

דו"ח מסכם

לתכנית מחקר מספר 430-0109-08

בנושא:

**פיתוח טיפולים חדשים לעיכוב הכיפוף בפרחי קטיף בעלי תפרחות
מתארכות, המבוססים על המעורבות של תהליכי חמצון בתגובה
הגרביטרופית**

מוגש:

לקרן המדען הראשי - מו"פ מוצרים ליצוא - פרחים

מאת:

**סוניה פילוסוף-הדס, חיה פרידמן, שמעון מאיר, נטע בשן* ואידה רוזנברגר
Sonia Philosoph-Hadas, Haya Friedman, Shimon Meir, Neta Bashan* and Ida
Rosenberger**

***סטודנטית לדוקטורט**

**המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר הקטיף, מרכז וולקני, בית דגן
Dept. of Postharvest Science of Fresh Produce, ARO, The Volcani Center, Bet-
Dagan;**

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

**הנני מאשרת שהממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים.
חתימת החוקרת _____**

יוני 2009

מרכז וולקני, בית-דגן

א. תקציר

1. הצגת הבעיה (חשיבות ומטרות): המחקר הנוכחי בא לאפיין את מעורבותם של גורמי חמצון בכיפוף הגרביטרופי של גבעולי לוע-ארי, כדי לפתח טיפולים וכלים לעיכוב הכיפוף בפרחי קטיף, המבוססים על חומרים נוגדי או משרי חמצון או על גנים המעורבים בתהליך. איתור גנים כאלה יוכל לסייע בעתיד בבקרת הכיפוף בגבעולי פריחה באמצעים גנטיים. **מטרות המחקר לשנה ג': (1)** המשך בחינת ההתפלגות הדיפרנציאלית של גורמי חמצון שונים (פעילות האנזים NADPH-אוקסידאז במועדים קצרים, קסנטיין-אוקסידאז ו-SOD) במהלך כיפוף גרביטרופי של גבעולי לוע-ארי, והשפעת נוגדי החמצון על התפלגותם ועל זווית הכיפוף; **(2)** המשך בחינת ההשפעה של נוגדי חמצון על תנועת עמילופלסטים והתפלגות ייצור אתילן לרוחב הגבעול במהלך הכיפוף הגרביטרופי של גבעולי לוע-ארי; **(3)** בחינת היעילות של שני נוגדי החמצון בעיכוב הכיפוף הגרביטרופי של גבעולי לוע-ארי בהשפעת pH התמיסה; **(4)** בחינת המעורבות בתגובת הכיפוף של גנים הקשורים לתהליכי חמצון באמצעות בחינת תגובת הכיפוף של מוטנטים לגנים אלה בצמחי ארבידופסיס; **(5)** בחינת הקשר בין תהליכי החמצון וההתפלגות הדיפרנציאלית של האוקסין במהלך הכיפוף באמצעות שימוש בצמחי עגבנייה טרנסגניים.

2. מהלך ושיטות עבודה: הניסויים בוצעו בגבעולים של 3 מערכות צמחיות שהוצבו במאוזן למשך 24 שעות - פרחי לוע-ארי, מוטנטים של צמחי ארבידופסיס וצמחי עגבנייה טרנסגניים. המדדים נקבעו במקטעים חצויים לצד עליון ותחתון של אזור הכיפוף של הגבעול. נבחנה ההשפעה של שני נוגדי חמצון (GSH, NAC) על זווית הכיפוף, על פעילות האנזימים NADPH-אוקסידאז, קסנטיין-אוקסידאז ו-SOD, על רמת מי חמצן ו-ROS, על תנועת עמילופלסטים בכתכי גבעול, קצב ייצור אתילן ורמת אוקסין בשני צידי הגבעול. רמת האוקסין נבחנה ע"י מעקב אחר התבטאות הגן המדווח GUS תחת בקרה של הפרומוטור של הגן *Aux/IAA4* בצמחי עגבנייה טרנסגניים.

3. תוצאות עיקריות: אותרו שני חומרים מעכבי חמצון, GSH ו-NAC, שעכבו את הכיפוף הגרביטרופי של גבעולי לוע ארי ללא פגיעה בחיוניות הפרחים. נמצאה התפלגות דיפרנציאלית ברמת הפעילות של האנזימים NADPH-אוקסידאז וקסנטיין-אוקסידאז בגבעול הנתון לגירוי גרביטרופי לטובת הצד התחתון של הגבעול במקביל להופעת זווית כיפוף, והתפלגות זו בוטלה או התהפכה לטובת הצד העליון ע"י שני נוגדי החמצון, GSH ו-NAC לאחר 24 שעות של גירוי. לא נמצאה התפלגות דיפרנציאלית של האנזים SOD במהלך הגירוי. שני נוגדי החמצון עיכבו את פעילות שני האנזימים יוצרי הראדיקלים החופשיים והגבירו את פעולת האנזים האנטי-חמצוני SOD. תבנית ההתפלגות האסימטרית של מי חמצן במהלך הגירוי הגרביטרופי ושל ROS תאמה את תבנית ההתפלגות של פעילות האנזים NADPH-אוקסידאז, הן בגבעולי הביקורת והן בהשפעת שני נוגדי החמצון שביטלו את ההתפלגות האסימטרית. יחד עם זאת, שני נוגדי החמצון לא הורידו את רמת מי החמצן או ROS ברקמה, וטיפול ב-GSH אף העלה בצורה משמעותית את רמת ROS. שני נוגדי החמצון מנעו את שקיעת העמילופלסטים כבר לאחר שעה של גירוי גרביטרופי, וביטלו את ההתפלגות האסימטרית של ייצור האתילן לאחר 24 שעות של גירוי גרביטרופי. ה-pH של תמיסות ההטענה השפיע על היעילות של נוגדי החמצון בעיכוב הכיפוף ועל הימצאותם במצב פעיל במהלך ההצבה במאוזן, כאשר GSH היה יעיל ביותר ב-pH החומציים (2, 3), בעוד ש-NAC היה יעיל יותר בטווחי pH רחבים יותר, חומצי וביסי. ההתפלגות האסימטרית של האוקסין בגבעולי עגבנייה לטובת הצד התחתון של אזור הכיפוף של הגבעול הקדימה את היווצרות זווית הכיפוף. נוגד החמצון NAC עיכב את זווית הכיפוף באמצעות ביטול גרדיינט האוקסין לרוחב הגבעול והפחתת ריכוזו.

4. מסקנות והמלצות: נוגדי החמצון מעכבים את זווית הכיפוף באמצעות שינויים בגורמים שונים המעורבים בתחילתו (שקיעת עמילופלסטים), בהמשכו (התפלגות רמות אוקסין) ובסופו (התפלגות רמות אתילן) של מסלול העברת הגירוי של התגובה הגרביטרופית. תוצאות אלה, והתוצאות של ההתפלגות האסימטרית של גורמי חמצון שונים במהלך הכיפוף ושל ביטול התפלגות זו באמצעות נוגדי חמצון, מצביעות על מעורבות של תהליכי חמצון

בשלבם השונים של תהליך הכיפוף הגרביטרופי. מעורבות זו הוראתה ב- 3 המערכות הצמחיות שנבחנו, פרחי לווע-ארי, צמחי ארבידופסיס וצמחי עגבנייה, דבר המצביע על כלליות התופעה. ההשפעה של נוגדי החמצון בעיכוב זווית הכיפוף מתווכת ע"י שלושה אנזימי חמצון המעורבים בתהליכי החמצון ברקמה. נוגדי החמצון עיכבו את תהליך הכיפוף באמצעות עיכוב שני אנזימים מזרזי יצירת ראדיקלים חופשיים (NADPH-אוקסידאז, קסנטין-אוקסידאז) וזירזו אנזים אנטי-חמצוני (SOD). כתוצאה מכך נמנע תהליך התרופפות הדופן הדרוש נוכחות של ראדיקלים חופשיים ופחתה רמת האוקסין ברקמת האנדודרמיס, הדרוש לתהליך הכיפוף. המחקר קידם את ההבנה של מעורבות תהליכי חמצון בהשראת תהליכי כיפוף, ועל בסיס המידע שפותח ניתן יהיה להשתמש בחומרים נוגדי החמצון שנמצאו כאמצעים לשיפור האיכות של פרחי קטיף חשופים הסובלים מבעיית הכיפוף.

רשימת קיצורים:

GSH = Reduced glutathione; **GUS** = β -glucuronidase; **NAC** = N-acetyl-cysteine; **NADPH-oxidase** = Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase; **SOD** = superoxide dismutase; **ROS** = reactive oxygen species.

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

משלוח במאוזן של פרחים בעלי גבעול פריחה (סייפן, לווע ארי, תורמוס) או עוקץ פרח (כלנית) הממשיכים להתארך לאחר הקטיף גורם לכיפוף גרביטרופי שלילי של הגבעול או העוקץ כלפי מעלה בניגוד לכוח הכבידה, דבר הפוגם באיכות התוצרת. כיפוף לא רצוי זה נובע כתוצאה מהצבת הפרחים במאוזן לפחות באחד משלבי הטיפול בפרח הקטוף (מיון, אריזה משלוח לבורסה, הפצה לקמעונאים ותצוגה בשווקים). קבוצת הפרחים הסובלת מבעיה זו, הכוללת כלניות, דוביום, נוריות, קאלה, דלפיניום, לווע-ארי, ארמורוס, אליום ותורמוס, הגיעה בשנת 2006 להיקף יצוא מהארץ של יותר מ- 70 מיליון גבעולים, בפדיון כולל של כ- 9 מיליון יורו.

ב- 11 השנים האחרונות בוצע במעבדתנו מחקר אינטנסיבי להבנת תופעת הכיפוף בגבעולי פרחים, ובחנו במסגרת זו גם טיפולים כימיים שונים לעיכוב התהליך בעיקר בפרחי קטיף של לווע ארי ששימש כפרח מודל. תהליך הכיפוף הגרביטרופי נגרם כתוצאה מהתארכות דיפרנציאלית בין שני צידי האיבר המתכופף, כאשר הצד התחתון של הגבעול מתארך בעוד שהצד העליון מתכווץ, לפחות בתחילתו של הכיפוף. ממצאינו מראים שניתן לעכב את הכיפוף באמצעות טיפולים כימיים המעכבים את התהליך עוד בשלב הראשוני של קליטת הגירוי. תהליך ההתארכות של רקמה הוא תוצאה של איזון בין התרופפות דופן התא לבין התקשחותה. תגובת הכיפוף הגרביטרופי של גבעולים מראה שהתארכות התאים יכולה להיות מהירה, מקומית והפיכה במהלך תנועת הכיפוף וההתיישרות העוקבת, באמצעות מנגנונים שונים. בשני תהליכים מנוגדים אלה של התרופפות והתקשחות הדופן מעורבים בנוסף להורמוני צמיחה גם תהליכי חמצון שונים, שלימוד שלהם עשוי לשמש כבסיס לפיתוח טיפולים כימיים לעיכוב התהליך.

בשנים האחרונות נחקר נושא המעורבות של תהליכי חמצון בתגובת הכיפוף הגרביטרופי של איברים שונים. עבודות עדכניות שבוצעו בשורשים ובצמחונים מצביעות על כך שפעילות האוקסין, שהוא ההורמון המרכזי המעורב בתהליך הכיפוף ומשפיע על התארכות התאים, מתווכת גם ע"י תרכובות חמצן פעיל (ROS). נמצא שאוקסין מזרז שחרור ROS (ראדיקלים של סופראוקסיד והידרוקסיל) במהלך השראת התארכות תאים. לאחרונה נמצא, שתהליך התרופפות הדופן מושרה ע"י ROS, בעוד שזה מכבר היה ידוע שתהליך התקשחות הדופן נגרם ע"י קישור של פולימרים פוליפנולים בתיווך של פראוקסידאזות ובנוכחות H_2O_2 המהווה את המרכיב העיקרי והיציב ביותר ב- ROS. מאחר ו- ROS פעילים בתפקיד כפול ומנוגד הן של הקשחת הדופן ע"י פולימריזציה והן של התרופפות הדופן והגברת ההתארכות, נראה שהן עיכוב תהליכי חמצון והן הגברתם עשויים לבטל את

ההתפלגות הדיפרנציאלית של גורמי חמצון בגבעול מאוזן וע"י כך לעכב את כיפופו הגרביטורפי. בנוסף, הצטברו עדויות לגבי מעורבות ROS בתהליכי התארכות הקשורים לכיפוף בהם מעורב האנזים החמצוני NADPH-אוקסידאז, שהוא אנזים מפתח ממברנלי הפעיל ביצירת ROS ע"י יצירת סופראוקסיד שהופך מיד ל- $H_2O_2 + O_2$. דיווחים בספרות הראו שאנזים זה, שבודד מממברנה ציטופלסמטית של נבטי שעועית, זורז ע"י אוקסין, וכן היה מעורב בגדילת תאים ובתגובה לשינויים בווקטור כוח הכובד במערכת זו.

המטרה הכללית של תכנית המחקר הנוכחית הייתה לאפיין את מעורבותם של גורמי חמצון בכיפוף הגרביטורפי של גבעולי לוע ארי, כדי לפתח טיפולים וכלים לעיכוב הכיפוף המבוססים על חומרים נוגדי או משרי חמצון או על גנים המעורבים בתהליך.

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

מטרות המחקר לשנה א': (1) בחינת יעילותם של חומרים נוגדי או מגבירי חמצון בעיכוב הכיפוף של גבעולי לוע-ארי; (2) בחינת ההתפלגות הדיפרנציאלית של ROS ושל פעילות האנזים NADPH-אוקסידאז והקשר ביניהם במהלך כיפוף גרביטורפי של גבעולי לוע-ארי; (3) פיתוח כלים מולקולאריים למעקב אחר שינויים אפשריים ברמות אוקסין במהלך הכיפוף הגרביטורפי ובנוכחות חומרים מגבירי או מעכבי חמצון שישפיעו על התהליך.

מטרות המחקר לשנה ב': (1) בחינת היעילות של החומרים נוגדי חמצון שאותרו בשנה א', בעיכוב הכיפוף של זנים שונים של לוע-ארי; (2) המשך בחינת ההתפלגות הדיפרנציאלית של גורמי חמצון שונים (פעילות האנזים NADPH-אוקסידאז, ריכוז מי חמצן ו- ROS כללי) במהלך כיפוף גרביטורפי של גבעולי לוע-ארי, והשפעת נוגדי החמצון על התפלגותם ועל זווית הכיפוף; (3) בחינת ההשפעה של נוגדי חמצון על תנועת עמילופלסטים ועל התפלגות ייצור אתילן לרוחב הגבעול במהלך הכיפוף הגרביטורפי של גבעולי לוע-ארי; (4) המשך פיתוח כלים מולקולאריים בצמחי עגבנייה טרנסגניים לצורך מעקב אחר שינויים ברמות אוקסין במהלך הכיפוף הגרביטורפי בהעדר ובנוכחות של נוגדי חמצון.

מטרות המחקר לשנה ג': (1) המשך בחינת ההתפלגות הדיפרנציאלית של גורמי חמצון שונים (פעילות האנזים NADPH-אוקסידאז במועדי כיפוף קצרים, האנזים קסנטין-אוקסידאז והאנזים SOD) במהלך כיפוף גרביטורפי של גבעולי לוע-ארי, והשפעת נוגדי החמצון על התפלגותם ועל זווית הכיפוף; (2) המשך בחינת ההשפעה של נוגדי חמצון על גורמים מרכזיים במסלול העברת הגירוי הגרביטורפי (תנועת עמילופלסטים והתפלגות ייצור אתילן לרוחב הגבעול) במהלך הכיפוף הגרביטורפי של גבעולי לוע-ארי; (3) בחינת היעילות של שני נוגדי החמצון, NAC ו- GSH, בעיכוב הכיפוף הגרביטורפי של גבעולי לוע-ארי בהשפעת pH התמיסה; (4) בחינת המעורבות בתגובת הכיפוף של גנים הקשורים לתהליכי חמצון באמצעות בחינת תגובת הכיפוף של מוטנטים לגנים אלה בצמחי ארבידופסיס; (5) בחינת הקשר בין תהליכי החמצון וההתפלגות הדיפרנציאלית של האוקסין במהלך הכיפוף הגרביטורפי באמצעות שימוש בצמחי עגבנייה טרנסגניים.

בדו"ח מסכם זה הובאו עיקרי הממצאים מהשנתיים הראשונות למחקר (פירוט התוצאות הובא בדוחות של שנים א' וב'), ופורטו רק תוצאות הניסויים שבוצעו בשנה השלישית למחקר. פירוט האיורים והתמונות משנת המחקר השלישית מובא בעמ' 13-18.

ג. פירוט הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו

1.1. סיכום התוצאות משנה א':

בשנה הראשונה למחקר נבחנה היעילות של חומרים נוגדי או מגבירי חמצון בעיכוב הכיפוף של גבעולי לוע-ארי מזן 'Early Potomac' לבן. אותרו שני נוגדי חמצון מבוטחים, NAC ו- GSH, שעכבו ביעילות את הכיפוף הגרביטורפי לאחר הצבת הגבעולים במאוזן ללא פגיעה בחיוניות הפרחים, וחומר אחד מעודד חמצון, דורמקס,

שעיכב את הכיפוף אך גרם לנזק. בשנה א' פיתחנו והתאמנו את השיטות למדידת גורמי חמצון שונים בגבעולי לוע-ארי, כאשר התמקדנו בריאקציה הפעילות של האנזים NADPH-אוקסידאז ובריוזי H_2O_2 ברקמה. בעזרת השיטות שפותחו נבחנו ההתפלגות הדיפרנציאלית של שני גורמי החמצון הנ"ל לרוחב הגבעול בהשפעת מתן גירוי גרביטרופי לזמנים קצרים (3-4 שעות). הממצאים מראים שלאנזים NADPH-אוקסידאז הייתה התפלגות דיפרנציאלית מסוימת ברמת הפעילות בגבעול הנתון לגירוי גרביטרופי. נמצאה פעילות אנזים גבוהה יותר בצד התחתון של הגבעול רק לאחר 4 שעות של גירוי גרביטרופי, עם התחלת הכיפוף החזותי של הגבעול כלפי מעלה. תבנית התפלגות זו לא לוותה בהתפלגות אסימטרית של מי חמצן במהלך 3-4 השעות הראשונות של הגירוי הגרביטרופי. לכן ייבדקו בהמשך המחקר השינויים בשני מדדים אלה גם בפרקי זמן של גירוי גרביטרופי ארוכים יותר מ- 4 שעות. התוצאות מצביעות על מעורבות של תהליכי חמצון בתהליך הכיפוף הגרביטרופי. בהמשך המחקר נבחן האם תהליכי החמצון קשורים להתפלגות הדיפרנציאלית של שני ההורמונים המעורבים בתהליך, אוקסין ואתילן. לצורך זה התחלנו גם בפיתוח כלים מולקולאריים (במערכת של צמחי עגבנייה טרנסגניים) לקביעה מהירה של שינויים ברמת האוקסין במהלך הכיפוף בהשפעת חומרים נוגדי חמצון.

2.2. סיכות התוצאות משנה ב':

בשנה המחקר השנייה נמצאה התפלגות דיפרנציאלית ברמת הפעילות של האנזים NADPH-אוקסידאז בגבעול הנתון לגירוי גרביטרופי לטובת הצד התחתון של הגבעול החל מ- 5 שעות של גירוי גרביטרופי, במקביל להופעת זווית כיפוף, והתפלגות זו בוטלה ע"י שני נוגדי החמצון, NAC ו-GSH לאחר 24 שעות של גירוי. תבנית ההתפלגות האסימטרית של מי חמצן במהלך הגירוי הגרביטרופי ושל ROS תאמה את תבנית ההתפלגות של פעילות האנזים NADPH-אוקסידאז, הן בגבעולי הביקורת והן בהשפעת שני נוגדי החמצון שביטלו את ההתפלגות האסימטרית. יחד עם זאת, שני נוגדי החמצון לא הורידו את רמת מי החמצן או ROS ברקמה, וטיפול ב-GSH אף העלה בצורה משמעותית את רמת ROS. שני נוגדי החמצון מנעו את שקיעת העמילופלסטים כבר לאחר שעה של גירוי גרביטרופי, וביטלו את ההתפלגות האסימטרית של ייצור האתילן לאחר 24 שעות של גירוי גרביטרופי. בנוסף המשכנו בפיתוח הכלים המולקולאריים בצמחי עגבנייה טרנסגניים שהותמרו עם גן סמן לרמת אוקסין, כדי לבחון בהמשך האם תהליכי החמצון קשורים גם להתפלגות הדיפרנציאלית של האוקסין, שהוא ההורמון המרכזי המעורב בתהליך הכיפוף.

התוצאות שהתקבלו מראות שנוגדי החמצון מעכבים את זווית הכיפוף באמצעות שינויים בגורמים שונים המעורבים בתחילתו (שקיעת עמילופלסטים) ובסופו (התפלגות רמות אתילן) של מסלול העברת הגירוי של התגובה הגרביטרופית. תוצאות אלה, והתוצאות של ההתפלגות האסימטרית של גורמי חמצון שונים במהלך הכיפוף ושל ביטול התפלגות זו באמצעות נוגדי חמצון, מצביעות על מעורבות של תהליכי חמצון בשלבים השונים של תהליך הכיפוף הגרביטרופי. מאחר ורמות ROS ברקמה נקבעות כתוצאה משרשרת של ריאקציות היוצרות ומפרקות את הסוגים השונים של הרדיקלים החופשיים (בעזרת אנזימים אנטי-חמצוניים כמו SOD, קטלאז, גלוטטיון רדוקטאז, אסקורבט פראוקסידאז או פראוקסידאזות שונות), תיבחן בהמשך השפעת נוגדי חמצון גם על גורמים נוספים המעורבים בתהליכי חמצון, כדי להבין את מנגנון הפעולה.

3.3. פירוט התוצאות משנה ג':

1.3.1. המשך בחינת ההתפלגות הדיפרנציאלית של גורמי חמצון שונים במהלך כיפוף גרביטרופי

של גבעולי לוע-ארי, והשפעת שני נוגדי החמצון על התפלגותם ועל זווית הכיפוף

בשנה השנייה למחקר נבחנו התפלגות הפעילות או הרמה הדיפרנציאלית של 3 גורמי חמצון שונים בגבעולי לוע-ארי במהלך הכיפוף הגרביטרופי: פעילות האנזים NADPH-אוקסידאז, רמת מי חמצן ורמת ROS

שנבחנו לאחר 1, 5 או 24 שעות של הצבה במאוזן. מאחר ושני נוגדי החמצון לא הורידו את רמת מי החמצן או ה-ROS ברקמה כפי שציפינו, המשכנו לבחון בשנה ג' גורמים נוספים המעורבים בתהליכי החמצון ואשר עשויים להשפיע על רמות ROS ברקמה, כמו האנזימים קסנטיין-אוקסידאז ו-SOD, וכן נבחנו פעילותו של האנזים NADPH-אוקסידאז ב-4 השעות הראשונות של הגירוי הגרביטורפי, עוד לפני הופעת תגובת הכיפוף החזותית.

ג.1.3.1. פעילות האנזים NADPH-אוקסידאז במועדי גירוי קצרים

האנזים NADPH-אוקסידאז הוא אנזים ממברנלי הפעיל ביצירת ROS ע"י יצירת סופראוקסיד שהופך ל- $H_2O_2 + O_2$. בשנה השנייה למחקר כוילה ריאקצית האנזים NADPH-אוקסידאז בגבעולי לוע-ארי ונבחנו פעילותו במהלך הכיפוף הגרביטורפי (לאחר 1, 5, או 24 שעות) בהשפעת שני נוגדי החמצון שעיקבו את תגובת הכיפוף. התוצאות הראו שההתפלגות הדיפרנציאלית של פעילות האנזים לטובת הצד התחתון של הגבעול התרחשה רק לאחר 5 שעות של הצבה במאוזן, במקביל להופעת זווית כיפוף. טיפול הטענה בנוגד החמצון NAC שעיקב את זווית הכיפוף, גרם ליצירת גרדיינט פעילות של האנזים לטובת הצד העליון של הגבעול לאחר 5 שעות של הצבה במאוזן, ורק מאוחר יותר ביטל את הגרדיינט. כדי לבחון האם הגרדיינט בפעילות האנזים NADPH-אוקסידאז מקדים את הופעת זווית הכיפוף, בחנו בשנת המחקר השלישית את ההתפלגות הדיפרנציאלית של פעילות האנזים לרוחב אזור הכיפוף של הגבעול במרווחי זמן של חצי שעה במשך 4 השעות הראשונות של ההצבה במאוזן, עוד לפני הופעת זווית הכיפוף החזותית.

מהתוצאות המוצגות באיור A1 ניתן לראות שכמעט ולא נצפתה התפלגות משמעותית בפעילות האנזים בין צד עליון ותחתון של הגבעול המאוזן במשך 4 השעות הראשונות לגירוי הגרביטורפי, כאשר רק לאחר 3.5-4 שעות הסתמנה מגמה של היווצרות גרדיינט פעילות לטובת הצד התחתון של הגבעול. טיפול הטענה בנוגד החמצון NAC העלה את פעילות האנזים ב-4 השעות הראשונות להצבה במאוזן בשני צידי הגבעול בהשוואה לגבעולי הביקורת ולא השפיע כמעט על ההתפלגות הדיפרנציאלית בפעילות האנזים משני צידי הגבעול (איור B1). יחד עם זאת נראה בבירור, שהחל מהשעה השלישית לגירוי הגרביטורפי, הטיפול ב-NAC גורם להיווצרות של גרדיינט פעילות של האנזים לטובת הצד העליון של הגבעול (איור B1). תוצאות אלה מחזקות את התוצאות שהתקבלו בשנת המחקר השנייה, ומצביעות על כך שטיפול ב-NAC משנה את גרדיינט הפעילות של האנזים NADPH-אוקסידאז לטובת הצד העליון של הגבעול כבר החל מהשעה השלישית לגירוי הגרביטורפי, עוד לפני הופעת זווית הכיפוף החזותית בגבעולי הביקורת, ורק במועד מאוחר יותר NAC גורם לביטול הגרדיינט.

ג.2.1.3.2. פעילות האנזים קסנטיין-אוקסידאז

האנזים קסנטיין-אוקסידאז הוא אנזים מחמצן המזרז את החמצון של hypoxanthine ל-xanthine ואת החמצון של xanthine ל-uric acid. תוך כדי הריאקציה הוא מייצר ראדיקלים של סופר אוקסיד בכמות גדולה, דבר שמעלה את ריכוז ה-ROS ברקמה וגורם לנזק חמצוני. פעילות אנזים זה מלווה בעלייה בראדיקלים חופשיים ברקמה והוא מעוכב על ידי האנזים האנטי-חמצוני, SOD. לכן בחנו את פעילות האנזים קסנטיין-אוקסידאז במהלך כיפוף גרביטורפי של גבעולי לוע ארי כמדד לפעילות חמצונית ברקמה. פעילות האנזים נבחנו במקטעי אזור הכיפוף של הגבעולים שנלקחו במועדים שונים לאחר הצבתם במאוזן, בעזרת קיט של סיגמא בשיטה קולורימטרית באורך גל של 450 ננומטר.

מהתוצאות המוצגות באיור A2 נראה שלאחר השעה הראשונה של הצבה במאוזן התקבל גרדיינט פעילות לטובת הצד התחתון של הגבעול, שנעלם לאחר 6 שעות גירוי, והתהפך בכיוונו לטובת הצד העליון של הגבעול לאחר 24 שעות. טיפול בנוגדי החמצון NAC (איור B2) ו-GSH (איור C2) הוריד בצורה משמעותית את פעילות האנזים בהשוואה לגבעולי הביקורת, ועיקב את זווית הכיפוף. בנוסף, נמצאו הבדלים בפעילות האנזים בין שני צידי הגבעול לטובת החלק העליון לאחר טיפול ב-NAC ו-24 שעות של הצבה במאוזן (איור B2) ולאחר טיפול ב-

GSH ושעה של הצבה במאוזן (איור C2), כאשר בשאר מועדי הבדיקה שני נוגדי החמצון ביטלו את גרדיינט הפעילות של האנזים. התוצאות שהתקבלו מחזקות תוצאות קודמות המראות שנוגדי החמצון מעכבים תהליכי חמצון הגורמים ליצירה מוגברת של ROS במקביל לעיכוב בזווית הכיפוף. בדומה להשפעה על התפלגות הפעילות האנזימטית של NADPH-אוקסידאז, גם לגבי האנזים קסנטיין-אוקסידאז הטיפול בנוגדי החמצון שינה את גרדיינט הפעילות בתחילת הגירוי לטובת הצד העליון של הגבעול, ורק בהמשך הטיפול גרם לביטול הגרדיינט (פרט לגבעולים שטופלו ב-NAC והוצבו במאוזן ל-24 שעות באיור B2).

ג.3.1.3. פעילות האנזים SOD

האנזים SOD - Super oxide dismutase הוא אחד מהאנזימים האנטי-חמצוניים החשובים ביותר. האנזים מזרז את הריאקציה בה יון הסופר אוקסיד הופך למי חמצן ולחמצן, ובתור שכזה הוא מהווה נוגד חמצון חשוב מאד במערכת האנטי-חמצונית האנדוגנית בצמח. פעילות האנזים נבחנה במקטעי אזור הכיפוף של הגבעולים שנלקחו במועדים שונים לאחר הצבתם במאוזן, בעזרת קיט של סיגמא בשיטה קולורימטרית באורך גל של 450 ננומטר.

מהתוצאות המוצגות באיור A3 נראה שלא הובחנה התפלגות אסימטרית של האנזים לרוחב הגבעול במהלך הגירוי הגרביטרופי, כך שהגדלת זווית הכיפוף במהלך ההצבה במאוזן לא התבטאה ביצירת גרדיינט פעילות של האנזים SOD לרוחב הגבעול. טיפול בנוגדי החמצון NAC (איור B3) ו-GSH (איור C3) העלה משמעותית את פעילות האנזים בהשוואה לביקורת ועיכב את זווית הכיפוף, אך לא גרם לשינוי משמעותי בהתפלגות הדיפרנציאלית של פעילות האנזים לרוחב הגבעול. בבדיקה של פעילות האנזים במרווחי זמן של חצי שעה במשך 4 השעות הראשונות של הגירוי הגרביטרופי, נמצאו הבדלי פעילות לטובת הצד העליון של גבעולי הביקורת לאחר 3.5-2 שעות של גירוי גרביטרופי (איור A4), שבוטלו בהשפעת הטיפול ב-NAC (איור B4). רק בנקודת הזמן של 2.5 שעות גירוי גרביטרופי הטיפול ב-NAC גרם ליצירת גרדיינט פעילות לטובת הצד התחתון של הגבעול (איור B4). מבחינה של השתנות גורמי חמצון שונים במהלך הכיפוף הגרביטרופי נראה שבמועדים הקצרים של הגירוי הגרביטרופי יש תנודות בהתפלגות הפעילות האנזימטית בין צד עליון לצד תחתון של הגבעול, עד שהמצב מתקבע על גרדיינט פעילות לטובת הצד התחתון של הגבעול. רק לגבי האנזים האנטי-חמצוני SOD לא התקבל גרדיינט פעילות במהלך הכיפוף. למרות ששני נוגדי החמצון עכבו את זווית הכיפוף במהלך הגירוי, לא תמיד הדבר התבטא בביטול גרדיינט הפעילות האנזימטית לרוחב הגבעול. יחד עם זאת נראה בבירור שנוגדי החמצון עכבו את הפעילות של האנזימים יוצרי הרדיקלים החופשיים, כמו NADPH-אוקסידאז וקסנטיין-אוקסידאז, והגבירו את הפעילות של האנזים האנטי-חמצוני SOD. תוצאות אלה מצביעות על כך שההשפעה של נוגדי החמצון בעיכוב זווית הכיפוף אינה ישירה אלא מתווכת ע"י שלושת אנזימי חמצון אלה המעורבים בתהליכי החמצון ברקמה. כך, נוגדי החמצון תורמים לפעילות האנטי-חמצונית ברקמה באמצעות הגברת פעילות ה-SOD ועיכוב הפעילות של NADPH-אוקסידאז וקסנטיין-אוקסידאז. מאחר ופעילות האנזים קסנטיין-אוקסידאז מעוכבת ע"י האנזים האנטי-חמצוני SOD, ייתכן ונוגדי החמצון מעכבים את פעילות הקסנטיין-אוקסידאז גם בצורה לא ישירה, דרך הגברת פעילות ה-SOD.

2.3.2. המשך בחינת ההשפעה של שני נוגדי החמצון על גורמים מרכזיים במסלול העברת הגירוי

הגרביטרופי במהלך הכיפוף הגרביטרופי של גבעולי לוע ארי

ג.1.2.3. תנועת עמילופלסטים

כדי לבחון כיצד נוגדי החמצון מעכבים את הכיפוף הגרביטרופי בגבעולי לוע-ארי וכיצד תהליכי החמצון משפיעים על השתנות המדדים השונים המעורבים במסלול העברת הגירוי של התגובה הגרביטרופית, נבחנה

בשנה השנייה השפעת שני נוגדי החמצון, NAC ו-GSH, על מספר גורמים המאפיינים את התגובה הגרביטרופית, כמו שינוי במיקום העמילופלסטים באנדודרמיס, והתפלגות דיפרנציאלית של שני ההורמונים המעורבים בתהליך, אוקסין ואתילן. התוצאות שהתקבלו מהאנליזה המיקרוסקופית של תנועת העמילופלסטים מרמזת על מעורבותם של תהליכי חמצון כבר בשלבים הראשוניים ביותר של מסלול העברת הגירוי. כדי לאמת תוצאה חשובה זו ולתת תמונת מצב מדויקת יותר של מיקום העמילופלסטים בתאים לאחר הטיפולם בנוגדי החמצון, כימתנו את תבנית שקיעת העמילופלסטים בתאי האנדודרמיס (סטטוציטים) של איזור הכיפוף של הגבעול בעזרת תוכנת ImageJ. לצורך זה נלקחו מדגמים של 5 חתכים לכל טיפול וזמן הצבה במאוזן, כאשר מכל חתך נבדקו 25 תאים ונקבע % התאים במדגם בהם תבנית שקיעת העמילופלסטים הייתה על הדופן הקצרה של התא בכיוון מאונך (Transverse), על הדופן הארוכה של התא (Axial) או תאים בהם העמילופלסטים היו מפוזרים (Scattered) (איור C5).

מהתוצאות המוצגות באיור A5 נראה שבגבעולי ביקורת שהוצבו במאונך למשך שעה בכ- 70% מהסטטוציטים העמילופלסטים שקעו לכיוון הדופן הקצרה של התאים, ב- 5% מהסטטוציטים העמילופלסטים שקעו לכיוון הדופן הארוכה, וב- 25% מהתאים העמילופלסטים נותרו מפוזרים. מצב זה לא השתנה גם לאחר 5 שעות של הצבה במאונך (איור B5). לעומת זאת, כבר לאחר הצבה במאוזן לשעה אחת, תבנית שקיעה זו בגבעולי הביקורת התהפכה, וב- 80% מהסטטוציטים במדגם העמילופלסטים שקעו לכיוון הדופן הארוכה של התא ורק ב- 5% מהסטטוציטים העמילופלסטים שקעו לכיוון הדופן הקצרה, וב- 15% מהתאים העמילופלסטים נותרו מפוזרים. לאחר מתן גירוי גרביטרופי של 5 שעות, ב- 90% מהסטטוציטים של גבעולי הביקורת העמילופלסטים שקעו לכיוון הדופן הארוכה ורק ב- 5% מהתאים העמילופלסטים נותרו מפוזרים (איור B5).

הטענת הגבעולים בנוגדי החמצון שינתה את תבנית השקיעה הנ"ל של העמילופלסטים בסטטוציטים כבר לאחר שעה אחת של הצבה במאוזן (איור A5): טיפול ב-NAC גרם לכך שב- 60% מהסטטוציטים העמילופלסטים היו מפוזרים בתא, ורק כ- 20% מהסטטוציטים העמילופלסטים היו שקועים לכיוון הדופן הקצרה או הארוכה של התא. טיפול ב-GSH גרם לכך שב- 70% מהסטטוציטים העמילופלסטים היו מפוזרים בתא, ורק ב- 25% או 5% מהסטטוציטים העמילופלסטים היו שקועים לכיוון הדופן הקצרה או הארוכה של התא, בהתאמה. מגמה זו המשיכה גם לאחר 5 שעות של הצבה במאוזן, כאשר בהשפעת שני נוגדי החמצון ב- 60-65% מהסטטוציטים העמילופלסטים היו מפוזרים, וב- 30% או 10% מהתאים העמילופלסטים שקעו לכיוון הדופן הקצרה או הדופן הארוכה של התא, בהתאמה (איור B5). תוצאות כמותיות אלה מאמתות את התוצאות של האנליזה המיקרוסקופית שהתקבלו בשנה השנייה למחקר, ומרמזות שנוגדי החמצון גורמים כנראה לפיזור העמילופלסטים בתא ומונעים ע"י כך את שקיעתם על דפנות התא בהתאם לשינוי האוריינטציה של הגבעול. כתוצאה מכך נמנע שלב קליטת הגירוי של כוח הכבידה, וע"י כך נמנעת גם תגובת הכיפוף בהמשך הגירוי הגרביטרופי.

2.2.3.ג. התפלגות ייצור אתילן לרוחב הגבעול

בשנה השנייה למחקר נבחנה השפעת נוגד החמצון NAC על ייצור אתילן בגבעול ועל התפלגות ייצור אתילן בין צד עליון לצד תחתון של אזור הכיפוף של הגבעול לאחר גירוי גרביטרופי של 24 שעות. התוצאות הראו שהתפלגות האסימטרית של ייצור אתילן לטובת הצד התחתון של הגבעול שהתקבלה לאחר 24 שעות של גירוי גרביטרופי, בוטלה לאחר הטענה בנוגד החמצון NAC, שגם עיכב את זווית הכיפוף. בשנה השלישית בחנו את השפעת שני נוגדי החמצון, NAC ו-GSH על ההתפלגות האסימטרית של אתילן גם לאחר מועדים קצרים יותר של גירוי גרביטרופי. מהתוצאות המסוכמות באיור A6 נראה שבמועדי הגירוי הראשונים התפלגות רמת אתילן בין שני הצדדים של גבעולי הביקורת הייתה דומה (לאחר שעה או 7 שעות) או לטובת הצד העליון של הגבעול (לאחר 4 שעות), ורק לאחר 24 שעות ההתפלגות הייתה לטובת הצד התחתון של הגבעול.

הטענת הגבעולים בנוגד החמצון NAC הפחיתה במקצת את קצב ייצור אתילן בשני צידי הגבעול לאחר הצבה במאוזן למשך 4 או 7 שעות בהשוואה לגבעולי הביקורת, אך גרמה להגברת קצב ייצור אתילן לאחר 24

שעות של גירוי גרביטרופי, כך שנוצר גרדיינט לטובת הצד התחתון של הגבעול (איור B6). מגמה דומה התקבלה גם לאחר הטענת הגבעולים בנוגד החמצון GSH (איור C6). נראה לכן ששני נוגדי החמצון לא ביטלו את גרדיינט ייצור האתילן לרוחב הגבעול כפי שהתקבל מהתוצאות של השנה הקודמת, וייתכן והדבר נובע מהבדלים בין שני זני לוע הארי בהם השתמשנו. יחד עם זאת, התוצאות הנ"ל מחזקות את ממצאי השנה הקודמת לגבי הגברת קצב ייצור האתילן בהשפעת נוגד החמצון NAC, ולגבי מעורבות תהליכי חמצון בהתפלגות ייצור האתילן המהווה חלק ממסלול העברת הגירוי של התגובה הגרביטרופית.

ג.3.3. בחינת היעילות של שני נוגדי החמצון, NAC ו-GSH, בעיכוב הכיפוף הגרביטרופי של

גבעולי לוע ארי בהשפעת pH התמיסה

התוצאות שהתקבלו בשנים הקודמות הראו שלמרות ששני נוגדי החמצון עכבו בצורה משמעותית את זווית הכיפוף, הם לא גרמו כמצופה להפחתת הרמות של מי חמצן או ROS כללי ברקמה. לכן הועלתה ההשערה שיעילות נוגדי החמצון משתנה בהתאם ל-pH של תמיסת ההטענה. כדי לבחון השערות אלה בחנו תחילה את הרמה האנדוגנית של מי חמצן ו-ROS בגבעולים מאונכים לאורך זמן בהשפעת הטענה של שני נוגדי החמצון. נמצא, שרמת מי החמצן ברקמה לא השתנתה בצורה משמעותית במשך 24 שעות בהשפעת שני נוגדי החמצון, ואילו רמת ה-ROS ברקמה ירדה לחצי לאחר 24 שעות בנוכחות שני נוגדי החמצון (תוצאות לא מובאות). תוצאות אלה מרמזות שיעילות נוגדי החמצון ברקמה אינה משתנה עם הזמן, וייתכן והמאגר של מי החמצן ברקמה נותר קבוע לאורך זמן הודות לריאקציות החמצון המתרחשות ברקמה.

בכדי לבדוק האם ל-pH של תמיסת ההטענה יש השפעה על יעילות נוגדי החמצון בעיכוב זווית הכיפוף במהלך הגירוי הגרביטרופי, גבעולי לוע ארי מזן 'פוטומק אדום' הוטענו למשך 24 שעות בתמיסות של שני נוגדי החמצון או בתמיסת TOG-6 (ביקורת) שהוכנו בטווחי pH שבין 2-8. לאחר ההטענה, הפרחים הוצבו במאוזן ונמדדה השתנות זווית הכיפוף שלהם.

מהתוצאות המוצגות באיור A7 ניתן לראות שבגבעולים שהוטענו בתמיסת TOG-6 ב-pH = 2 התקבל עיכוב בזווית הכיפוף במשך 8 השעות הראשונות של הגירוי הגרביטרופי בהשוואה לשאר ה-pH בטווח 3-8, אך לאחר 24 שעות של גירוי גרביטרופי כל הגבעולים הגיעו לזווית של 90°. לעומת זאת, תמיסת NAC בכל טווחי ה-pH שנבחנו עיכבה את זווית הכיפוף בצורה מוחלטת בהשוואה לגבעולי הביקורת ב-8 השעות הראשונות של הגירוי הגרביטרופי, אך לאחר 24 שעות של גירוי גרביטרופי, כפי שהתקבלה שונות במידת הכיפוף, כאשר NAC ב-pH 3, 4, 7, 8 היה יעיל יותר בעיכוב הכיפוף בהשוואה לשאר ה-pH (איור B7). גם תמיסת GSH בכל טווחי ה-pH שנבחנו עיכבה את זווית הכיפוף בצורה ברורה בהשוואה לגבעולי הביקורת ב-8 השעות הראשונות של הגירוי הגרביטרופי, אך לאחר 24 שעות של גירוי, ל-GSH ב-pH 2, 3 הייתה השפעה מעכבת על זווית הכיפוף והעיכוב נשמר לכל משך ההצבה במאוזן של הגבעולים, בעוד ש-GSH בשאר טווחי ה-pH לא היה יעיל בעיכוב הכיפוף בהשוואה לביקורת (איור C7). מופע הגבעולים הישירים בתחילת הניסוי והגבעולים הישירים והמכופפים בסוף הניסוי מוצג באיורים E7, D7, בהתאמה. מתוצאות אלו מסתמן, שה-pH של תמיסת ההטענה משפיע על היעילות של נוגדי החמצון בעיכוב הכיפוף ועל הימצאותם במצב פעיל לאורך הזמן הממושך של ההצבה במאוזן. GSH היה יעיל ביותר ב-pH החומציים (2, 3), בעוד ש-NAC היה יעיל יותר בטווחי pH רחבים יותר, חומצי ובסיסי.

ג.4.3. בחינת המעורבות בתגובת הכיפוף של גנים הקשורים לתהליכי חמצון באמצעות בחינת

תגובת הכיפוף של מוטנטים לגנים אלה בצמחי ארבידופסיס

היבט נוסף של מעורבות תהליכי חמצון בתגובת הכיפוף נבחן באמצעות סריקת מוטנטים לגנים הקשורים

לתהליכי חמצון בצמחי ארבידופסיס מבחינת פנוטיפ הכיפוף שלהם. לשם כך הצמחים המוטנטים הודגרו במאוזן ונבחן קצב הכיפוף שלהם לאורך זמן. נבחנו שני מוטנטים בהם יש רמה מופחתת של אנטיאוקסידנט או של ROS: המוטנט *vtc* - הפגוע בייצור חומצה אסקורבית, המהווה את אחד האנטיאוקסידנטים החשובים בתא, והמוטנט *GASA Aa* - המבטא ביתר גן שכנראה מוריד את ריכוז ROS בדופן. זרעי המוטנטים וזרעי WT נזרעו וגודלו בחדר גידול, בטמפרטורה של 22 מ"צ ובמשטר תאורה של 18 שעות אור ו-6 שעות חושך. לאחר כ-6 שבועות כאשר הופיע עמוד התפרחת, הצמחים הוצבו במאוזן בחדר תצפית. זווית הכיפוף של הגבעולים נמדדה בעזרת מד זווית בכל שעה במהלך תקופת ההצבה במאוזן, המייצגת מתן גירוי גרביטרופי.

מהתוצאות המוצגות באיור A8 נראה שהן הצמחים של שני המוטנטים והן צמחי ה-WT הראו קצב כיפוף מהיר ודומה, והגיעו לזווית של 90° לאחר 5 שעות של מתן גירוי גרביטרופי. יחד עם זאת, לאחר שעה של הצבה במאוזן נצפו הבדלים בקצב השתנות זווית הכיפוף בין הצמחים, כאשר שני המוטנטים האיצו את קצב הכיפוף בהשוואה לגבעולי ה-WT. המוטנט *vtc* היה בעל קצב הכיפוף המהיר ביותר, ולאחריו המוטנט *GASA Aa*. בשעה השנייה לכיפוף, קצב הכיפוף של שני המוטנטים לא היה שונה משמעותית מזה של ה-WT, אך עדיין קצב הכיפוף של המוטנט *vtc* היה מהיר יותר מזה של המוטנט *GASA Aa*. בשאר מועדי הגירוי לא נצפו הבדלים בין הצמחים וכולם הגיעו לזווית של 90° לאחר 5 שעות גירוי (איור 8). תוצאות אלה מראות שהעדר האנטיאוקסידנט חומצה אסקורבית או רמה נמוכה של ROS בדופן גורמים להאצת תגובת הכיפוף של הגבעול בשעות הראשונות בלבד. תוצאות אלה מצביעות שוב על מעורבותם של תהליכי חמצון בתהליכים הראשונים של תגובת הכיפוף המתרחשים כבר לאחר שעה אחת של הצבה במאוזן, ומחזקות את הממצאים שהתקבלו לגבי השפעת נוגדי החמצון על תנועת העמילופלסטים בגבעולי לוע ארי המתרחשת בשעה הראשונה של הגירוי הגרביטרופי.

התוצאות שהתקבלו לגבי גבעולי ארבידופסיס של המוטנט *vtc* שונות מהתוצאות שהתקבלו בספרות לגבי שורשי ארבידופסיס של המוטנט *vtc2* הפגוע בייצור חומצה אסקורבית. שורשי מוטנט זה איבדו את תגובתם הגרביטרופית החיובית ולא הצליחו לחדור לאדמה במהלך הגידול. תגובה זו מעידה על חשיבות הבקרה החמצונית של התגובה הגרביטרופית המתווכת ע"י ROS ותלויה באוקסין. השונות שהתקבלה בתגובה בין שורש לגבעול של המוטנט הפגוע בייצור חומצה אסקורבית עשויה לנבוע מהרגישות השונה של שני איברים אלה לאוקסין, או מקיומם של גנים נוספים מאותה משפחה הקיימים בגבעול ואינם פעילים בשורש.

5.3.ג. בחינת הקשר בין תהליכי החמצון וההתפלגות הדיפרנציאלית של האוקסין במהלך הכיפוף

הגרביטרופי באמצעות שימוש בצמחי עגבנייה טרנסגניים

כדי למדוד בצורה מהירה את השינויים ברמת האוקסין, שהוא ההורמון המרכזי המעורב בתהליך הכיפוף ומשפיע על התארכות התאים, השתמשנו בצמחי עגבנייה טרנסגניים מזן 'מיקרוטום' שהותמרו בקונסטרוקט הכולל את הגן המדווח GUS תחת בקרה של הפרומוטור של הגן *Aux/IAA4* שמקורו בעגבנייה. חלבוני *Aux/IAA* ידועים כגורמי בקרה המתווכים בתגובות הצמח לאוקסין, ולכן מעקב אחר רמת ביטויים, הנמצאת במתאם חיובי עם רמת האוקסין ברקמה, תיתן לנו מידע לגבי שינויים ברמת האוקסין בהשפעת טיפולים שונים. בשנה ב' למחקר גידלנו את הצמחים הטרנסגניים בתנאים מבוקרים של חדר גידול במטרה לאסוף זרעים כדי להגיע למדגם מספיק גדול של צמחים לניסויים, וכן את צמחי זן הבר (WT) שאינם מותמרים, כדי לבחון את השפעת נוגדי החמצון שניתנו בריסוס או בהטענה על עיכוב הכיפוף לאחר הצבתם במאוזן.

1.5.3.ג. קינטיקת הכיפוף בצמחי עגבנייה מזן הבר והשפעת נוגדי חמצון על הכיפוף

מניסויים מקדימים שבוצעו בצמחי זן הבר של עגבניית 'מיקרוטום' נמצא שצמחים בני 6 שבועות (איור B9) הם המתאימים ביותר לביצוע ניסויי הכיפוף. כאשר נבחן אופן מתן נוגדי החמצון, בריסוס צמחים שלמים

(תוצאות לא מובאות) או בהטענה של גבעולים קטופים, נמצא שהטענה הייתה יותר יעילה ולכן בהמשך הניסויים החומרים יושמו בצורה זו.

איור A9 מציג את קצב הכיפוף של גבעולי עגבנייה של זן הבר, כאשר זווית הכיפוף החזותית מופיעה לראשונה רק לאחר 6 שעות של גירוי גרביטרופי. שני נוגדי החמצון שניתנו בהטענה עיכבו את קצב הכיפוף בצורה משמעותית, כאשר NAC היה יעיל יותר מ-GSH, ובנוכחותו הגבעולים הגיעו לזווית כיפוף של 10° בלבד לאחר 24 שעות של הצבה במאוזן. נראה לכן שתגובת הכיפוף והשפעת שני נוגדי החמצון על תגובה זו בצמחי עגבנייה דומים לתגובה שהתקבלה בגבעולי לו-ע-ארי. כך שגם בצמחי עגבנייה תהליכי החמצון מעורבים בתגובת הכיפוף הגרביטרופי.

2.5.3.2. קינטיקת התפלגות האוקסין לרוחב הגבעול במהלך הכיפוף הגרביטרופי של צמחי עגבנייה טרנסגניים

והשפעת נוגדי החמצון על התפלגות זו

כדי לעקוב אחר התפלגות רמת האוקסין בגבעולים במהלך הכיפוף הגרביטרופי בוצע מעקב אחר התבטאות הגן המדווח GUS תחת בקרה של הפרומוטור של הגן *Aux/IAA4* באזור הכיפוף של צמחי עגבנייה מותמרים במועדים שונים של הגירוי הגרביטרופי. בנוסף, בחנו את ההשפעה של נוגד החמצון NAC על התפלגות רמת האוקסין בגבעולים של צמחי עגבנייה מותמרים לאחר 24 שעות של כיפוף גרביטרופי.

צמחי העגבנייה המותמרים גודלו בחדר צמיחה מבוקר טמפרטורה. לאחר 6 שבועות הצמחים הועברו לחדר תצפית, והגבעולים הקטופים הוטענו ב- TOG-6 (ביקורת) או בנוגד החמצון NAC 20 mM למשך 24 שעות, ולאחר מכן הוצבו במאוזן למשך 24 שעות. במועדים שונים במהלך הגירוי הגרביטרופי נלקחו מקטעי גבעול, נצבעו בבופר ריאקציה והועברו לאינקובציה ב- 37 מ"צ למשך 24 שעות. לאחר מכן הצמחים הודגרו בתמיסת אתנול 80% עד להלבנת הרקמה כדי להבליט את צביעת ה-GUS הכחולה. הצמחים צולמו במצלמה דיגיטלית על גבי מסך אור, ומקטעי הגבעול לאחר הצביעה צולמו בבינוקולר.

מהתוצאות המוצגות באיור 10 ניתן לראות שהצבע הכחול המייצג צביעת GUS, המשמש כסמן לרמת האוקסין בצמחים אלה, הופיע בצמחי הביקורת רק לאחר 4.5 שעות של הצבה במאוזן, והראה התפלגות ברורה לטובת הצד התחתון של הגבעול (איורים H10, I10). תוצאה זו תואמת את קינטיקת הכיפוף שהתקבלה בזן הבר המראה על התחלת זווית כיפוף חזותית רק לאחר 6 שעות של הצבה במאוזן (איור A9). נראה לכן שההתפלגות האסימטרית של האוקסין ברקמה לטובת הצד התחתון של אזור הכיפוף של הגבעול מקדימה את הופעת זווית הכיפוף.

בהמשך הניסויים נבחנה השפעת הטענה של גבעולים מצמחים טרנסגניים בנוגד החמצון NAC על התפלגות רמת האוקסין לרוחב הגבעול לאחר 24 שעות של גירוי גרביטרופי, כדי להגיע לתגובת צביעה מקסימאלית. התוצאות המוצגות באיור A11 מראות שהמקטעים שנלקחו מגבעולי זן הבר נותרו חסרי צבע כמצופה, אך המקטעים שנלקחו מגבעולים של צמחי ביקורת מותמרים שהוצבו במאוזן ל- 24 שעות נצבעו בכחול במידה דומה משני צידי הגבעול (איור B11). לעומת זאת, לאחר גירוי גרביטרופי של 24 שעות, הצבע הכחול התרכז בעיקר בצד התחתון של הגבעול שהוצב במאוזן (איור C11), ממצא המאשר את ההתפלגות האסימטרית של אוקסין לרוחב הגבעול המאוזן. הטענת הגבעולים של צמחים מותמרים בנוגד החמצון NAC ביטלה לגמרי את הצביעה הדיפרנציאלית של האוקסין (איור D11), ממצא המעיד על העדר אוקסין ברקמה. יחד עם זאת, ניתן לראות במקטעים שבאיור D11 צביעה כחולה חלשה לאורך המקטע, המעידה שכנראה ההובלה הפולארית של אוקסין בשיפה לא נפגעה בהשפעת הטיפול. תוצאות אלה מרמזות שנוגד החמצון מעכב את זווית הכיפוף באמצעות ביטול גרדיינט האוקסין לרוחב הגבעול והפחתת ריכוז האוקסין באנדודרמיס. לא ברור באיזה מנגנון הדבר מתבצע, ויתכן ש-NAC מעכב את ההובלה של אוקסין לרוחב הגבעול הגורמת בסופו של דבר להתפלגות האסימטרית של אוקסין. בעבר דווח שתהליכי גדילה המתווכים ע"י אוקסין מעוכבים ע"י נוגדי חמצון, וייתכן

והדבר קשור ללכידת הראדיקלים החופשיים שנוכחותם נחוצה לתהליכי התרופפות הדופן. כידוע, גם תהליך הכיפוף הגרביטרופי הוא תהליך של גדילה דיפרנציאלית הקשור בהתרופפות הדופן, ולכן הוא יושפע מנוכחות נוגדי החמצון. לכן העדר ראדיקלים חופשיים ברקמה לאחר הטענתה בנוגדי חמצון גורם להפחתת רמת האוקסין ברקמה ולמניעת תהליך התרופפות הדופן, וע"י כך לעיכוב הכיפוף. לחילופין, מאחר וידוע שפעילות האוקסין בהתארכות תאים מתווכת גם ע"י ROS, כנראה באמצעות זירוז האנזים NADPH-אוקסידאז, ייתכן שנוגדי החמצון שהפחיתו את רמת האוקסין ברקמה, גרמו ע"י כך גם לעיכוב פעילות האנזים NADPH-אוקסידאז.

ד. דיון - מסקנות והשלכותיהן על המשך ביצוע המחקר

שנה א':

1. שני חומרים מעכבי חמצון היו יעילים בעיכוב הכיפוף הגרביטרופי של גבעולי לוע ארי ללא פגיעה בחיוניות הפרחים: NAC ו-GSH. גם החומר דורמקס הידוע כמעודד חמצון עיכב את הכיפוף, אך בריכוז גבוה הוא גרם נזק. יש להמשיך ולכיל הטיפולים השונים.
2. שני החומרים נוגדי החמצון שאותרו כמעכבי כיפוף עשויים לשמש בעתיד כבסיס לפיתוח תכשיר מסחרי לעיכוב התהליך בפרחי קטיף במהלך משלוח.
3. האנזים NADPH-אוקסידאז מראה התפלגות דיפרנציאלית ברמת הפעילות בגבעול הנתון לגירוי גרביטרופי. נמצאה פעילות אנזים גבוהה יותר בצד התחתון של הגבעול לאחר 3-4 שעות של גירוי גרביטרופי, עם התחלת הכיפוף החזותי של הגבעול כלפי מעלה.
4. תבנית ההתפלגות האסימטרית של H_2O_2 במהלך 3-4 השעות הראשונות של הגירוי הגרביטרופי לא תאמה את תבנית ההתפלגות של פעילות האנזים NADPH-אוקסידאז, המובילה להיווצרות H_2O_2 ברקמה. לכן ייבדקו השינויים בשני מדדים אלה גם בפרקי זמן קצרים משעה או ארוכים מ-4 שעות של גירוי גרביטרופי.
5. התוצאות מצביעות על מעורבות של תהליכי חמצון בתהליך הכיפוף הגרביטרופי. בהמשך המחקר נבחן האם תהליכי החמצון קשורים להתפלגות הדיפרנציאלית של שני ההורמונים המעורבים בתהליך, אוקסין ואתילן. רמת האוקסין תיקבע בעזרת כלים מולקולאריים אותם אנו מפתחים בצמחי עגבנייה.

שנה ב':

1. שני נוגדי החמצון, NAC ו-GSH, שנמצאו בשנה א' כחומרים יעילים בעיכוב הכיפוף הגרביטרופי של גבעולי לוע ארי מזן 'Early Potomac' לבן ללא פגיעה בחיוניות הפרחים, הוכיחו את יעילותם בשנה הנוכחית גם במגוון זנים נוספים של לוע ארי בעלי קצב כיפוף מהיר, כאשר NAC היה יעיל יותר בעיכוב הכיפוף בהשוואה ל-GSH. הזן 'פוטומק ורוד' נבחר להמשך הניסויים.
2. האנזים NADPH-אוקסידאז הראה התפלגות דיפרנציאלית ברמת הפעילות בגבעול הנתון לגירוי גרביטרופי לטובת הצד התחתון של הגבעול החל מ-5 שעות של גירוי גרביטרופי, במקביל להופעת זווית כיפוף. שני נוגדי החמצון ביטלו את ההתפלגות הדיפרנציאלית לאחר 24 שעות של גירוי גרביטרופי, ונראה לכן שההתפלגות האסימטרית של פעילות האנזים נחוצה לתהליך הכיפוף.
3. תבנית ההתפלגות האסימטרית של H_2O_2 במהלך הגירוי הגרביטרופי (שנבדקה בשתי שיטות) ושל ROS תאמה את תבנית ההתפלגות של פעילות האנזים NADPH-אוקסידאז לאחר 24 שעות של גירוי גרביטרופי, הן בגבעולי הביקורת והן בהשפעת שני נוגדי החמצון שביטלו את ההתפלגות האסימטרית במועד זה. יחד עם זאת, שני נוגדי החמצון לא הורידו את רמת מי החמצן או ROS ברקמה, וטיפול ב-

GSH אף העלה בצורה משמעותית את רמת ROS. ייתכן וההשפעה של נוגדי החמצון היא על חמצון חומרים מחמצנים אחרים ולא דווקא על רמות של מי חמצן או החומרים המגיבים לסמן הפלואורסצנטי H2DCF-DA (ששימש לבדיקת ROS), ולכן ייבחנו בהמשך גם גורמים נוספים המעורבים בתהליכי חמצון, כמו פעילות האנזים SOD.

4. כדי להבין את אופן פעולתם של נוגדי החמצון בעיכוב זווית הכיפוף, נבחנו השפעתם על מספר גורמים מרכזיים במסלול העברת הגירוי הגרביטרופי. בדומה למעכבי כיפוף אחרים שנבחנו בעבר, גם שני נוגדי החמצון NAC ו-GSH מנעו את שקיעת העמילופלסטים לכיוון ווקטור כוח הכובד, שהוא תנאי הכרחי לקבלת תגובת הכיפוף. תוצאה זו מרמזת על מעורבותם של תהליכי חמצון כבר בשלבים הראשוניים ביותר של מסלול העברת הגירוי, לאחר שעה של הצבה במאוזן. בנוסף, שני נוגדי החמצון ביטלו את ההתפלגות האסימטרית של ייצור אתילן לרוחב הגבעול לאחר 24 שעות של גירוי גרביטרופי, שהוא תהליך המתחיל להתרחש בשלבים מאוחרים יותר של מסלול התגובה (לאחר 4-5 שעות). נראה לכן שנוגדי החמצון מעכבים את זווית הכיפוף באמצעות שינויים בגורמים שונים המעורבים בתחילתו ובהמשכו של מסלול העברת הגירוי של התגובה הגרביטרופית.
5. מאחר ורמות ROS ברקמה נקבעות כתוצאה משרשרת של ריאקציות היוצרות ומפרקות את הסוגים השונים של הרדיקלים החופשיים (בעזרת האנזימים האנטיאוקסידטיביים SOD, קטלאז, גלוטטיון רדוקטאז, אסקורבט פראוקסידאז או פראוקסידאזות שונות), תיבחן בהמשך השפעת נוגדי חמצון גם על גורמים נוספים המעורבים בתהליכי חמצון, כדי להבין את מנגנון הפעולה.
6. התוצאות של ההתפלגות האסימטרית של גורמי חמצון שונים ושל ביטול התפלגות זו באמצעות נוגדי חמצון, כמו גם עיכוב תהליכים שונים במסלול התגובה הגרביטרופית ע"י נוגדי החמצון, מצביעות על מעורבות של תהליכי חמצון בשלבים השונים של תהליך הכיפוף הגרביטרופי. בהמשך המחקר נבחן האם תהליכי החמצון קשורים גם להתפלגות הדיפרנציאלית של האוקסין, שהוא ההורמון המרכזי המעורב בתהליך הכיפוף. רמת האוקסין תיקבע בעזרת כלים מולקולריים אותם אנו מפתחים בצמחי עגבנייה טרנסגניים שהותמרו עם גן סמן לרמת אוקסין.

שנה ג':

1. במועדים הקצרים של הגירוי הגרביטרופי יש תנודות בהתפלגות הפעילות האנזימטית של – NADPH אוקסידאז וקסנטיין-אוקסידאז בין צד עליון לצד תחתון של הגבעול, עד שהמצב מתקבע על גרדיינט פעילות לטובת הצד התחתון של הגבעול. רק לגבי האנזים האנטי-חמצוני SOD לא התקבל גרדיינט פעילות במהלך הכיפוף.
2. למרות ששני נוגדי החמצון עכבו את זווית הכיפוף במהלך הגירוי, לא תמיד הדבר התבטא בביטול גרדיינט הפעילות האנזימטית לרוחב הגבעול.
3. נוגדי החמצון תורמים לפעילות האנטי-חמצונית ברקמה באמצעות הגברת פעילות ה-SOD ועיכוב הפעילות של האנזימים יוצרי הרדיקלים החופשיים NADPH-אוקסידאז וקסנטיין-אוקסידאז. מאחר ופעילות האנזים קסנטיין-אוקסידאז מעוכבת ע"י האנזים האנטי-חמצוני SOD, ייתכן ונוגדי החמצון מעכבים את פעילות הקסנטיין-אוקסידאז גם בצורה לא ישירה, דרך הגברת פעילות ה-SOD. תוצאות אלה מצביעות על כך שההשפעה של נוגדי החמצון בעיכוב זווית הכיפוף אינה ישירה אלא מתווכת ע"י שלושת אנזימי חמצון אלה המעורבים בתהליכי החמצון ברקמה.
4. התוצאות הכמותיות של תבנית שקיעת העמילופלסטים בסטטוציטים מאמתות את התוצאות של האנליזה המיקרוסקופית שהתקבלו בשנה השנייה למחקר, ומרמזות שנוגדי החמצון גורמים כנראה

לפיזור העמילופלסטים בתא ומונעים ע"י כך את שקיעתם על דפנות התא בהתאם לשינוי האוריינטציה של הגבעול. כתוצאה מכך נמנע שלב קליטת הגירוי של כוח הכבידה, וע"י כך נמנעת גם תגובת הכיפוף בהמשך הגירוי הגרביטרופי.

5. התוצאות שהתקבלו לגבי אתילן מחזקות את ממצאי השנה הקודמת לגבי הגברת קצב ייצור האתילן בהשפעת נוגד החמצון NAC, ולגבי מעורבות תהליכי חמצון בהתפלגות ייצור האתילן המהווה חלק ממסלול העברת הגירוי של התגובה הגרביטרופית.

6. ה-pH של תמיסות ההטענה השפיע על היעילות של נוגדי החמצון בעיכוב הכיפוף ועל הימצאותם במצב פעיל במהלך ההצבה במאוזן, כאשר GSH היה יעיל ביותר ב-pH החומציים (2, 3), בעוד ש-NAC היה יעיל יותר בטווחי pH רחבים יותר, חומצי ובסיסי. נראה לכן שניתן להשתמש במידע זה כדי לפתח תכשירים לעיכוב הכיפוף.

7. התוצאות שהתקבלו עם המוטנטים של צמחי ארבידופסיס שבהם הואצה תגובת הכיפוף בשעה הראשונה עקב המחסור בחומצה אסקורבית או ב-ROS, מצביעות שוב על מעורבותם של תהליכי חמצון בתהליכים הראשוניים של תגובת הכיפוף המתרחשים כבר לאחר שעה אחת של הצבה במאוזן, ומחזקות את הממצאים שהתקבלו לגבי השפעת נוגדי החמצון על תנועת העמילופלסטים בגבעולי לוע-ארי המתרחשת בשעה הראשונה של הגירוי.

8. ההתפלגות האסימטרית של האוקסין בגבעולי עגבנייה טרנסגניים לטובת הצד התחתון של אזור הכיפוף של הגבעול הקדימה את היווצרות זווית הכיפוף, דבר המצביע על מעורבותו של הורמון זה בתהליך.

9. נוגד החמצון NAC עיכב את זווית הכיפוף באמצעות ביטול גרדיינט האוקסין לרוחב הגבעול והפחתת ריכוז האוקסין באנדודרמיס. יתכן ש-NAC מעכב את ההובלה של אוקסין לרוחב הגבעול הגורמת בסופו של דבר להתפלגות האסימטרית של אוקסין.

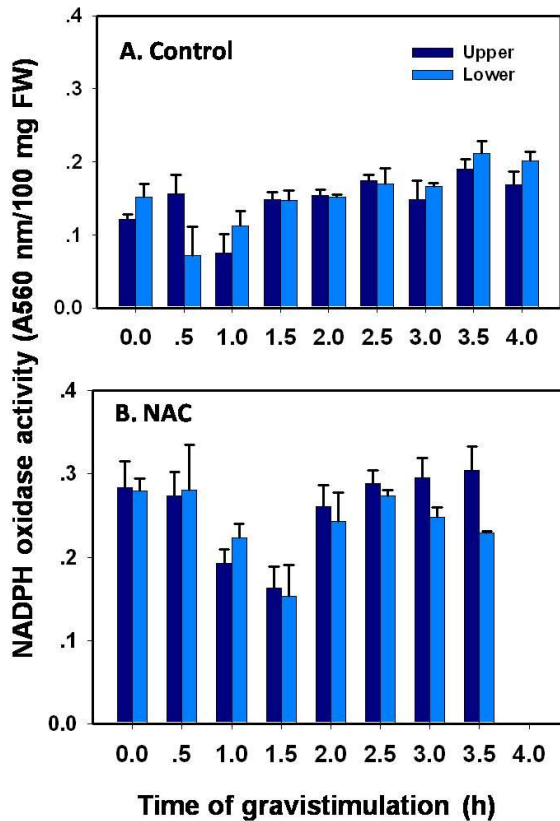
מסקנות כלליות:

נוגדי החמצון מעכבים את זווית הכיפוף באמצעות שינויים בגורמים שונים המעורבים בתחילתו (שקיעת עמילופלסטים), בהמשכו (התפלגות רמות אוקסין) ובסופו (התפלגות רמות אתילן) של מסלול העברת הגירוי של התגובה הגרביטרופית. תוצאות אלה, והתוצאות של ההתפלגות האסימטרית של גורמי חמצון שונים במהלך הכיפוף ושל ביטול התפלגות זו באמצעות נוגדי חמצון, מצביעות על מעורבות של תהליכי חמצון בשלבים השונים של תהליך הכיפוף הגרביטרופי. מעורבות זו הוראתה ב-3 המערכות הצמחיות שנבחנו, פרחי לוע-ארי, צמחי ארבידופסיס וצמחי עגבנייה, דבר המצביע על כלליות התופעה. ההשפעה של נוגדי החמצון בעיכוב זווית הכיפוף מתווכת ע"י שלושה אנזימי חמצון המעורבים בתהליכי החמצון ברקמה. נוגדי החמצון עיכבו את תהליך הכיפוף באמצעות עיכוב שני אנזימים מזרזי יצירת ראדיקלים חופשיים (NADPH-אוקסידאז, קסנטין-אוקסידאז) וזירוז אנזים אנטי-חמצוני (SOD). כתוצאה מכך נמנע תהליך התרופפות הדופן הדורש נוכחות של ראדיקלים חופשיים ופחתה רמת האוקסין ברקמת האנדודרמיס, הדרוש לתהליך הכיפוף. לחילופין, ייתכן שנוגדי החמצון שהפחיתו את רמת האוקסין ברקמה, גרמו ע"י כך גם לעיכוב פעילות האנזים NADPH-אוקסידאז. לכן דרוש מחקר נוסף כדי להבין את סדר האירועים בתהליכים הנ"ל המובילים לכיפוף הגרביטרופי. המחקר קידם את ההבנה של מעורבות תהליכי חמצון בהשראת תהליכי כיפוף, ועל בסיס המידע שפותח ניתן יהיה להשתמש בחומרים נוגדי החמצון שנמצאו כאמצעים לשיפור האיכות של פרחי קטיף חשובים הסובלים מבעיית הכיפוף.

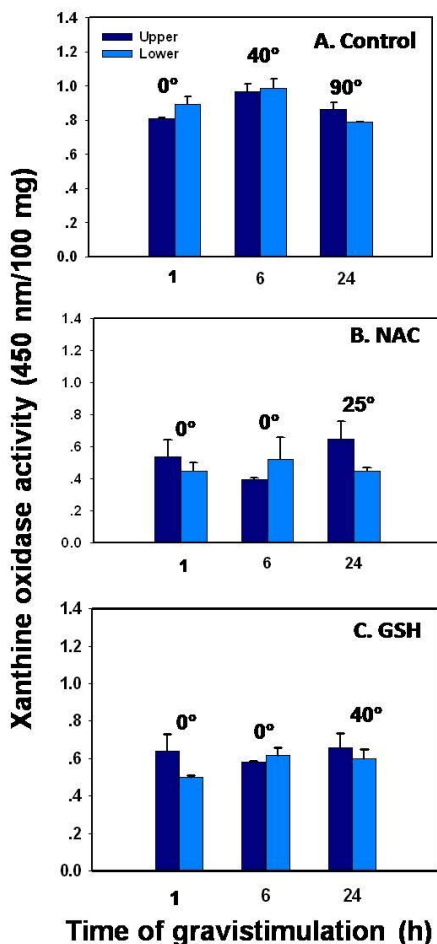
ה. פירוט הפרסומים המדעיים בכתב ובע"פ

תוצאות המחקר טרם פורסמו.

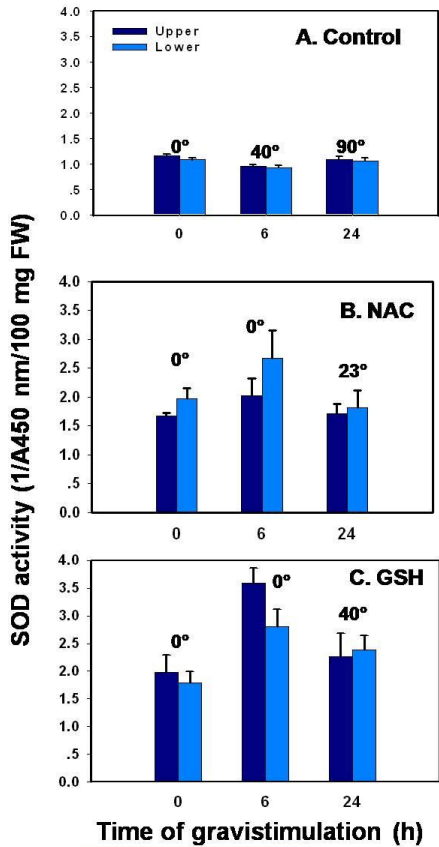
ו. תוצאות לדו"ח שנה ג':



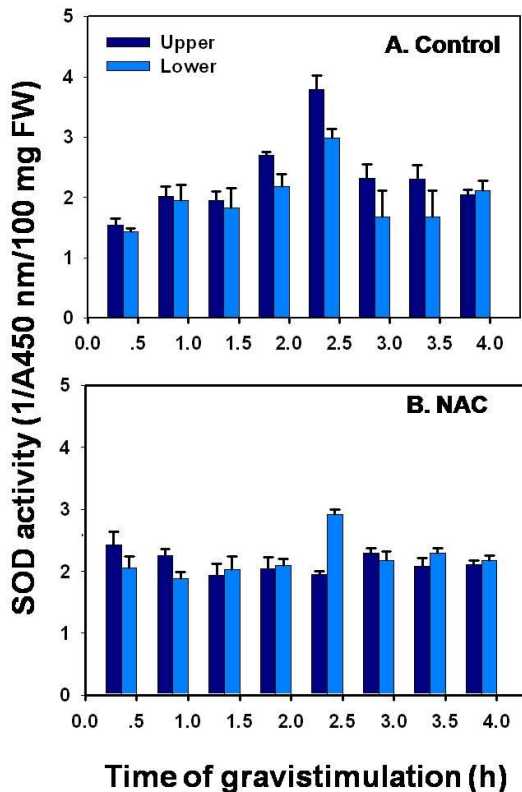
איור 1: השפעת הטענה בנוגד החמצון NAC בריכוז של 20 mM (B) בהשוואה לביקורת (A) על הקינטיקה של פעילות האנזים NADPH-אוקסידאז במקטעי גבעול שנלקחו מצד תחתון וצד עליון של אזור הכיפוף בגבעולי לוע ארי מזן 'פוטומק ורוד' במועדים שונים במהלך 4 השעות הראשונות של הגירוי הגרביטרופי. פעילות האנזים NADPH-אוקסידאז נקבעה לאחר 30 דקות ריאקציה. התוצאות מייצגות ממוצעי מקטעים של 4 גבעולים \pm שגיאת תקן.



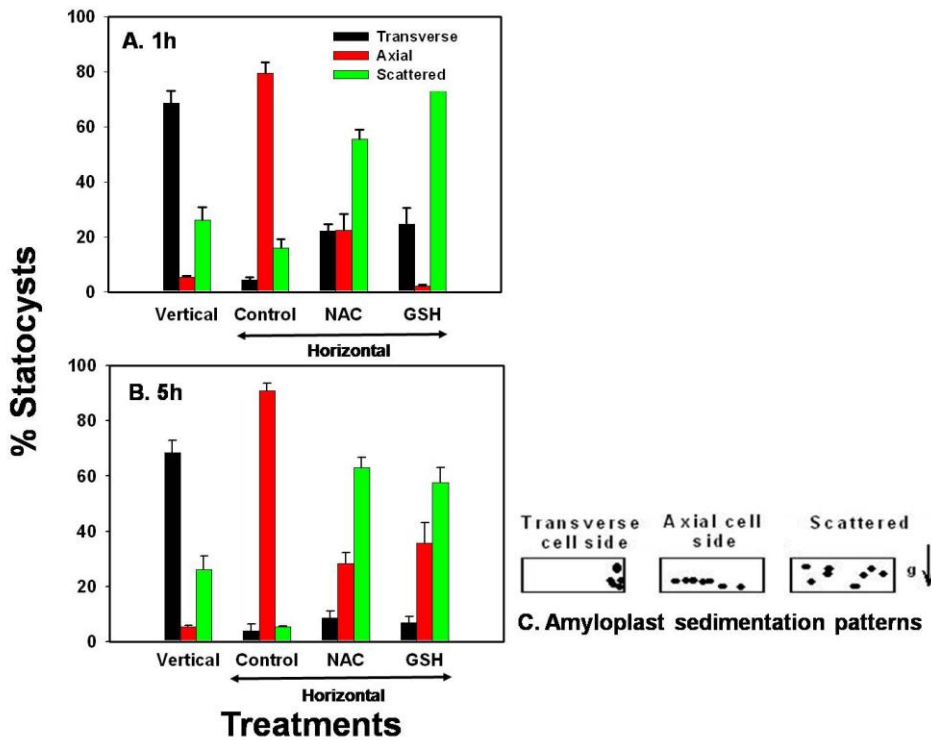
איור 2: השפעת הטענה בנוגדי החמצון NAC (B) ו-GSH (C) בריכוז של 20 mM בהשוואה לביקורת (A) על ההתפלגות הדיפרנציאלית של פעילות האנזים קסנתין אוקסידאז בין שני צידי הגבעול של לוע ארי מזן 'פוטומק ורוד' במהלך גירוי גרביטרופי של 24 שעות, ועל זווית הכיפוף. מקטעי גבעול נלקחו מצד תחתון וצד עליון של אזור הכיפוף במועדים שונים במהלך הגירוי הגרביטרופי, ופעילות האנזים נקבעה בכל מקטע ביחס למשקל הרקמה. המספרים מעל לעמודות מייצגים את זווית הכיפוף בכל מועד בדיקה. התוצאות מייצגות ממוצעי מקטעים של 4 גבעולים \pm שגיאת תקן.



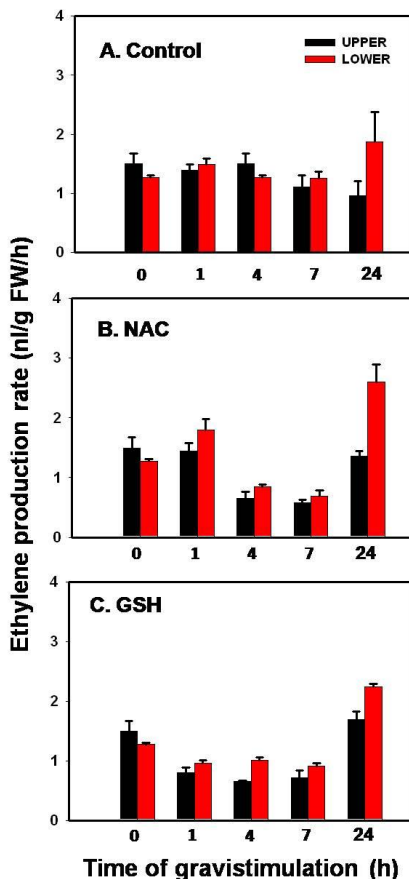
איור 3: השפעת הטענה בנוגדי החמצון NAC (B) ו-GSH (C) בריכוז של 20 mM בהשוואה לביקורת (A) על ההתפלגות הדיפרנציאלית של פעילות האנזים SOD בין שני צידי הגבעול של לוע ארי מזן 'פוטומק ורוד' במהלך גירוי גרביטרופי של 24 שעות, ועל זווית הכיפוף. מקטעי גבעול נלקחו מצד תחתון וצד עליון של אזור הכיפוף במועדים שונים במהלך הגירוי הגרביטרופי, ופעילות האנזים נקבעה בכל מקטע ביחס למשקל הרקמה. המספרים מעל לעמודות מייצגים את זווית הכיפוף בכל מועד בדיקה. התוצאות מייצגות ממוצעי מקטעים של 4 גבעולים \pm שגיאת תקן.



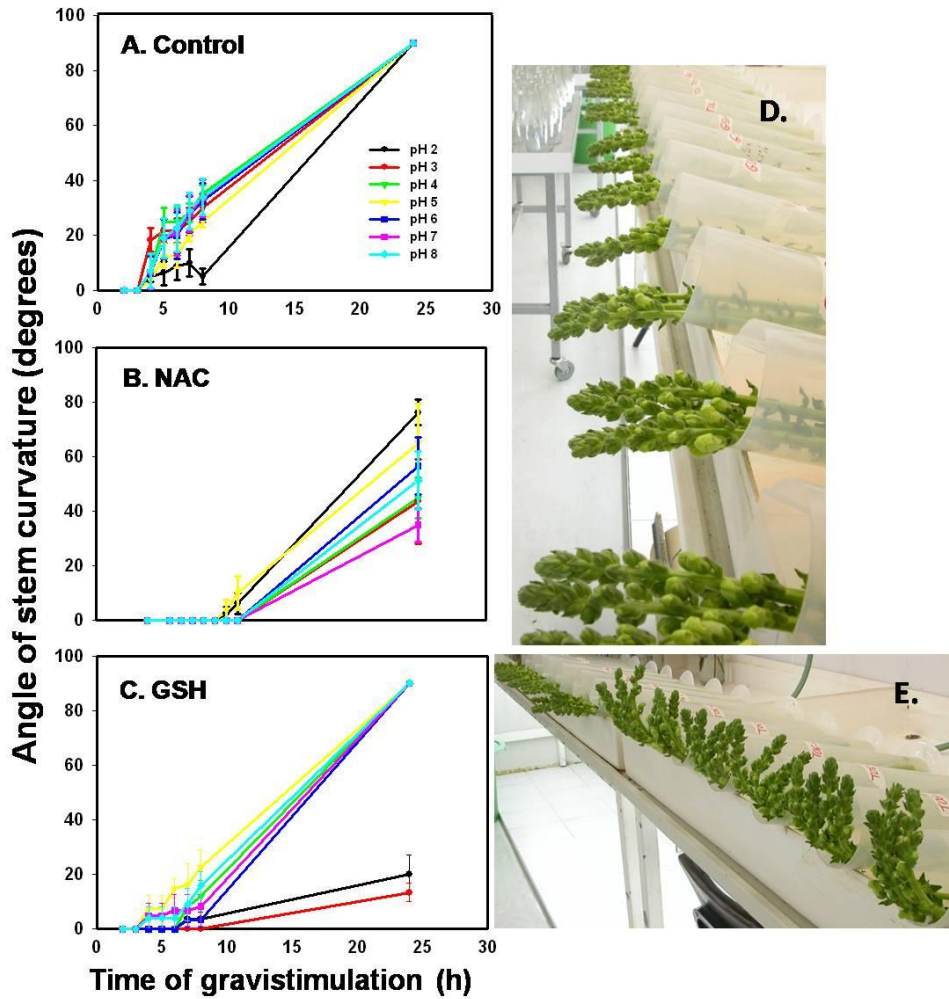
איור 4: השפעת הטענה בנוגד החמצון NAC בריכוז של 20 mM (B) בהשוואה לביקורת (A) על ההתפלגות הדיפרנציאלית של פעילות האנזים SOD בין שני צידי הגבעול של לוע ארי מזן 'פוטומק ורוד' במועדים שונים במהלך 4 השעות הראשונות של הגירוי הגרביטרופי. מקטעי גבעול נלקחו מצד תחתון וצד עליון של אזור הכיפוף במועדים שונים במהלך הגירוי הגרביטרופי, ופעילות האנזים נקבעה בכל מקטע ביחס למשקל הרקמה. התוצאות מייצגות ממוצעי מקטעים של 4 גבעולים \pm שגיאת תקן.



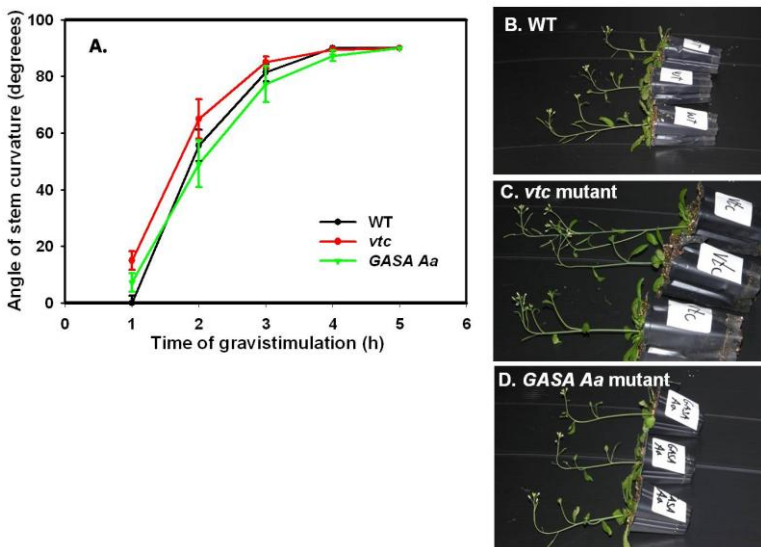
איור 5: השפעת הטענה בנוגדי החמצון NAC ו-GSH בריכוז של 20 mM בהשוואה לביקורת על תבניות שקיעת העמילופלסטים בתאי שכבת האנדודרמיס (סטטוציטים) של אזור הכיפוף שנלקח מחתך אורך של גבעולי לוע ארי מזן 'פוטומק ורוד' שהוצבו במאונך או במאונך למשך שעה (A) ו-5 שעות (B). בכל חתך נבדק מדגם של 25 סטטוציטים ונקבע % התאים במדגם בהם תבנית שקיעת העמילופלסטים (C) הייתה על הדופן הקצרה של התא בכיוון מאונך (Transverse), על הדופן הארוכה של התא (Axial) או תאים בהם העמילופלסטים היו מפוזרים (Scattered). התוצאות מייצגות ממוצעי מדגמים של 5 חתכים לכל טיפול וזמן הצבה במאונך \pm שגיאת תקן.



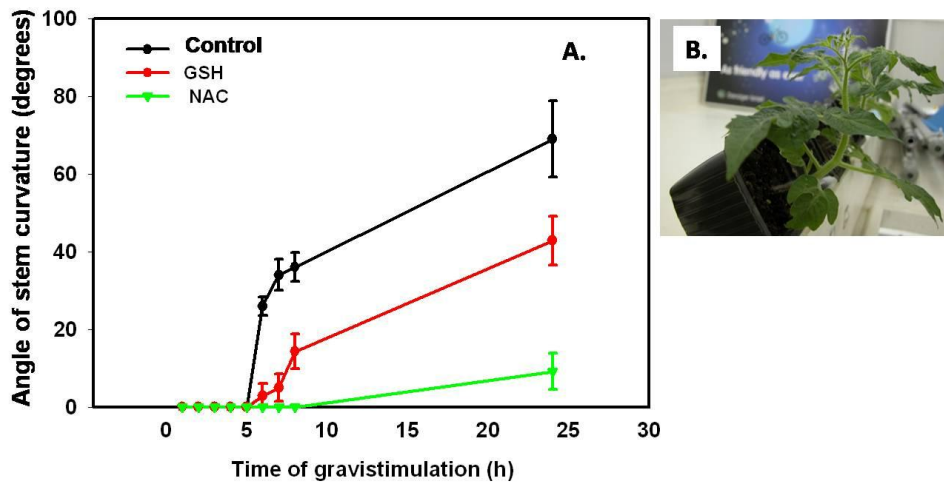
איור 6: השפעת הטענה בנוגדי החמצון NAC (B) ו-GSH (C) בריכוז של 20 mM בהשוואה לביקורת (A) על ההתפלגות הדיפרנציאלית של קצב ייצור האתילן באזור הכיפוף בין שני צידי הגבעול של לוע ארי במהלך גירוי גרביטרופי של 24 שעות. גבעולי לוע ארי מזן 'פוטומק ורוד' הוטענו למשך 24 שעות ב-NAC או ב-GSH 20 mM והוצבו לאחר מכן במאונך למשך 24 שעות. מקטעים משני הצדדים של גבעול מאונך או מצד עליון וצד תחתון של אזור הכיפוף של גבעול מאונך נלקחו במועדים שונים במהלך הצבת הגבעול במאונך, וקצב ייצור האתילן נקבע בכל מקטע ביחס למשקל הרקמה. התוצאות מייצגות ממוצעי מקטעים של 5 גבעולים \pm שגיאת תקן.



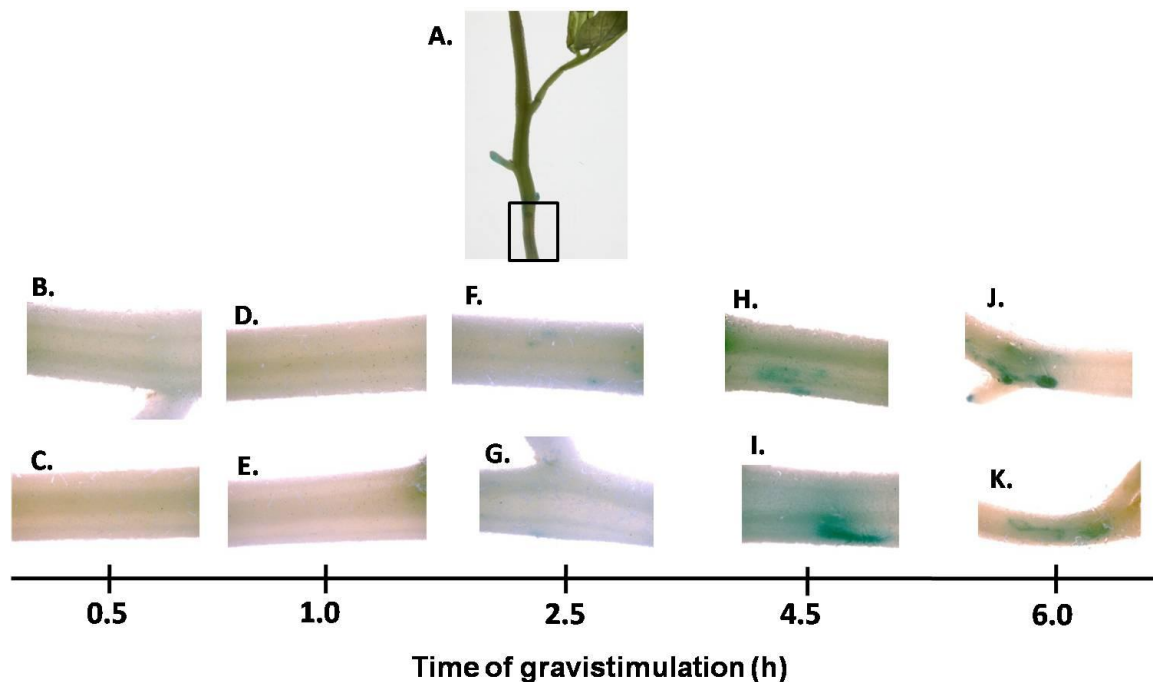
איור 7: השפעת ה-pH של תמיסות ההטענה בנוגדי החמצון NAC (B) ו-GSH (C) בריכוז של 20 mM בהשוואה לביקורת TOG-6 (A) על השתנות זווית הכיפוף בגבעולי פריחה של לוע ארי מזן 'פוטומק אדום' במהלך 24 שעות של גירוי גרביטרופי בחדר תצפית, ועל מופע הכיפוף בתחילת הגירוי (D) ובסופו (E). הגבעולים הוטענו למשך 24 שעות בחדר התצפית בתמיסות של TOG-6 ונוגדי החמצון NAC או GSH שהוכנו ב-pH שונים בטווח של 2-8, ולאחר מכן הוצבו במאוזן במשורות בתמיסת כלורין אורגני (TOG-6) למשך 24 שעות נוספות, למדידת זווית הכיפוף במועדים המצוינים בגרף. התוצאות מייצגות ממוצעים של 8 גבעולים \pm שגיאת תקן.



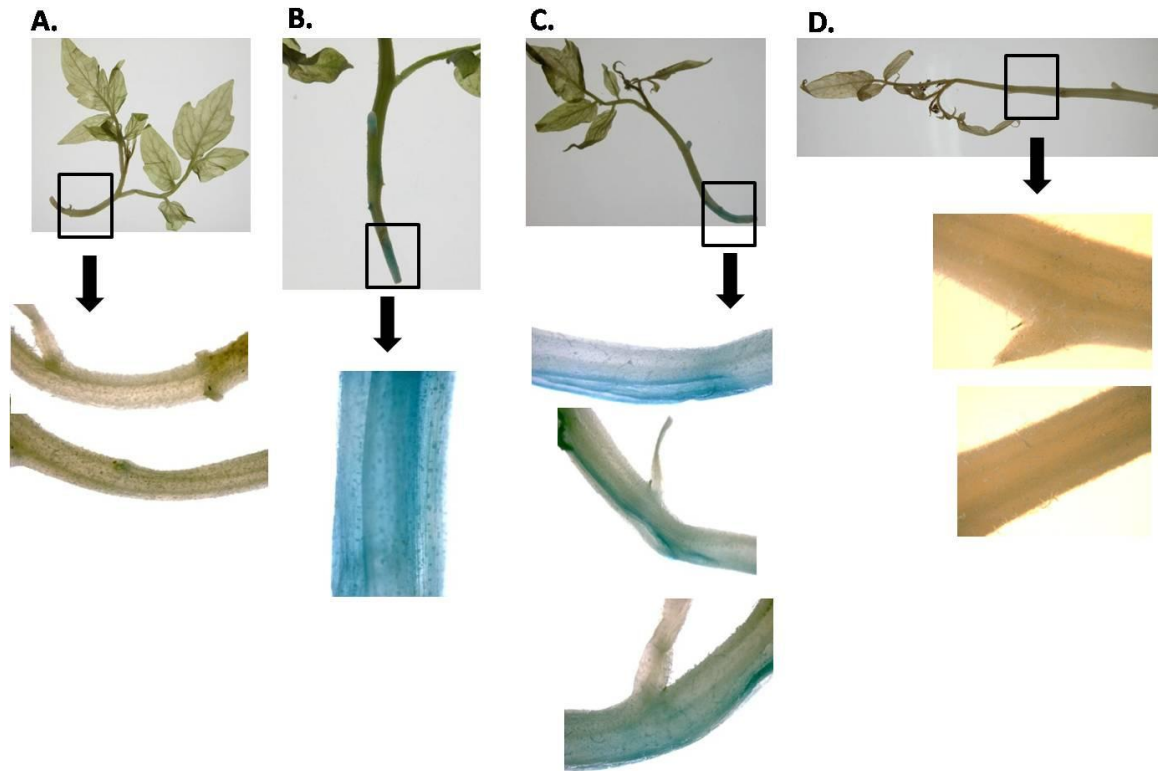
איור 8: קינטיקה של תגובת הכיפוף של שני מוטנטים של צמחי ארבידופסיס הפגועים בתהליכי חמצון שונים בהשוואה לזן הבר (WT) במהלך גירוי גרביטרופי של 5 שעות בחדר תצפית (A), ומופע הצמחים של זן הבר - WT (B), המוטנט *vtc* (C) והמוטנט *GASA Aa* (D) לאחר 5 שעות של גירוי גרביטרופי. התוצאות בגרף A מייצגות ממוצעים של 10 צמחים \pm שגיאת תקן.



איור 9: השפעת הטענה בנוגדי החמצון GSH ו-NAC בריכוז של 20 mM בהשוואה לביקורת על קינטיקה של תגובת הכיפוף של גבעולי עגבנייה מזן 'מיקרוטום' (WT) במהלך גירוי גרביטרופי של 24 שעות בחדר תצפית (A), ומופע צמחי העגבנייה לאחר 24 שעות של גירוי גרביטרופי (B). הגבעולים נקטפו מצמחי עגבנייה בני 6 שבועות, הוטענו בתמיסות השונות למשך 24 שעות והוצבו לאחר מכן במאוזן. התוצאות בגרף A מייצגות ממוצעים של 10 צמחים \pm שגיאת תקן.



איור 10: קינטיקה של התפלגות רמת האוקסין לרוחב אזור הכיפוף (כ- 2 ס"מ מקודקוד הצמח) של גבעולי עגבנייה מזן 'מיקרוטום' (A) שנלקחו מצמחים בני 6 שבועות המותמרים בגן המדווח GUS תחת בקרה של הפרומוטור של הגן *Aux/IAA4*, לאחר הצבת הצמחים במאוזן לפרקי זמן של: 0.5 (C-B), 1 (E-D), 2.5 (G-F), 4.5 (I-H) ו-6 (K-J) שעות. הופעת צבע כחול מעידה על נוכחות של הגן *Aux/IAA4* ולכן על רמת אוקסין ברקמה. הגבעול השלם (A) צולם במצלמה ומקטעי הגבעולים (K-B) צולמו בבינוקולר.



איור 11: התפלגות רמת האוקסין לרוחב אזור הכיפוף (כ- 2 ס"מ מקודקוד הצמח) של גבעולי עגבנייה מזן 'מיקרוטום' שנלקחו מצמחים בני 6 שבועות של זן הבר (WT) לאחר 24 שעות של גירוי גרביטרופי (A), ומצמחים המותמרים בגן המדווח GUS תחת בקרה של הפרומוטור של הגן *Aux/IAA4* לאחר הצבה במאונך ל- 24 שעות (B), הצבה במאונך ל- 24 שעות (C) או לאחר הטענה בנוגד החמצון NAC והצבה במאונך ל- 24 שעות (D). הופעת צבע כחול מעידה על נוכחות של הגן *Aux/IAA4* ולכן על רמת אוקסין ברקמה. הגבעולים השלמים צולמו במצלמה ומקטעי הגבעולים שנלקחו מאזורי הגבעול המסומנים במסגרת, צולמו בניוקולר.

ז. סיכום עם שאלות מנחות לד"ח המחקר

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

המחקר הנוכחי בא לאפיין את מעורבותם של גורמי חמצון בכיפוף הגרביטרופי של גבעולי לוע-ארי, כדי לפתח טיפולים וכלים לעיכוב הכיפוף המבוססים על חומרים נוגדי או משרי חמצון או על גנים המעורבים בתהליך. איתור גנים כאלה יוכל לסייע בעתיד בבקרת הכיפוף בגבעולי פריחה באמצעים גנטיים. **מטרות המחקר לשנה ג': 1**) המשך בחינת ההתפלגות הדיפרנציאלית של גורמי חמצון שונים (פעילות האנזים NADPH-אוקסידאז במועדים קצרים, קסנטיין-אוקסידאז ו-SOD) במהלך כיפוף גרביטרופי של גבעולי לוע-ארי, והשפעת נוגדי החמצון על התפלגותם ועל זווית הכיפוף; **2**) המשך בחינת ההשפעה של נוגדי חמצון על תנועת עמילולפלסטים והתפלגות ייצור אתילן לרוחב הגבעול במהלך הכיפוף הגרביטרופי של גבעולי לוע-ארי; **3**) בחינת היעילות של שני נוגדי החמצון בעיכוב הכיפוף הגרביטרופי של גבעולי לוע-ארי בהשפעת pH התמיסה; **4**) בחינת המעורבות בתגובת הכיפוף של גנים הקשורים לתהליכי חמצון באמצעות בחינת תגובת הכיפוף של מוטנטים לגנים אלה בצמחי ארבידופסיס; **5**) בחינת הקשר בין תהליכי החמצון וההתפלגות הדיפרנציאלית של האוקסין במהלך הכיפוף באמצעות שימוש בצמחי עגבנייה טרנסגניים.

2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הד"ר:

הניסויים בוצעו בגבעולים של 3 מערכות צמחיות שהוצבו במאוזן למשך 24 שעות - פרחי לוע-ארי, מוטנטים של צמחי ארבידופסיס וצמחי עגבנייה טרנסגניים. המדדים נקבעו במקטעים חצויים לצד עליון ותחתון של אזור הכיפוף של הגבעול. נבחנה ההשפעה של שני נוגדי חמצון (GSH, NAC) על זווית הכיפוף, על פעילות האנזימים NADPH-אוקסידאז, קסנטין-אוקסידאז ו-SOD, על רמת מי חמצן ו-ROS, על תנועת עמילופלסטיים בחתכי גבעול, קצב ייצור אתילן ורמת אוקסין בשני צידי הגבעול. רמת האוקסין נבחנה ע"י מעקב אחר התבטאות הגן המדווח GUS תחת בקרה של הפרומוטור של הגן *Aux/IAA4* בצמחי עגבנייה טרנסגניים. **תוצאות עיקריות:** אותרו שני חומרים מעכבי חמצון, NAC ו-GSH, שעכבו את הכיפוף הגרביטרופי של גבעולי לוע ארי ללא פגיעה בחיוניות הפרחים. נמצאה התפלגות דיפרנציאלית ברמת הפעילות של האנזימים NADPH-אוקסידאז וקסנטין-אוקסידאז בגבעול הנתון לגירוי גרביטרופי לטובת הצד התחתון של הגבעול במקביל להופעת זווית כיפוף, והתפלגות זו בוטלה או התהפכה לטובת הצד העליון ע"י שני נוגדי החמצון, NAC ו-GSH לאחר 24 שעות של גירוי. לא נמצאה התפלגות דיפרנציאלית של האנזים SOD במהלך הגירוי. שני נוגדי החמצון עיכבו את פעילות שני האנזימים יוצרי הראדיקלים החופשיים והגבירו את פעולת האנזים האנטי-חמצוני SOD. תבנית ההתפלגות האסימטרית של מי חמצן במהלך הגירוי הגרביטרופי ושל ROS תאמה את תבנית ההתפלגות של פעילות האנזים NADPH-אוקסידאז, הן בגבעולי הביקורת והן בהשפעת שני נוגדי החמצון שביטלו את ההתפלגות האסימטרית. יחד עם זאת, שני נוגדי החמצון לא הורידו את רמת מי החמצן או ROS ברקמה. שני נוגדי החמצון מנעו את שקיעת העמילופלסטיים כבר לאחר שעה של גירוי גרביטרופי, וביטלו את ההתפלגות האסימטרית של ייצור האתילן לאחר 24 שעות של גירוי גרביטרופי. ה-pH של תמיסות ההטענה השפיע על היעילות של נוגדי החמצון בעיכוב הכיפוף ועל הימצאותם במצב פעיל במהלך ההצבה במאוזן. ההתפלגות האסימטרית של האוקסין בגבעולי עגבנייה לטובת הצד התחתון של אזור הכיפוף של הגבעול הקדימה את היווצרות זווית הכיפוף. נוגד החמצון NAC עיכב את זווית הכיפוף באמצעות ביטול גרדיינט האוקסין לרוחב הגבעול והפחתת ריכוזו.

3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו:

נוגדי החמצון מעכבים את זווית הכיפוף באמצעות שינויים בגורמים שונים המעורבים בתחילתו (שקיעת עמילופלסטיים), בהמשכו (התפלגות רמות אוקסין) ובסופו (התפלגות רמות אתילן) של מסלול העברת הגירוי של התגובה הגרביטרופית. תוצאות אלה, והתוצאות של ההתפלגות האסימטרית של גורמי חמצון שונים במהלך הכיפוף ושל ביטול התפלגות זו באמצעות נוגדי חמצון, מצביעות על מעורבות של תהליכי חמצון בשלבים השונים של תהליך הכיפוף הגרביטרופי. מעורבות זו הוראתה ב-3 המערכות הצמחיות שנבחנו, פרחי לוע-ארי, צמחי ארבידופסיס וצמחי עגבנייה, דבר המצביע על כלליות התופעה. ההשפעה של נוגדי החמצון בעיכוב זווית הכיפוף מתווכת ע"י שלושה אנזימי חמצון המעורבים בתהליכי החמצון ברקמה. נוגדי החמצון עיכבו את תהליך הכיפוף באמצעות עיכוב שני אנזימים מזרזי יצירת ראדיקלים חופשיים (NADPH-אוקסידאז, קסנטין-אוקסידאז) וזירוז אנזים אנטי-חמצוני (SOD). כתוצאה מכך נמנע תהליך התרופפות הדופן הדורש נוכחות של ראדיקלים חופשיים ופחתה רמת האוקסין ברקמת האנדודרמיס, הדרוש לתהליך הכיפוף. לחילופין, ייתכן שנוגדי החמצון שהפחיתו את רמת האוקסין ברקמה, גרמו ע"י כך גם לעיכוב פעילות האנזים NADPH-אוקסידאז.

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

שינוי במהלך העבודה: הוכנס המודל של צמחי עגבנייה טרנסגניים עם קונסטרוקט הכולל את הגן המדווח GUS תחת בקרה של הפרומוטור של הגן *Aux/IAA4* שמקורו בעגבנייה. במערכת זו השתמשנו בפרומוטור הנ"ל לגן *Aux/IAA4* בעגבנייה כסמן לרמת אוקסין כדי ללמוד כיצד משתנה הורמון זה במהלך התגובה הגרביטרופית של

הגבעול בהשפעת גורמי חמצון שונים. לא ברור עדיין כיצד נוגדי החמצון מפחיתים את רמת האוקסין ברקמה, והמשך המחקר יוכל להתמקד בבחינת ההשפעה המעכבת של נוגדי החמצון על ההובלה של אוקסין לרוחב הגבעול ועל תהליך התרופפות הדופן המתרחש במהלך ההתארכות הדיפרנציאלית של הגבעול. כן דרוש מחקר נוסף כדי להבין את סדר האירועים בתהליכים של יצירת ROS והתפלגות דיפרנציאלית של רמת האוקסין המובילים לכיפוף הגרביטרופי. המחקר קידם את ההבנה של מעורבות תהליכי חמצון בהשראת תהליכי כיפוף, ועל בסיס המידע שפותח ניתן יהיה להשתמש בחומרים נוגדי החמצון שנמצאו כאמצעים לשיפור האיכות של פרחי קטיף חשובים הסובלים מבעיית הכיפוף. בנוסף, ניתן יהיה להשתמש במידע על השפעות pH התמיסה זה כדי לפתח תכשירים לעיכוב הכיפוף.

5. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח.

תוצאות המחקר טרם פורסמו.

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

רק בספריות

✓ ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)

חסוי – לא לפרסם