח האם והועברו למבחנות) הם בהירים מאוד וכמעט שאינם מכילים כלורופיל. לכן בוצע הניסוי השני עם פרחי הזן 'מינואט סגול כהה' בו הפקעים בשלב A ירקרקים ומכילים כלורופיל. בניסוי זה, בנוסף להשפעת עוצמת האור ונוכחות עלים, נבחנה גם השפעת הנוכחות של 2% סוכרוז במבחנה על עוצמת הצבע וביטוי הגנים.

פרחי הזן 'מינואט סגול כהה' הובאו מהמגדל והוטענו למשך 4 שעות ב-20 מ"צ + 20 שעות ב-4 מ"צ בתמיסה שהכילה TOG-4 0.2% + STS 0.3% + BA 0.5% + סוכרוז 5%. לאחר ההטענה פרחים בשלב התפתחות A נחתכו בעוקץ (פרחים ללא עלים) או להשאר גבעול באורך של 25 ס"מ תוך השארת שני עלים מפותחים על הגבעול (פרחים עם עלים), הוכנסו לתמיסת TOG-6 או לתמיסת TOG-6 בתוספת 2% סוכרוז, והוצבו על שולחן בחוץ באור מלא (אור גבוה - HL) למשך היום והוכנסו לאחר מכן לחדר תצפית (20 מ"צ) למשך הלילה, או שהוצבו בחדר התצפית בתנאי הפוטופריודה (אור נמוך - LL). יש לציין שהניסוי בוצע בתקופת החורף (תחילת נובמבר) והיו מספר ימים עם עננות. כאשר הפרחים הגיעו לשלב D נלקחו מהם דגימות למיצוי אנתוציאנינים.

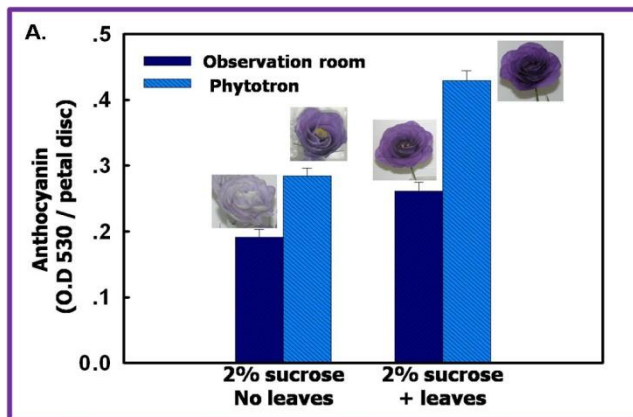
תנאי האור הגבוה הגבירו את תכולת האנתוציאנינים בעלי הכותרת רק כאשר הוסף 2% סוכרוז למבחנה בפרחים מנותקים ללא עלים (איור 5). לעומת זאת, בנוכחות עלים ההשפעה הן של תוספת 2% סוכרוז והן של האור הגבוה (ללא סוכרוז) הייתה משמעותית ביותר, ובאותה מידה (פי 4 בתכולת הפיגמנטים בהשוואה לתמיסה ללא סוכר ובאור נמוך). עוצמת הצבע הגבוהה ביותר הייתה בפרחים המנותקים בנוכחות עלים + 2% סוכרוז שהודגרו באור גבוה (איור 5).

ההשפעות של נוכחות עלים בשילוב עם עוצמת האור על ביטוי הגנים של ביוסינתזת האנתוציאנינים בפרחים שהודגרו ללא סוכרוז בתמיסת המבחנה מוצגות באיור 6. רואים בבירור שבכל התנאים (גם ללא עלים ובאור נמוך) יש עליה משמעותית בביטוי של כל הגנים בין שלב A לשלב B, דבר המצביע על בקרה התפתחותית של ביטוי גנים אלו. רק בביטוי של הגן *FLS*, המקודד ספציפית לאנזימים של הביוסינתזה של פלבנוולים, לא התקבלה עליה כזו. גם פרחים מנותקים ללא עלים הגיבו לעוצמת האור, והדבר התבטא בעיקר בהגברת הביטוי של כל הגנים (למעט *CHS*) בשלב התפתחות C (איור 6). נוכחות עלים בתנאי אור נמוך כמעט ולא השפיעה על ביטוי הגנים בשלב B, אך הגבירה את ביטוי הגנים המאוחרים יותר *F3'5'H*, *DFR* ו-*ANS* בשלב C (איור B6). הדגרת פרחים עם עלים באור גבוה גרמה להגברה מובהקת של ביטוי כל הגנים בעיקר בשלב B, אך הפחיתה את ביטוי הגן *FLS* בכל השלבים (איור 6).

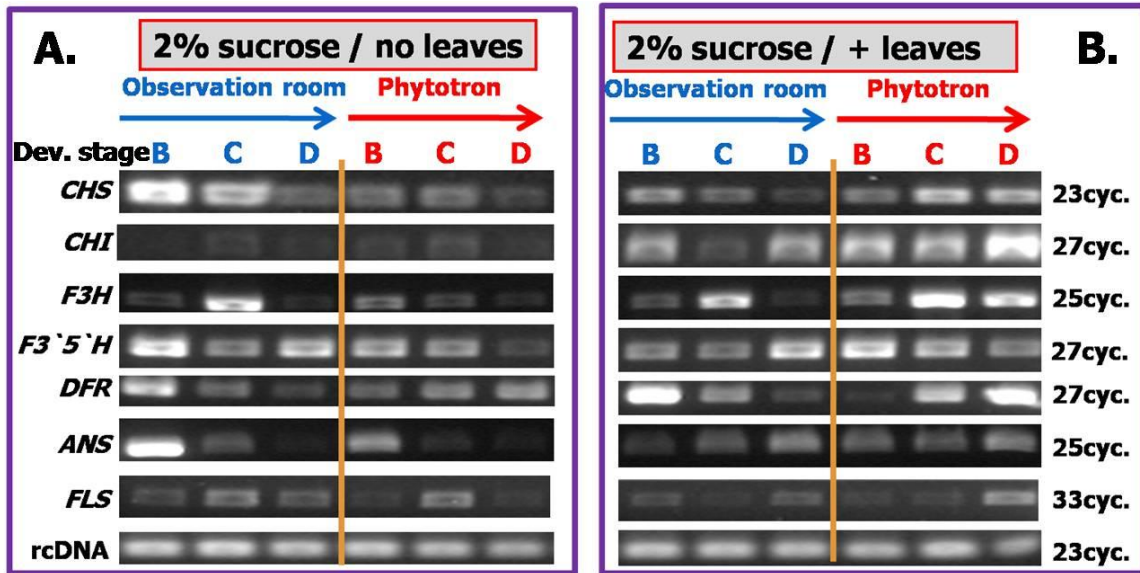
התוצאות המסוכמות באיור 7 מציגות את השפעת הטיפוליים (אור גבוה ונוכחות עלים) על ביטוי הגנים בנוכחות 2% סוכרוז בתמיסת המבחנה. התוצאות מראות שאור גבוה הגביר בצורה משמעותית את ביטוי כל הגנים (פרט לגן *F3'5'H*) בשלב C בפרחים ללא עלים (איור A7). נוכחות עלים באור נמוך הגבירה את ביטוי כל הגנים באופן הבולט ביותר בשלב D (איור B7). נוכחות עלים באור גבוה הגבירה את ביטוי כל הגנים (פרט לגן *FLS*) באופן דרמטי ביותר בשלב B, אך גם בשלב C רמת הביטוי הייתה גבוהה יותר מאשר באור נמוך (איור B7). התוצאות מראות שאור גבוה הגביר את ביטוי הגנים בפרחים ללא נוכחות עלים הן כשהודגרו ללא סוכרוז (איור 6), דבר שלא בא לידי ביטוי בתכולת האנתוציאנינים בפרח (איור 5), והן כשהודגרו ב-2% סוכרוז (שלב C באיור A7), ממצא שכן בא לידי ביטוי ברמת האנתוציאנינים (איור 5). ביטוי גבוה במיוחד של הגנים

בעיקר בשלב B וגם בשלב C התקבל בנוכחות עלים ואור גבוה הן ללא סוכרוז (איור B6) והן בנוכחות סוכרוז (איור 7). ממצא זה היה בהתאמה מלאה להשפעת טיפולים אלה על תכולת האנתוציאנינים בפרח (איור 5). השפעת נוכחות סוכרוז בתמיסת המבחנה בעוצמות הארה שונות על ביטוי הגנים של ביוסינתזת האנתוציאנינים בפרחים מנותקים עם עלים או ללא עלים מוצגת באיורים 8, ו-9, בהתאמה. תוצאות השפעת עוצמת ההארה מאשרות באופן מלא את הממצאים הקודמים שתוארו לעיל באיורים 6, 7. אי לכך ניתוח התוצאות יתמקד בבחינת ההשפעות של נוכחות הסוכרוז בתמיסה על ביטוי הגנים (השוואת איורים A8, A9 - ללא סוכרוז לאיורים B8, B9 - עם סוכרוז). הסוכרוז גרם לירידה בביטוי כל הגנים בכל השלבים (למעט בביטוי הגן *CHS* בשלבים B ו-C) בפרחים מנותקים עם עלים שהודגרו בתנאי אור נמוך (איור 8). גם בתנאי אור גבוה סוכרוז הפחית את הביטוי של כל הגנים בשלבים C ו-D בפרחים אלה, למעט הגן *CHS* שבביטויו לא חל שינוי (איור 8). השפעת הסוכרוז בהפחתת הביטוי של כל הגנים בולטת אף יותר בפרחים מנותקים ללא עלים, כאשר בנוכחות סוכרוז לא התקבל כמעט כל ביטוי (איור 9). השפעה משמעותית זו של הסוכרוז בהפחתת הביטוי של הגנים המקודדים לביוסינתזה של אנתוציאנינים מפתיעה ביותר, ומנוגדת להשפעת הסוכרוז על הגברת תכולת האנתוציאנינים (איור 5א) וצבע הפרחים (איור 5ב' וד"ח שנה ב'). ההשפעות המנוגדות של הסוכרוז בהגברת הפיגמנטציה מצד אחד ובהפחתת ביטוי הגנים לביוסינתזה של אנתוציאנינים מצד שני מצביעות על דוגמה לא אופיינית של חוסר התאמה בין ביטוי הגנים לביוסינתזה של האנתוציאנינים לבין תכולת האנתוציאנינים. תוצאה מפתיעה זו מציעה שהשפעת הסוכרוז בהגברת עוצמת הצבע של עלי הכותרת של פרחי ליזיאנתוס אינה נובעת מהגברת הביוסינתזה של האנתוציאנינים, אלא נובעת כנראה מהשפעת הסוכרוז על תהליכים מטבוליים או על ייצובם של הפיגמנטים, שכן ידוע שאנתוציאנינים שונים מיוצבים באמצעות קישור למולקולות סוכר. נראה לכן שלסוכר, בניגוד לאור, אין תפקיד בקרתי כסיגנל במערכת זו, אלא הוא משמש כמקור לאנרגיה או כקדם לתהליכים מטבוליים של האנתוציאנינים.

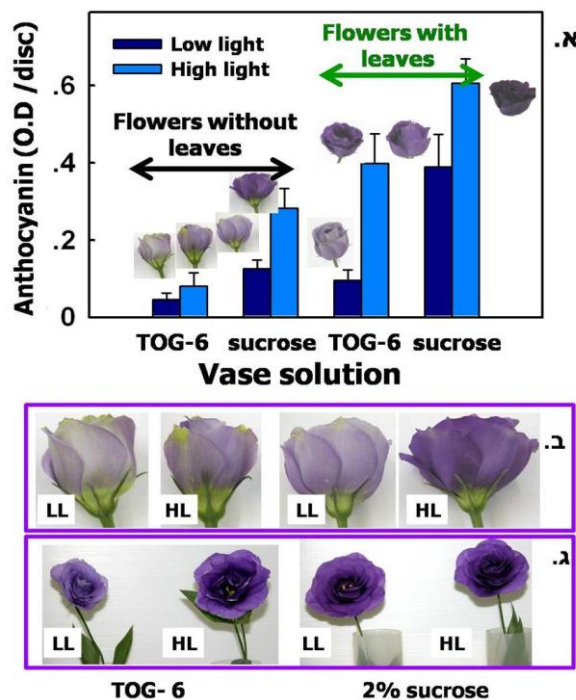
יש לציין שבשני הזנים שנבחנו, 'מאריצי' (איורים 3, 4) ו'מינואט סגול כהה' (איורים 5-9) התקבלו השפעות דומות של עוצמות ההארה ונוכחות העלים על רמות האנתוציאנינים וביטוי הגנים, ממצא המעיד על כלליות התופעה.



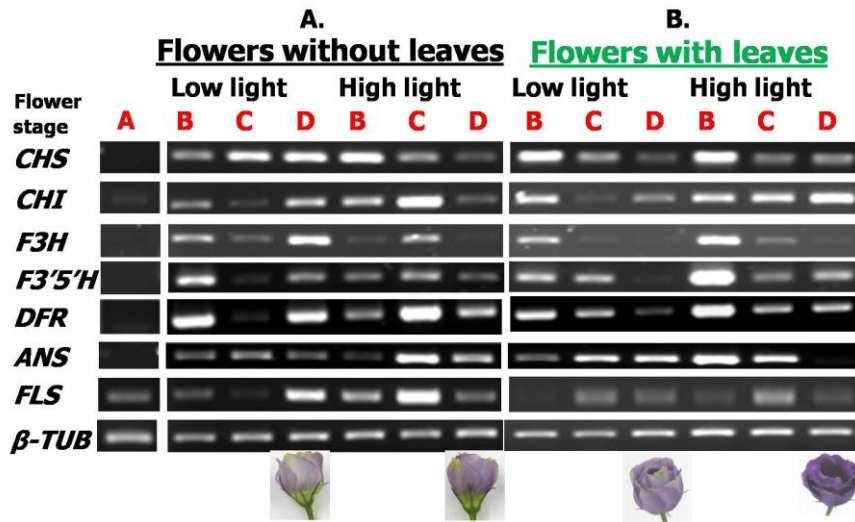
איור 3: השפעת עוצמת ההארה ונוכחות עלים על תכולת אנתוציאנינים בפרחי ליזיאנתוס מנותקים מזן 'מאריצי' שהודגרו בנוכחות 2% סוכרוז במבחנה. הפרחים הובאו מהמגדל והוטענו בתמיסה שכללה 0.2% TOG-4 + 0.5% BA + 0.3% STS + סוכרוז 5% למשך 4 שעות ב- 20 מ"צ + 20 שעות ב- 4 מ"צ. בתום ההטענה פרחים בשלב התפתחות A נחתכו בעוקץ (פרחים ללא עלים) או לאורך של 25 ס"מ כאשר שני עלים מפותחים הושארו על הגבעול (תמונה B), הוכנסו לתמיסת TOG-6 בתוספת 2% סוכרוז, והוצבו בחדר התצפית או בפיטורון. מיצוי האנתוציאנינים מעלי הכותרת נעשה בפרחים שהגיעו לשלב התפתחות D. מופע וצבע הפרחים בהשפעת כל טיפול מוצגים בתמונות שמעל לעמודות. התוצאות מייצגות ממוצעים של 5 חזרות ± שגיאת תקן.



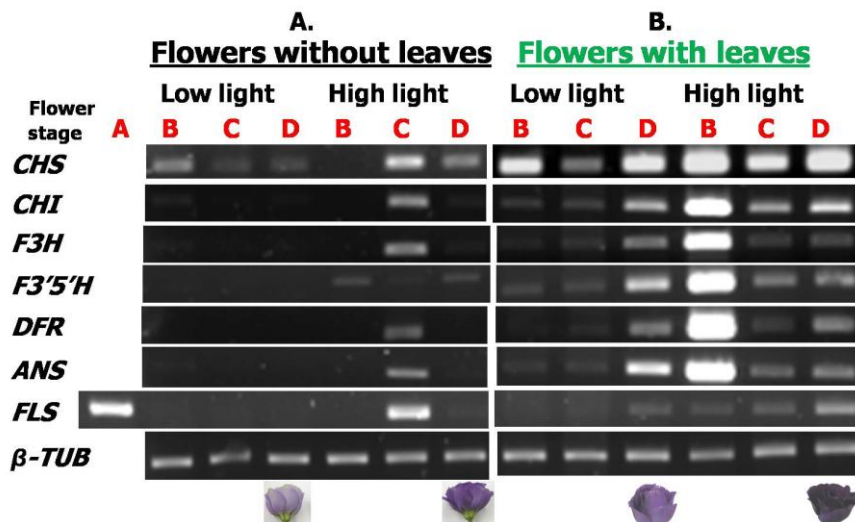
איור 4: השפעת עוצמת ההארה על ביטוי הגנים *CHS*, *CHI*, *F3H*, *F3'5'H*, *DFR*, *ANS*, *FLS* של ביוסינתזת האנתוציאנינים בשלבי התפתחות שונים של פרחי ליזיאנתוס מנותקים מהזן 'מאריצי' שהודגרו ללא עלים (A) או עם עלים (B) בנוכחות 2% סוכרוז במבחנה. פרטי הניסוי הם כמתואר באיור 3. אנליזת ביטוי הגנים בוצעה באמצעות *semi-quantitative RT-PCR*.



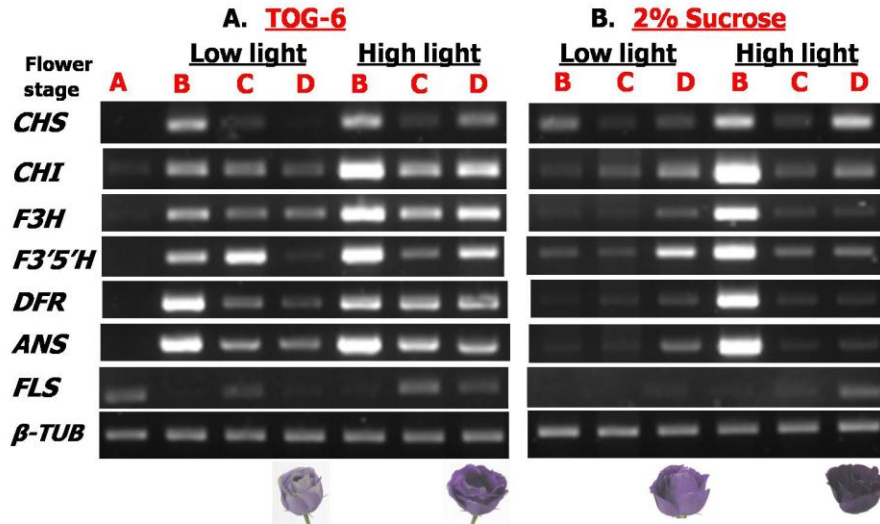
איור 5: השפעת עוצמת ההארה, נוכחות עלים ותוספת 2% סוכרוז במבחנה על תכולת אנתוציאנינים בפרחי ליזיאנתוס מנותקים מזן 'מינואט סגול כהה' (א') ועל המופע והצבע של פרחים מנותקים ללא עלים (ב') או עם עלים (ג') בשלב התפתחות D. הפרחים הובאו מהמגדל והוטענו בתמיסה שכללה TOG-4 + 0.2% + 0.5% BA + 0.3% STS + סוכרוז 5% למשך 4 שעות ב- 20 מ"צ + 20 שעות ב- 4 מ"צ. לאחר ההטענה פרחים בשלב התפתחות A נחתכו בעוקץ (פרחים ללא עלים) או לאורך של 25 ס"מ כאשר שני עלים מפותחים הושארו על הגבעול (פרחים עם עלים), הוכנסו לתמיסת TOG-6 או לתמיסת TOG-6 בתוספת 2% סוכרוז, והוצבו על שולחן בחוץ באור מלא (אור גבוה - HL) למשך היום והוכנסו לאחר מכן לחדר תצפית (20 מ"צ) למשך הלילה, או שהוצבו בחדר התצפית בתנאי הפוטופריודה (אור נמוך - LL). מיצוי האנתוציאנינים מעלי הכותרת נעשה בפרחים שהגיעו לשלב התפתחות D. התוצאות מייצגות ממוצעים של 5 חזרות ± שגיאת תקן.



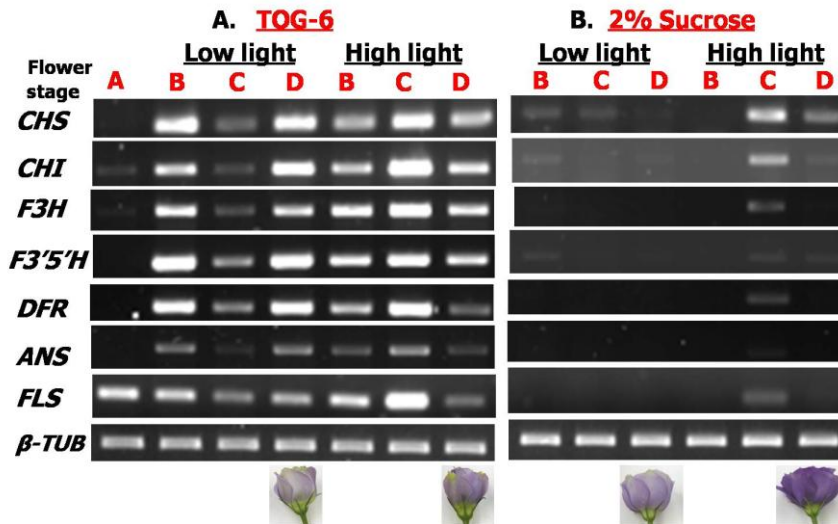
איור 6: השפעת עוצמת ההארה ונוכחות עלים על ביטוי הגנים *CHS*, *CHI*, *F3H*, *F3'5'H*, *DFR*, *ANS*, *FLS* -1, בשלבי התפתחות שונים של פרחי ליזיאנתוס מנותקים מזן 'מינואט סגול כהה' ללא עלים (A) או עם עלים (B) שהודגרו בתמיסה המכילה TOG-6. פרטי הניסוי הם כמתואר באיור 5. אנליזת ביטוי הגנים בוצעה באמצעות semi-quantitative RT-PCR. מופע וצבע הפרחים בשלב D בהשפעת כל טיפול מוצגים בתמונות שבתחתית האיור.



איור 7: השפעת עוצמת ההארה ונוכחות עלים על ביטוי הגנים *CHS*, *CHI*, *F3H*, *F3'5'H*, *DFR*, *ANS*, *FLS* -1, בשלבי התפתחות שונים של פרחי ליזיאנתוס מנותקים מזן 'מינואט סגול כהה' ללא עלים (A) או עם עלים (B) שהודגרו בתמיסה המכילה TOG-6 + 2% סוכרוז. פרטי הניסוי הם כמתואר באיור 5. אנליזת ביטוי הגנים בוצעה באמצעות semi-quantitative RT-PCR. מופע וצבע הפרחים בשלב D בהשפעת כל טיפול מוצגים בתמונות שבתחתית האיור.



איור 8: השפעת הדגרה בשתי עוצמות הארה של פרחי ליזיאנתוס מנותקים מזן 'מינואט סגול כהה' עם עלים, ללא (A) ועם (B) סוכרוז בתמיסה, על ביטוי הגנים *CHS*, *CHI*, *F3H*, *F3'5'H*, *DFR*, *ANS*, *FLS* ו-*FLS* בשלבי התפתחות שונים. פרטי הניסוי הם כמתואר באיור 5. אנליזת ביטוי הגנים בוצעה באמצעות semi-quantitative RT-PCR. מופע וצבע הפרחים בשלב D בהשפעת כל טיפול מוצגים בתמונות שבתחתית האיור.



איור 9: השפעת הדגרה בשתי עוצמות הארה של פרחי ליזיאנתוס מנותקים מזן 'מינואט סגול כהה' ללא עלים, ללא (A) ועם (B) סוכרוז בתמיסה, על ביטוי הגנים *CHS*, *CHI*, *F3H*, *F3'5'H*, *DFR*, *ANS*, *FLS* ו-*FLS* בשלבי התפתחות שונים. פרטי הניסוי הם כמתואר באיור 5. אנליזת ביטוי הגנים בוצעה באמצעות semi-quantitative RT-PCR. מופע וצבע הפרחים בשלב D בהשפעת כל טיפול מוצגים בתמונות שבתחתית האיור.

ד. דיון - מסקנות והשלכותיהן על המשך ביצוע המחקר

1. במהלך המחקר בוצעו ניסויים עם 6 זני ליזיאנתוס שונים. הממצאים שהתקבלו עם הזנים השונים הן בפרחי עציץ ('New purple') והן בפרחים קטופים ('אקו כחול', 'גלבוני', 'קוטו סגול', 'מאריצי', 'מינואט סגול כהה') מראים, שככל שהפרח נחשף לתאורה נמוכה בשלב התפתחות מוקדם יותר – רמת האנתוציאנינים המצטברת בעלי הכותרת שלו נמוכה יותר.
2. ביטוי הגנים המקודדים לאנזימים במסלול הביסנינתזה של האנתוציאנינים נמצא מבוקר ע"י עוצמת האור, ממצא התואם את הממצאים שהתקבלו לגבי השפעת עוצמת האור על השינוי ברמת האנתוציאנינים. התקבלה אמנם שונות מסוימת בביטוי של חלק מהגנים בניסויים השונים בשתי מערכות בדיקה - עם פרחים

מזן 'New purple' כצמחי עציץ ובפרחים קטופים מזן 'אקו כחול', אך באופן כללי התוצאות הדומות שהתקבלו עם הזנים השונים מעידות על כלליות המערכת ואמיתות השפעת האור.

3. התוצאות הראו שעוצמת האור ולא הטמפרטורה, הוא אכן הסיגנל הדומיננטי הגורם להתפתחות הצבע.
4. לא ניתן להסביר את הירידה בעוצמת הצבע בפרחים שנפתחו בחדר תצפית בהטיית המסלול לכיוון הפלבונולים חסרי הצבע, ונראה שהיא נובעת בעיקר מהפחתה בביוסינתזה של האנתוציאנינים.
5. התוצאות שהתקבלו תמכו בהשערת המחקר לגבי בקרת התפתחות הצבע ע"י עוצמת ההארה במהלך התפתחות הפרח, והעידו על רמת ביטוי נמוכה של כל הגנים במסלול הביוסינתזה של האנתוציאנינים בהשפעת הדגרה באור נמוך.

התוצאות מהניסויים שבוצעו בפרחים מנותקים עם או ללא עלים ועם או ללא סוכר בתמיסת האגרטל שהחלו בשנת המחקר השנייה ונמשכו בשנת המחקר השלישית מציעות את המסקנות הבאות:

1. הבקרה על ביטוי הגנים המקודדים לאנזימים במסלול הביוסינתזה של האנתוציאנינים היא קודם כל בקרה התפתחותית בפרחים קטופים ו/או מנותקים, וחלה בשלבים שבין A ל-B (עם שונות קלה בין הזנים). ממצא זה הוא בהתאמה לשינויים שנמצאו בפרחים לא קטופים שהתפתחו בתנאים רגילים ולדיווחים בספרות.
2. בנוסף לבקרה ההתפתחותית נמצא, שעוצמת האור משפיעה מאוד על ביטוי הגנים המעורבים בביוסינתזה של האנתוציאנינים, שכן ביטויים עלה בשלבי ההתפתחות B ו-C לאחר חשיפה לעוצמות אור גבוהות.
3. סיגנל האור נקלט ע"י רקמה ירוקה המכילה כלורופיל. עיקר הסיגנל נקלט ע"י העלים וסיגנל זה הוא סיסטמי ומגיע אל עלי הכותרת. גם הפקעים, בעיקר אלו המכילים יותר כלורופיל, קולטים כנראה את סיגנל האור. יתכן שחלק מסיגנל האור שנקלט בפרחים מנותקים ללא עלים (בעיקר בזן 'מינואט סגול כהה') יכול להיקלט גם באמצעות עלי הגביע שלא הוסרו. בשלב של פקעים צעירים מאוד המכילים הרבה כלורופיל סיגנל האור נקלט גם ע"י אזורי עלי הכותרת החשופים ישירות לאור שאינם מכוסים ע"י עלי הגביע או עלי כותרת חיזוניים, אך השפעה זו מקומית ואינה סיסטמית, ולכן מתקבלים השוליים הצבעוניים הבולטים של עלי הכותרת, שנשארים כך גם בפרחים פתוחים (איור 2).
4. תוספת סוכר לתמיסת האגרטל הגבירה את רמת האנתוציאנינים בפרחים שנחשפו לאור נמוך, ובסינרגיסטיות עם עוצמת אור גבוהה בפרח הקטוף וגם בפרחים מנותקים (עם וללא עלים). אך באופן לא צפוי נמצא שהתוספת של 2% סוכרוז בתמיסה, שהגבירה את עוצמת הצבע, הפחיתה את ביטוי הגנים במסלול הביוסינתזה של האנתוציאנינים. ממצא זה הוא גם בניגוד למידע בספרות לגבי פרחים אחרים, כגון פטוניה. תוצאה זו בלתי אופיינית למתאם המקובל והמדווח בין צבירת האנתוציאנינים ברקמה לבין ביטוי מוגבר של הגנים של ביוסינתזה האנתוציאנינים. נראה לכן שהסוכר מגביר את רמת האנתוציאנינים בעלי הכותרת של פרחי ליזיאנתוס במנגנון אחר שאינו קשור להגברת ביטוי הגנים המקודדים לאנזימי הביוסינתזה של האנתוציאנינים. ייתכן והמנגנון קשור לייצוב מטבולי של האנתוציאנינים באמצעות הסוכר.
5. למעט חריגות מעטות, באופן כללי נראה שהביטוי של כל הגנים במסלול של ביוסינתזה האנתוציאנינים הושפע משלב ההתפתחות ועוצמת האור. ממצא זה מציע בקרה ע"י חלבון שיעתוק Transcription Factor או קומפלקס (כמדווח בספרות) שמבקר את כלל מסלול הביוסינתזה של האנתוציאנינים ומושפע כנראה ע"י עוצמת האור.

יש בדעתנו לנסות ולבודד את פקטור השיעתוק הזה שהוא כנראה מקבוצת MYB באמצעות פריימרים דגנרטיביים שבעזרתם בודד פקטור שיעתוק זה מפירות מנגוסטין. במידה ונצליח במשימה זו אנו מתכוונים להגיש תוכנית המשך בנושא זה.

ה. פירוט הפרסומים המדעיים בכתב ובע"פ

פרסומים בכתב:

Meir, S., Kochanek, B., Glick, A., Salim, S., Lers, A., Burd, S., Weiss D. and Philosoph-Hadas, S. (2008). Reduced petal pigmentation in Lisianthus cut flowers under low light conditions is mediated via decreased expression of anthocyanin biosynthesis genes. Abstract in the 9th International Symposium on Postharvest Quality of Ornamental Plants, Odense, Denmark. p. 15.

Meir, S., Kochanek, B., Glick, A., Salim, S., Lers, A., Burd, S., Weiss D. and Philosoph-Hadas, S. (2009). Reduced petal pigmentation in Lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) flowers under low light conditions is associated with decreased expression of anthocyanin biosynthesis genes. Acta Horticulturae, In press.

פרסומים בע"פ:

ניתנו הרצאות בשני כנסים בינלאומיים:

The 9th International Symposium on Postharvest Quality of Ornamental Plants, Odense, Denmark.

שהתקיים באוגוסט 2008 בדנמרק.

The 6th International Symposium on Postharvest, Antalya, Turkey.

שהתקיים באפריל 2009 בתורכיה.

ו. סיכום עם שאלות מנחות לד"ח המחקר

1. מטרת המחקר לתקופת הד"ח תוך התייחסות לתכנית העבודה:

המטרה הכללית הייתה לאפיין בפרחי ליזיאנתוס את ביטוי הגנים במסלול הביוסניתזה של האנתוציאנינים כולל הבקרה ע"י עוצמת האור, והשפעות הגומלין האפשריות בין עוצמת האור לנוכחות עלים ו/או סוכר בתמיסת האגרטה. העדר ביטוי של גנים אלו בפרח הקטוף המוצב בעוצמת אור נמוכה של חדר התצפית יתכן ומהווה את המגבלה להתפתחות הצבע בפקעי ליזיאנתוס הנפתחים באגרטה. **בשנים א' ו-ב': 1** לימוד הבקרה הפיסיולוגית של ביטוי הצבע ע"י עוצמת האור בצמחי עציץ ובפרחים קטופים של ליזיאנתוס; **2** בחינת השפעת עוצמת האור על השינויים ברמה ובהרכב של האנתוציאנינים והפלבונולים בפרחי ליזיאנתוס, על ביטוי הגנים המעורבים בביוסניתזה של אנתוציאנינים, על רמת הפיגמנטציה בפרחים מנותקים (ללא עלים) ובפרחים קטופים עם עלים והשפעת תוספת סוכר באגרטה במערכות אלה. **מטרות המחקר בשנה ג': 1** בירור האיברים (עלים או עלי כותרת) הקולטים את סיגנל האור והשפעת אופן הקליטה על הגנים של ביוסניתזה האנתוציאנינים; **2** בחינת השפעות האור, בגומלין עם נוכחות עלים וסוכר בתמיסה, על ביטוי הגנים של מסלול הביוסניתזה של האנתוציאנינים בעלי כותרת.

2) עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הד"ח:

בוצעו ניסויים בשלוש מערכות של פרחי ליזיאנתוס: צמחי עציץ, פרחים קטופים (ענף קטוף) ופרחים מנותקים עם וללא עלים. נבדקה תכולת האנתוציאנינים בעלי כותרת בשלבים שונים של התפתחות הפרח, בתנאי הארה שונים (בית-רשת או פיטוטרון בהשוואה לחדר התצפית), בפרחים עם וללא עלים וכן עם וללא נוכחות של סוכרוז בתמיסת האגרטה. נלקחו דגימות למיצוי RNA מעלי הכותרת, ונבדק הביטוי באנליזת Northern או semi-quantitative RT-PCR, של מספר גנים המקודדים לאנזימי מפתח במסלול הביוסניתזה של האנתוציאנינים בשלבי התפתחות שונים של הפרח. כן בוצעה אנליזת HPLC של אנתוציאנינים ופלבונולים. **תוצאות עיקריות:** צבע עלי הכותרת של זני הליזיאנתוס שנבחנו, הן בפרחים על הצמח והן בפרחים קטופים, אכן מושפע מעוצמת האור. צבע

הפקעים המתפתחים ונפתחים באגרטל באור נמוך היה חיוור ורחוק מאוד מהצבע האופייני בפרחים הנפתחים בחלקת הגידול או בתנאי תאורה טבעיים בחוץ. התקבלה שונות מסויימת במידת ההשפעה של תאורה נמוכה על ביטוי חלק מהגנים בניסויים שונים בשתי מערכות הבדיקה. ניסויים עם פרחים מנותקים הראו שקליטת סיגנל האור הגבוה מתרחשת גם בעלים וגם ישירות בעלי הכותרת. בנוסף, נצפתה השפעת גומלין בין האור לסוכר בהגברת הצבע, כיוון שהוספתו לתמיסת האגרטל הגבירה את התפתחות הצבע גם בפרחים (עם וללא עלים) שהתפתחו באור גבוה. למרות זאת, נמצא שהסוכרוז בתמיסה הפחית את רמת ביטוי הגנים.

3) המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו:

התוצאות שהתקבלו עד כה תומכות בהשערת המחקר לגבי בקרת התפתחות הצבע ע"י עוצמת ההארה במהלך התפתחות הפרח. התוצאות מעידות על רמת ביטוי נמוכה של כל הגנים במסלול הביסנינתזה של אנתוציאנינים, ותומכות בקיומו של גורם בקרה מרכזי (פקטור שעתוק) שמושפע משלב התפתחות הפרח ומעוצמת האור ומבקר את הביטוי של כלל הגנים במסלול או רק את חלקם. לצורך בירור אפשרות זו יש לנסות לזהות ולשבט את הגן המקודד לפקטור השיעתוק הנ"ל ולבחון את השפעת שלב ההתפתחות ועוצמת האור על ביטוי. השפעת הסוכרוז בהגברת עוצמת הצבע של עלי הכותרת של פרחי ליזיאנתוס אינה נובעת מהגברת הביסנינתזה של האנתוציאנינים, אלא נובעת כנראה מהשפעת הסוכרוז על תהליכים מטבוליים או על ייצובם של הפיגמנטים. נראה לכן שלסוכר, בניגוד לאור, אין תפקיד בקרתי כסיגנל במערכת זו.

4) הבעיות שנתרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים):

המחקר התנהל בהתאם לתכנית שהוצעה. נבחנו גם ההשפעות של שני גורמים נוספים, נוכחות עלים וסוכר בתמיסת האגרטל, בגומלין עם השפעת עוצמת האור. הכיוון שהסתמן להמשך המחקר קשור בזיהוי פקטור השיעתוק המעורב כנראה בבקרת הגנים של הביסנינתזה של האנתוציאנינים בעלי כותרת של ליזיאנתוס. הצלחה בזיהוי פקטור זה תוביל להגשה של תוכנית המשך בנושא.

5) האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הד"ח:

פורסם תקציר אחד בכנס בינלאומי ומאמר אחד באנגלית העומד להתפרסם בעיתון Acta Horticulturae. ניתנו שתי הרצאות בנושא המחקר בשני כנסים בינלאומיים, שהתקיימו באוגוסט 2008 בדנמרק ובאפריל 2009 בתורכיה.

6) פרסום הד"ח: אני ממליץ לפרסם את הד"ח: (סמן אחת מהאופציות)

רק בספריות

✓ ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)

חסוי – לא לפרסם