

דו"ח מסכם
לתכנית מחקר מספר 430-0099-09

בנושא:

מניפולציה של תהליכי ניתוק בצמחים באמצעות וויסות ביטוי גן לריבונוקליאז

**Biotechnological manipulation of abscission by modulating ribonuclease gene
expression**

מוגש:

לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

מאת:

אמנון לרס, *טל בר, אמנון ליכטר, שמעון מאיר, סוניה פילוסוף-הדס, שאול בורד
וסונגו ליליאן

המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר הקטיף, מרכז וולקני, בית דגן

*Tal Bar, Amnon Lers, Shimon Meir, Amnon Lichter, Sonia Philosoph-Hadas Shaul Burd
and and Lilian Sonogo

Dept. of Postharvest Science of Fresh Produce, ARO, The Volcani Center, Bet-Dagan

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

* סטודנטית לתואר שלישי

* Ph.D. Student

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

חתימת החוקר

יוני 2010

מרכז וולקני, בית-דגן

<u>עמוד</u>	<u>נושא</u>
3	1. תקציר
4	2. מבוא
4	2.1. מטרות המחקר
5	3. פירוט עיקרי הניסויים
5	3.1. ניסויי טרנספורמציה ליצירת צמחי עגבנייה טרנסגניים בהם ביטוי <i>LX</i> מעוכב באמצעות RNAi
6	3.2. זיהוי צמחי עגבנייה טרנסגניים בהם ביטוי <i>LX</i> מוגבר
7	3.3. בחינת השפעת עיכוב ביטוי הגן <i>LX</i> בצמחי עגבנייה טרנסגנים קיימים בהם יש רק עיכוב ביטוי חלקי של הגן
7	3.4. תבנית ביטוי החלבון <i>LX</i> בתגובה למתן ההורמונים הצמחיים אתילן ואוקסין
8	3.5. מיקום האזור ברקמת הניתוק בו מתרחש תהליך המוות ובו יש ביטוי של הגן <i>LX</i>
9	3.6. עדויות נוספות לקיום מוות מתוכנת ברקמת הניתוק בעגבנייה
11	3.7. מעורבות הגן לריבונוקליאז <i>LX</i> בתהליכי מוות המופעלים בתנאי הרעבה לזרחן
16	3.8. בחינת התרחשות תהליך הניתוק בצמחי עגבנייה בהם יש ביטוי ביתר של גנים אנטי-אפופטוטיים המעכבים את תהליך המוות
18	סיכום עם שאלות מנחות לדו"ח המחקר
19	ביבליוגרפיה

1. תקציר

הצגת הבעיה – לתהליך הניתוק המוביל לנשירת פרחים, פירות או עלים, יש משמעות חקלאית רבה הן ברמה הגידולית והן במהלך האחסון. לנשירה מוגברת של פרחים או פירות צעירים עקב עקות יש השפעה על היבול בעוד שהאצת הנשירה באחסון גורמת לפגיעה משמעותית באיכות התוצרת הטרייה. הראנו בעבר שעיכוב יצור הריבונוקליאז LX מוביל לעיכוב משמעותי בתהליך הניתוק בעגבנייה. במחקר זה בוצע ללימוד מעורבותו בחינת אפשרות השימוש במניפולציה של ביטוי ככלי ביוטכנולוגי להשפעה על הניתוק.

מטרות המחקר – הכנת צמחים טרנסגניים בהם ביטוי LX יעוכב באופן יעיל באמצעות RNAi; לימוד השפעת מניפולציית ביטוי הגן על הניתוק בצמחים אלו יחד עם המשך אפיון הטרנסגנים הקיימים; אנליזת צמחים בהם גם LX מבוטא ביתר; לימוד מעורבות LX בניתוק והקשר לתהליך PCD ברקמת הניתוק.

שיטות ומהלך העבודה – טרנספורמציות בוצעו עם ווקטורי RNAi. נערך מעקב אחרי קצב התקדמות תהליכי הניתוק בעיקר בפרחים. השפעת מחסור בזרחן על תהליך מוות בעלים ומעורבותו של LX התבצעה תוך גידול הידרופוני בתמיסת מזון מאופיינת. מעקב אחר ביטוי הגנים בוצע באמצעות PCR ובוצעה אנליזה מיקרוסקופית לזיהוי סמני מוות תאיים ומיקומו של חלבון ה-LX בשיתוף עם מעבדה בסלובניה.

תוצאות עיקריות – הוכנו מספר עשרות צמחים טרנסגניים אשר נבחנו באנליזה מולקולארית להשתקת ביטוי LX. בחלק גדול נמצאה השתקה יעילה מזו שנצפתה בצמחי האנטיסנס הקודמים. צמחי T1 נמצאים במהלך ביצוע ניסויים לבחינת הפנוטיפ. זוהו מספר סמנים למוותמתוכנת ברקמת הניתוק כולל עלייה ברמת צורוני חמצן פעילים, שינוי במורפולוגיית הגרעינים ועדות לביקוע ה-DNA. LX עולה ברמתו בעיקר בתאים הדיסטליים לאזור הניתוק מקום בו נמצאה עדות להתרחשות המוות המתוכנת. בנוסף נמצאו עדויות לכך שיש אסימטריה בין שני צידיו של אזור הניתוק מבחינת קיום תהליך המוות וביטוי גנים היחודיים לניתוק. בצמחים טרנסגניים בהם יש ביטוי ביתר של גנים אנטי-אפופטוטיים יש עכוב משמעותי של תהליך הניתוק. במקביל נמצא שתהליך מוות מושרה בעלי העגבנייה עקת הרעבה לזרחן וגם הוא בדומה לניתוק מעוכב בצמחים בהם ביטוי LX עוכב. כן הודגמה מעורבותו המרכזית של אתילן בתהליך זה.

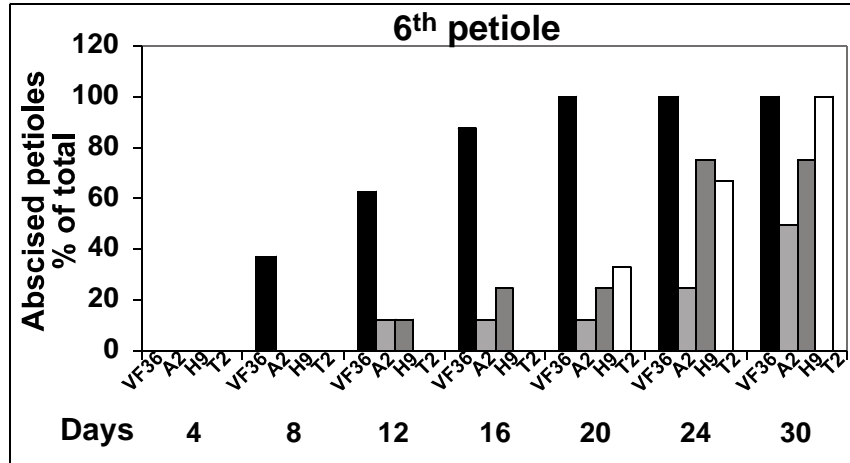
מסקנות – LX מעורב בתהליכי מוות בעגבנייה וכנראה בעל תפקיד מרכזי בתהליך מוות החיוני להשלמת הניתוק. כיוון שבצמחים הקיימים יש רק עיכוב חלקי של ביטוי LX יתכן מאוד שבצמחים שפותחו במסגרת פרוייקט זה יהיה פנוטיפ חזק יותר על הניתוק כמו גם אולי על תהליכים אחרים בהם מעורב תהליך המוות המתוכנת. העכוב בניתוק שנמדד בצמחים בהם יש ביטוי ביתר של גנים אנטי-אפופטוטיים סביר שמתרחש כתוצאה מעכוב של תהליכי מוות מתוכנת ממצא המחזק את ההיפותיזה שלנו לגבי השפעתו של עיכוב ביטוי של LX על תהליכי המוות בעגבנייה.

2. מבוא – רקע מדעי קצר ומטרות המחקר לתקופת הדוח.

תהליך הניתוק (abscission) בצמחים אחראי לנשירת איברי הצמח כולל עלים, פרחים או פירות כחלק מהתפתחותו הנורמאלית של הצמח [1] אולם לעיתים קרובות השראת התהליך מואצת בתנאי עקה מובילה לנזקים רבים מבחינה חקלאית. נשירת פירות, פרחים ועלים ומהווה גורם מגביל הן ברמה הגידולית והן במהלך האחסון של תוצרת חקלאית טרייה לאחר הקטיף. נשירת פרחים/חנטים משפיעה על כמות היבול ואיכותו, ומואצת עקב עקה סביבתית. לדוגמא טמפרטורות קיצוניות הנגרמות עקב שרב כבד או לילות קרה מובילות לנשירה משמעותית של פרחים או חנטים/פירות צעירים. נשירה זו גורמת לנזק כלכלי כבד ועלית מחירים בשווקים. נשירת עלים או פירות לאחר הקטיף ובאחסון מואצת לעיתים קרובות עקב עקות להן נחשפים הפירות או הירקות לאחר הקטיף כגון קור, יובש או פליטת אתילן. לדוגמא נשירה מהאשכול של פירות עגבנייה מזני צ'רי או ניתוק של תפרחות בפרחי קטיף [2, 3]. לכן יש משמעות חקלאית רבה לפיתוח גישות להאטת תהליך הניתוק. יחד עם זאת בגידולים מסוימים יש חשיבות רבה דווקא להחלשת הקשר בין האיבר לצמח במועד המתאים וזאת על מנת לאפשר קטיף יעיל יותר או ממוכן המוביל לחסכון בידיים עובדות. לנושא זה יש לדוגמא חשיבות בזיתים, על מנת לאפשר מסיק יעיל, או בהדרים על מנת לאפשר קטיף ממוכן [4, 5]. זירוז ניתוק העלים דרוש גם הוא לעיתים כמו בכותנה בה יש צורך להשרות את שילוח העלים לפני איסוף ההלקטים. לפיתוח גישה ביוטכנולוגית אשר תאפשר בקרה על תהליך הניתוק יש על כן חשיבות חקלאית רבה בגידולים שונים. תפקיד מרכזי בתהליך הנשירה ממלאת רקמת הניתוק הייחודית בה מתבצעת הפרדה בין שתי שכבות תאים ספציפיות לאחר פירוק הקשרים הבין-תאיים באמצעות אנזימים הידרוליטיים ובמיוחד פוליגלקטורונאז וצלולאז [6]. הניתוק מושרה בד"כ על ידי אתילן, אולם עצמת הנשירה ומהירותה תלויים ביחס בין אתילן ואוקסין באזור הניתוק [2]. הרגישות לאתילן ברקמת הניתוק עולה כאשר ריכוז האוקסין יורד, וע"י כך מתאפשרת תגובה יעילה לאתילן הנחשב לאחראי להפעלת גנים המעורבים בתהליך הניתוק. בשנים האחרונות תוצאות חקר תהליך הניתוק (abscission), ולימוד תהליך התבקעות התרמילים והשתחררות הזרעים (dehiscence), המהווה גם סוג של תהליך ניתוק, מציעים שיתכן וקיימת חפיפה בין שני תהליכים אלו [3]. לכן יתכן שמניפולציה ביוטכנולוגית של תהליך הנשירה תוכל להיות מיושמת גם לעיכוב תהליך התבקעות התרמילים שכן במספר גידולים התרחשות מוקדמת מידי של תהליך זה יכולה להוביל לאובדן עשרות אחוזים ביבול.

במסגרת מחקר שבצענו ללימוד תפקיד הריבונוקליאז LX בעגבנייה יצרנו צמחים טרנסגניים בהם ביטוי LX עוכב. אפיון 3 קווים טרנסגניים הראה ש-LX ממלא תפקיד מרכזי וייחודי בתהליך הניתוק. נמצא שתהליך ניתוק העלים והפסיגים שהושרה ע"י הסרת הטרף (סילוק מקור האוקסין להחשת ניתוק הפטוטרט) עוכב משמעותית בצמחים הטרנסגניים יחסית לזן הבר, עם או בלי חשיפה לאתילן [4]. לדוגמא נמצא ש-20 יום לאחר הסרת הטרף 100% מהפטוטרות של צמחי זן הבר נשרו, לעומת נשירה של 25-40% מהפטוטרות של הקווים הטרנסגניים (איור 1). ביטוי גבוה וספציפי של הגן LX נמדד ברקמת הניתוק בעלים ובפירות, ממצא התומך במעורבותו בתהליך הניתוק. תוצאות הניסויים שערכנו במסגרת מחקר זה מוסיפות ידע משמעותי לגבי קיומו של תהליך מוות מתוכנן ברקמת הניתוק בצמחים ומעורבותו של הריבונוקליאז LX שנראה כי ממלא תפקיד מפתח החיוני להשלמת הנשירה.

2.1. מטרות המחקר: המטרה המרכזית של המחקר היא בחינת אפשרות השימוש במניפולציית ביטוי הגן המקודד לריבונוקליאז LX ככלי ביוטכנולוגי לעיכוב או זירוז נשירת פירות ופרחים בעגבנייה כמערכת מודל. במקביל לניסויים המיועדים ליצירת צמחים טרנסגניים בהם יהיה עיכוב משמעותי של LX ואשר בהם יהיה ניתן לבדוק את ההשפעה על פנוטיפ הניתוק בוצעו ניסויים נוספים שמטרתם מצד אחד להבין טוב יותר את תהליך הניתוק וזאת לאור הממצאים החדשים שהתגלו במחקר זה ובמיוחד מחקר להבנת תפקידו של LX בתהליכי מוות.



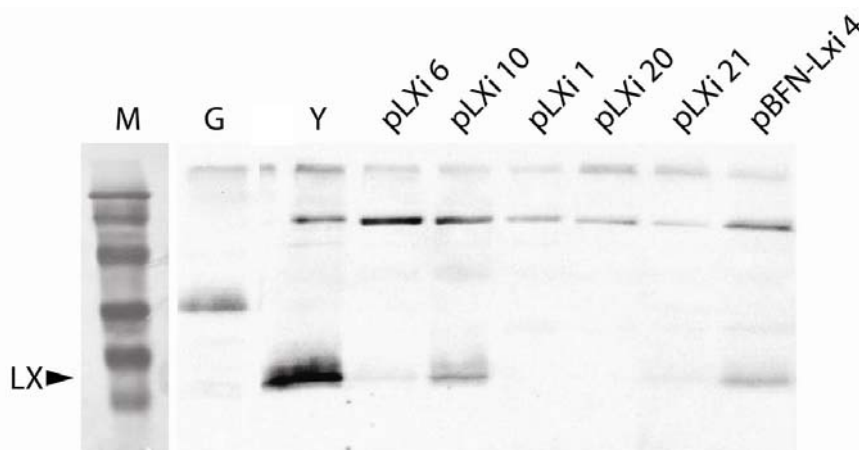
1. איור 1. נשירת פטוטרות העלה השישי בצמחי עגבנייה מזן הבר VF36 (עמודה שחורה) לעומת הצמחים הטורנסגניים בהם ביטוי *LX* עוכב. אחוז הפטוטרות הנושרות עבור כל קו טרנסגני נמדד במועדים שונים לאחר הסרת הטרף (שגרמה להשראת תהליך הניתוק) ומבוטא כאחוז מצטבר מכלל הפטוטרות (כ- 10 עבור כל קו).

3. פירוט עיקרי הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו לתקופת הדו"ח כולל דיון מטרה עיקרית במחקר זה היתה להכין צמחי עגבנייה טרנסגניים בהם תתקבל השתקה יעילה של הגן המקדד לריבונוקליאז *LX* וזאת על מנת לבחון את אפשרות קבלת דחייה משמעותית עוד יותר של תהליך הניתוק בהשוואה לזו שנצפתה בצמחים הטורנסגניים הקיימים. צמחים טרנסגניים אלו בהם נערך המחקר עד עתה פותחו באמצעות טכנולוגיית אנטיסנס שאינה מאפשרת קבלת השתקה יעילה מספיק של ביטוי הגן האנדוגני ל-*LX*. היבט נוסף הוא אופן הבקרה של השתקת *LX*. בצמחי העגבנייה הטורנסגניים הקיימים הבקרה היא באמצעות הפרומוטור הקונסטיטוטיבי *35S* ואינה ספציפית לרקמות הרצויות. על כן בצענו את השתקת ביטוי של *LX* באמצעות טכנולוגיית ה-*RNAi* שהינה יעילה יותר וכן עשינו שימוש בפרומוטור ספציפי שבודד מהגן *BFNI* אשר יבקר את הפעלת מערכת ההשתקה לאזור הניתוק. במחקר מקדים הראנו ספציפיות זו של פעילות פרומוטור זה בעגבנייה [5].

3.1. ניסויי טרנספורמציה ליצירת צמחי עגבנייה טרנסגניים בהם ביטוי *LX* מעוכב באמצעות *RNAi*

הוכנו הווקטורים המתאימים והחילונו בכיצוע ניסויי טרנספורמציה. לאחר ניסויים ממושכים שבוצעו במעבדה התקבלו מספר צמחים טרנסגניים אולם במספר קטן ועל כן פנינו לד"ר משה ראובני אשר במעבדתו דליה אבנור מתמחה בהכנת צמחים טרנסגניים כדי לבצע כשרות תמורת תשלום את עבודת הכנת הצמחים הטורנסגניים. בוצעו מספר סבבי טרנספורמציות תוך שימוש בשני סוגי הווקטורים להשתקה בטכנולוגיית *RNAi* של *LX*. מהניסויים עם הווקטור pBFN-Lxi המבוקר באמצעות הפרומוטור של הגן *BFNI* מארבידופסיס [5], התקבלו סה"כ 22 צמחים טרנסגניים על פי עמידותם לאנטיביוטיקה ואנליזת PCR לבחינת קיום מאורע טרנספורציה בגנום. ב- 7 צמחים בוצעה כבר אנליזת western לבחינת רמת החלבון *LX* המיוצר בהם, כמדד למידת עיכוב ביטוי הגן האנדוגני, נמצא שב 3 צמחים יש רמה נמוכה בצורה משמעותית של *LX* יחסית לרמה בזן הבר בתנאי השראת הביטוי בהזדקנות העלה. מהניסויים בהם נעשה שימוש בווקטור pLXi בו בקרת הביטוי מתבצעת על ידי הפרומוטור הקונסטיטוטיבי *35S* התקבלו סה"כ 34 צמחים טרנסגניים על פי עמידותם לאנטיביוטיקה ואנליזת PCR. ב- 26 מהצמחים בוצע כימות רמת הביטוי של *LX* ונמצאו עד כה

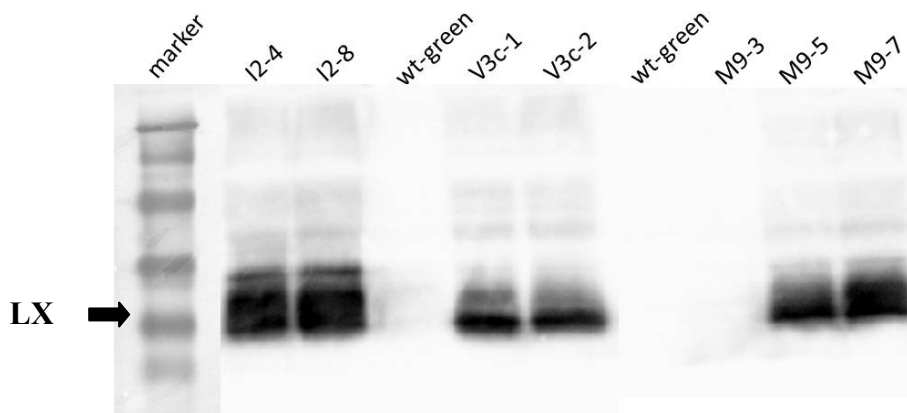
13 צמחים בהם הביטוי נמוך בצורה משמעותית יחסית לזן הבר. דוגמא לאנליזת western לכימות רמת ביטוי LX בטרנסגנים השונים מוצגת באיור 2. כדי לקבל צמחים המיוצבים גנטית להשתקת הביטוי גודלו צמחי T1 וצמחים אלו ישמשו בזמן הקרוב לביצוע אנליזות ראשוניות לבחינת ההשפעה הפנוטיפית של השתקת LX.



איור 2. כימות רמת החלבון LX בקווי עגבנייה טרנסגניים בהם ביטוי הגן המקודד עוכב באמצעות RNAi. מיצוי חלבונים מעלים בשלב הזדקנות מתקדם, בו יש ביטוי גבוה של LX בזן הבר, הופקו מצמחים טרנסגניים שונים ומזן הבר (Y). בנוסף הופקו חלבון מעלה ירוק של זן הבר בו אין כמעט ביטוי של LX (G). החלבונים הופרדו בגל PAGE ובוצעה אנליזת Western תוך שימוש בנוגדן ספציפי לחלבון LX. M, סמן גודל מולקולרי לחלבונים.

3.2. זיהוי צמחי עגבנייה טרנסגניים בהם ביטוי LX מוגבר.

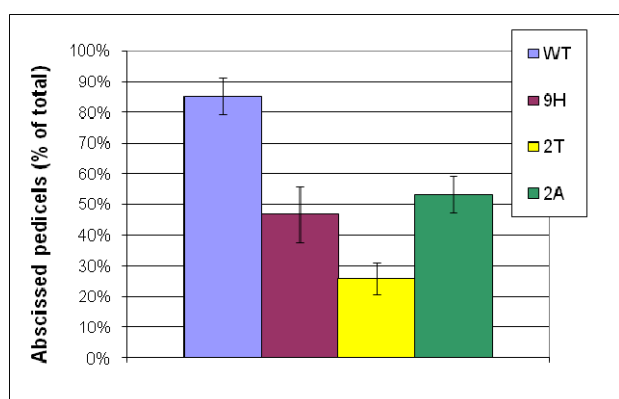
כחלק מהמחקר ללימוד תפקיד הריבונוקליאז בוצע מחקר לאיפיון ההשפעה של ביטוי ביתר על הפנוטיפ ובמיוחד בחינת השאלה האם ביטוי ביתר כזה יכול לגרום להאצת תהליכי ניתוק. בוצע איפיון של מספר צמחים טרנסגניים בהם הגן LX בוטא בהם תחת הפרומוטור הקוסטיטוטיבי 35S. כדי לזהות צמחים אלו בוצעה אנליזת western של כלל החלבונים ממיצוי עלים ירוקים, בהם באופן נורמלי אין השראת ביטוי של LX, למדידת רמת LX. במסגרת ניסויים אלו זוהו מספר צמחים בהם היה ביטוי גבוה מאוד וקונסטיטוטיבי של הגן LX והתוצאות מוצגות באיור 3. באיפיון ראשוני לא נראו השפעות פנוטיפיות משמעותיות בצמחים אלו אשר נראו דומים לזן הבר. אולם עדיין לא בוצעו ניסויים מפורטים לבחינת ההשפעה על תהליך הניתוק בצמחים טרנסגניים אלו.



איור 3. כימות רמת החלבון בקווי עגבנייה טרנסגניים בהם הגן LX מבוטא ביתר. מיצוי חלבונים מעלים ירוקים, בו אין ביטוי של LX בזן הבר, הופקו מצמחים טרנסגניים שונים ומזן הבר (wt-green). החלבונים הופרדו בגל PAGE ובוצעה אנליזת Western תוך שימוש בנוגדן ספציפי לחלבון LX.

3.3. בחינת השפעת עיכוב ביטוי הגן *LX* בצמחי עגבנייה טרנסגנים קיימים בהם יש רק עיכוב ביטוי חלקי של הגן

באפיון הצמחים הטרנסגניים בהם עוכב ביטוי *LX* באמצעות אנטיסנס הודגם עיכוב משמעותי של נשירת העלים בעגבנייה. במחקר שבוצע התמקדנו בהמשך אפיון צמחים אלו לבחינת ההשפעת העיכוב על נשירת פרחים על מנת לבחון את ההשפעה ברקמת הניתוק של הפרח. קצב נשירת פרחים בעקבות השראת התהליך הושווה בין צמחי זן הבר, VF36, לבין שלשת קווי העגבנייה הטרנסגניים. השראה לנשירת העוקץ בפרחים על גבי הצמח בוצעה על-ידי הסרת הפרח באזור העוקץ, בסמוך לבסיס הפרח באמצעות סכין גילוח. על אזור הפציעה נמשח בזהירות חומר "מגן 2001" למניעת איוד מהרקמה. יום לפני שניסויי נשירת פרחים תוכננו להתבצע הוסרו כל הפרחים הפתוחים שהיו על גבי הצמחים, כך שהפרחים ששימשו לניסויים היו רק אלו שנפתחו ביממה האחרונה וזאת בכדי להבטיח כי הפרחים נמצאים בשלב התפתחותי דומה.



איור 3. השפעת עיכוב ביטוי הגן לריבונוקליאז *LX* על תהליך הניתוק בפרחים. צמחי זן הבר VF36, ושלוש הקווים הטרנסגנים (A2, T2, H9) גודלו באדמה עם דישון אופטימלי. הניסוי בוצע בצמחים בני 11 שבועות. הוסרו 60, 66, 30, 34 פרחים לצורך השראת נשירה מהקווים VF36, T2, A2, H9, בהתאמה ולאחר 24 שעות נספרו גבעולי העוקץ שנשרו. התוצאות מובאות כאחוז גבעולי העוקץ שנשרו מכלל הפרחים שהוסרו בכל אחד מהקווים \pm שגיאת תקן.

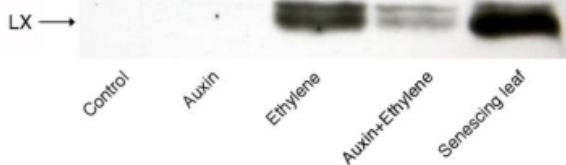
כבר לאחר 5 שעות ממועד השראת תהליך הניתוק נמדד עיכוב מסוים של התהליך בצמחים הטרנסגנים (תוצאות לא מוצגות). במועד זה נשרו כ- 10% מגבעולי העוקץ של צמחי זן הבר וכ- 6% מגבעולי העוקץ של הקווים T2 ו-H9 ואילו בקו A2 לא הייתה כל נשירה. ההבדלים היו עוד יותר ניכרים בניסויים בהם המדידה נעשתה 24 שעות לאחר הסרת הפרח (איור 2). בעוד שבצמחי זן הבר נמדדה לאחר פרק זמן זה נשירה של כ- 85% של גבעולי העוקץ, בקווים הטרנסגנים A2, T2, H9 נמדדה נשירה של 47%, 26%, 53% בהתאמה (איור 3). תוצאות דומות לאלו שמוצגות חזרו על עצמן בניסויים נוספים ובלתי תלויים. ניסויים אלו מראים שבצמחים הטרנסגנים בהם יש עיכוב בביטוי *LX* מתקבלת דחייה משמעותית של תהליך ניתוק פרחים לאחר השראת התהליך בדומה לזה שנצפה בתהליך ניתוק העלים. במקביל בוצעו ניסויים על מנת לבדוק אם החלבון ריבונוקליאז *LX* מתבטא ברקמות ניתוק של פרחים והאם יש הבדל ברמתו בין צמחי זן הבר לטרנסגניים. בניסויים אלו נמצאה עלייה משמעותית ברמת החלבון ברקמת הניתוק כשהיא נמוכה באופן משמעותי ברקמות מהצמחים הטרנסגנים לעומת זן הבר (תוצאות לא מובאות) בדומה למה שנמצא ברקמת הניתוק של עלי העגבנייה ממצאים אלו תומכים בתפקיד דומה של *LX* בשני סוגי רקמות הניתוק בעלה ובפרח.

3.4. תבנית ביטוי החלבון *LX* בתגובה למתן ההורמונים הצמחיים אתילן ואוקסין

על-פי המודל המקובל כיום היחס בין רמות שני ההורמונים אוקסין ואתילן הוא בעל חשיבות להשראת והתקדמות תהליך הניתוק. המודל מציע שככל שרמת האוקסין יורדת, רקמות הניתוק הופכות רגישות יותר לאתילן, אשר עליה ברמתו חשובה להחשת וביצוע תהליך הניתוק. על-מנת לבחון האם ביטוי הגן *LX* תואם לתפקידם המוצע של ההורמונים אוקסין ואתילן בתהליך הניתוק, נבדקה השפעת ההורמונים אלו על רמת החלבון *LX*. לצורך כך ביום ביצוע הניסוי נאספו עלים ירוקים מצמחי זן הבר שגדלו בתנאים אופטימליים והעלים המנותקים הועברו להדגרה בתמיסה המכילה אוקסין 2,4-D)

200µM) או לתמיסת ביקורת למשך 25 דקות. לאחר ספיגת שאריות התמיסה משטח פני העלים המנותקים הם הועברו להדגרה באוויר לח למשך 24 שעות, ולאחר מכן נחשפו לטיפול אתילן (5 ppm) באוויר המוזרם, למשך 48 שעות. במקביל העלים של טיפול הביקורת המשיכו להיות מטופלים באוויר בלבד. בתום הניסוי נלקחו דוגמאות מהעלים לצורך הפקת חלבון ומדידת רמת LX באמצעות Western (איור 4).

Auxin	-	+	-	+	-
Air	72 h	72 h	24 h	24 h	-
Ethylene	-	-	48 h	48 h	-



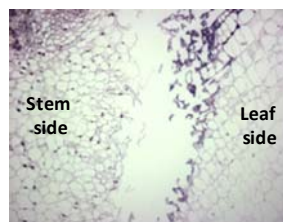
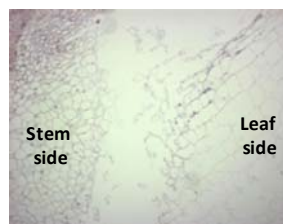
איור 4. רמת ביטוי החלבון ריבונוקליאז LX בעלה בתגובה לטיפול בהורמונים אוקסין ואתילן.

עלי עגבנייה צעירים ומנותקים מזן הבר (VF36) נחשפו לטיפול אוקסין (Auxin), אתילן (Ethylene), טיפול משולב של אוקסין ואתילן (Auxin + Ethylene) וטיפול ביקורת של אוויר בלבד (Control) כפי שתואר. לאחר הטיפולים הופקו חלבונים מהעלים השונים (10 µg) והם שימשו לאנליזת Western למדידת LX. כביקורת לזיהוי החלבון LX שימשה דגימת חלבון מעלה זקן (Senescing leaf).

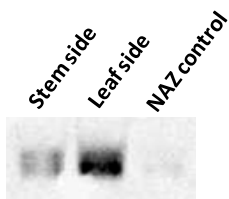
החלבון LX, שביטוי לא זוהה כלל בעלים צעירים שאינם מטופלים בהורמונים, עולה ברמתו באופן ניכר לאחר הטיפול בהורמון אתילן, שנמצא בעבר כגורם להשראה חזקה של ביטוי הגן LX ברמת ה-RNA. טיפול מקדים באוקסין לבד אינו משפיע כלל על רמת LX, אולם כאשר העלה טופל באוקסין לפני חשיפתו לאתילן, התקבלה הפחתה משמעותית ברמת LX לעומת טיפול האתילן בלבד. כלומר חשיפה מוקדמת לאוקסין גרמה לעיכוב ביכולת האתילן לגרום להשראת עליה ברמת LX (איור 4). תגובה זו של החלבון LX לטיפול בהורמונים תואמת את ההיפותזה שהחלבון מעורב בתהליך הנשירה, על פי המודל המקובל לגבי תפקידי אוקסין ואתילן בתהליך הנשירה.

3.5. מיקום האזור ברקמת הניתוק בו מתרחש תהליך המוות ובו יש ביטוי של הגן LX

על מנת ללמוד בפירוט את המאורעות המתרחשים באזור הניתוק ובהם מעורב הרנאז LX ביצענו בשלב ראשון אנליזת TUNNEL המאפשרת זיהוי אזורים בדנ"א בגרעינים אשר הינו בעל קצוות חשופים ולכן סביר שעבר ביקוע נוקליאוטי



LX antibody



LX western blot analysis

כחלק מהמאורעות המתרחשים בעת קיום מוות מתוכנת. אנליזה זו בוצעה בשיתוף עם מעבדתה של Prof. Marina Dermastia ותוצאותיה העידו על קיום סמנים חיוביים להתרחשות תהליך נוקליאוטי זה במיוחד בצידו הדיסטלי של אזור הניתוק הפונה לכיוון העלה שינתק מהצמח האם במסגרת תהליך הניתוק (תוצאות לא מובאות). ממצא מעניין זה הוביל אותנו למחשבה שכל תהליך המוות מתרחש בצידו הדיסטלי בלבד של אזור הניתוק ועל כן בצענו ניסויים על מנת לבחון את ההיפותזה שבמקביל לחוסר הסימטריה בהתרחשות תהליך המוות באזור הניתוק גם דגם ביטוי של LX יתאים לממצא זה. ואמנם באנליזות שבוצעו הן על ידי צביעה אימונולוגית והן תוצאות למדידת רמתו של חלבון ה-LX נמצא שחלבון זה מצטבר בעיקר בצד הדיסטלי של אזור הניתוק (איור 5). ממצא זה מחזק עוד יותר את ההיפותזה שלרנאז LX יש תפקיד מרכזי בתהליך המוות המתוכנת המתרחש וכנראה דרוש לצורך השלמה של תהליך הניתוק.

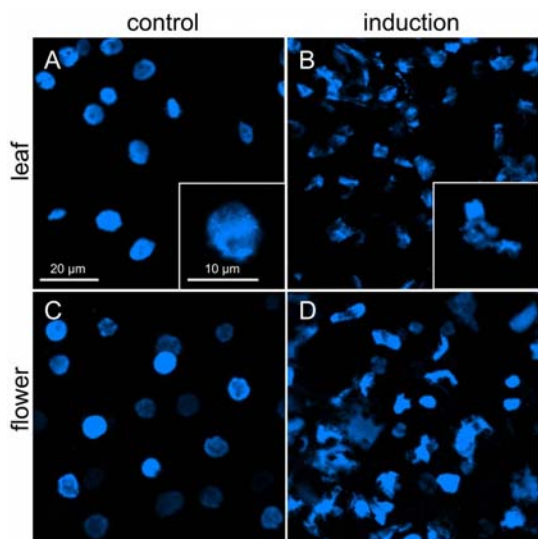
איור 5. החלבון LX מצטבר בעיקר בצד הדיסטלי של רקמת הניתוק.

זיהוי מיקומו של החלבון LX התבצע על ידי אנליזה מיקרוסקופית וצביעה אימונולוגית של אזור הניתוק של עלה עגבנייה בשלב מתקדם של תהליך הניתוק. הצביעה נעשתה על ידי

שימוש בנוגדנים מ- pre-immune serum כביקורת שלילית (A) או בסרום המכיל נוגדנים ל-LX (B) אשר זיהו את החלבון רק בצידו הדיסטלי של אזור הניתוק ולכיוון העלה. אנליזת western בוצע תוך שימוש במיצוי חלבוני שהופק בנפרד מהרקמה משני צידי אזור הניתוק, הדיסטלי (leaf side) והפרוקסימלי (stern side) או מרקמת ביקורת על גבי העוקץ שאינה מכילה את רקמת הניתוק (NAZ control).

3.6. עדויות נוספות לקיום מוות מתוכנת ברקמת הניתוק בעגבנייה.

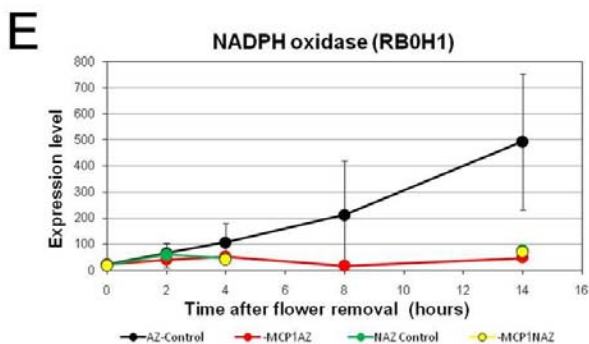
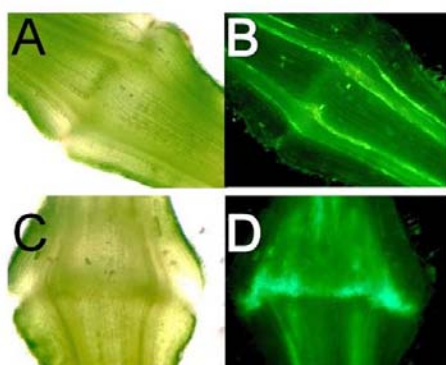
בוצעו ניסויים נוספים שמטרתם לבחון אם ניתן לראות סמנים נוספים שימתכו בהיפותיזה שמתרחש תהליך מוות מתוכנת ברקמת הניתוק בעקבות השראת התהליך. במספר רב של מערכות בהן הוכח קיום מוות מתוכנת אחד המאפיינים היה שינוי במורפולוגיית הגרעינים שצורתם הנורמלית עגולה ורגולרית לעומת קיום צורה מעוותת ולעיתים דחוסה בעת



התרחשות המוות. רקמת ניתוק שהופרדה ושני צדדיה נותקו בשלבים המאוחרים לאחר השראת התהליך (induction) או ללא כל השראה של התהליך (control) נצבעה בצבען הצובע את החומצות הגרעיניות בגרעין DAPI וצורת הגרעינים נצפתה וצולמה במיקרוסקופ קונפוקלי (איור 6). תצפיות אלו הראו בבירור שינוי בצורת הגרעינים עם התרחשותו של תהליך הניתוק ובשלביו המתקדמים בו על פי ממצאינו יש עליה בביטוי של LX והתרחשות תהליך המוות המתוכנת.

איור 6. גרעיני תאים ברקמת הניתוק של פרה ועלה לאחר צביעה בצבען DAPI עם או ללא השראת תהליך הניתוק.

סמן נוסף להתרחשות תהליך המוות הוא עליה ברמת צורוני חמצן פעילים. לצורך בחינת השינוי ברמת צורונים אלו ברקמת הניתוק בוצעה צביעה של התאים באזור רקמת הניתוק באמצעות הצבען הפלואורוסנטי 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF) אשר בנוכחות צורוני חמצן פעילים זוהר ברמה גבוהה יותר. צביעה זו

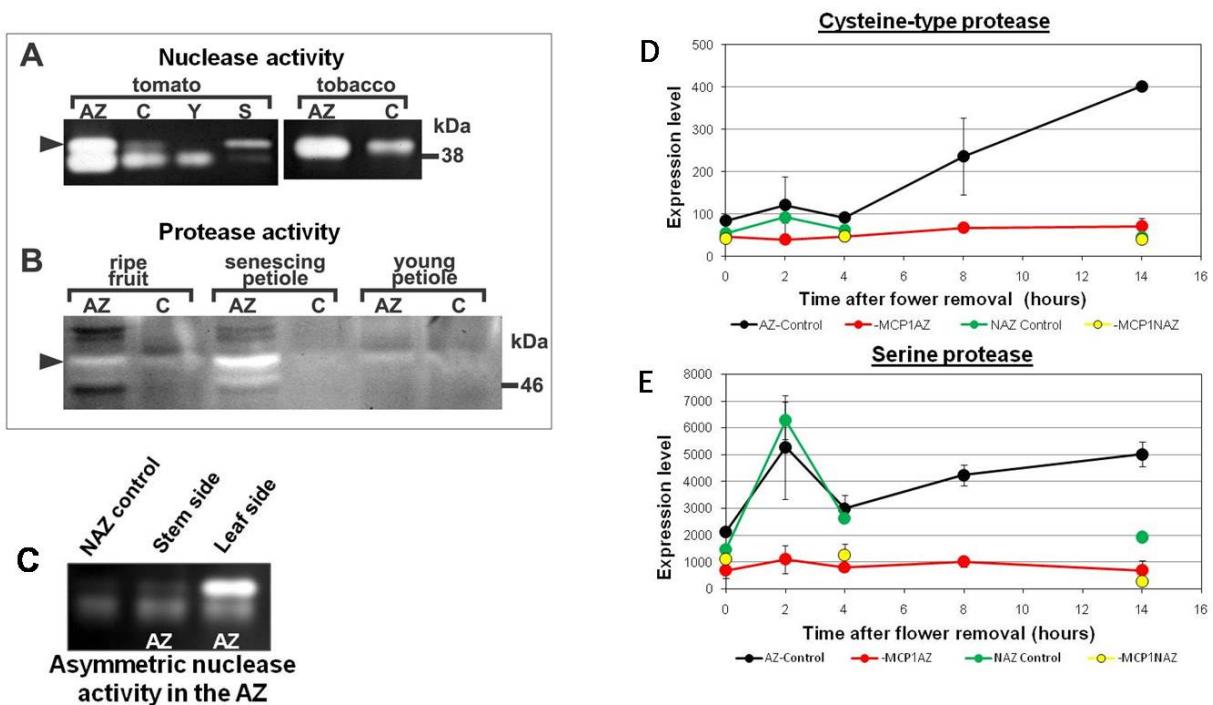


איור 7. הצטברות צורוני חמצן ועלייה בביטוי הגן המקודד ל NADPH oxidase ברקמת הניתוק. רקמת ניתוק לפני (A, B) ואחרי (C, D) השראת התהליך צולמה באור נראה (A, C) או במיקרוסקופ פלואורוסנטי לאחר צביעה ב- DCF (B, D). רמת ביטוי הגן NADPH oxidase על פי אנליזת מיקרואררי ברקמת ניתוק (שחור, AZ control) או ברקמת ביקורת לידה על העוקץ (ירוק, NAZ control) והשפעתו המעכבת של טיפול מקדים במעכב חישת אתילן 1-MCP למניעת השפעת ההורמון (אדום, MCP1AZ).

הראתה שלאחר השראת תהליך הניתוק ניתן להבחין בקיום רמת צורוני חמצן פעילים גבוהה יותר בצורה משמעותית (איור 7). בנוסף נבדקה רמת הביטוי של הגן המקודד לאנזים NADPH oxidase אשר מעורב ביצירת צורוני חמצן במערכות שונות כולל בצמחים [6]. רמת הביטוי של הגן RBOH1 המקודד לאנזים זה נמצאה על פי תוצאות אנליזת מיקרואררי

שבוצעה במעבדתו של ד"ר שמעון מאיר ומוצגת באיור 7 הראתה עלייה משמעותית וספציפית באזור רקמת הניתוק דבר המתאים לעלייה שנצפתה ברמת צורני החמצן ברקמה זו.

במערכות רבות הן בצמחים והן באורגניזמים אחרים התרחשות תהליכי מוות מתוכנת מלווים בעליה בפעילות פרוטאזות ונוקליאזות שמשותפים במערכת הבקרה או הביצוע של תהליך המוות כדוגמת הנוקליאז BFN1 שהראנו לאחרונה שמופעל בתהליכי מוות התפתחותיים בארבידופסיס [5]. בנוסף הראנו בעבודה זו שהפרומוטור לגן זה מפעיל גן מדווח באופן ספציפי ברקמת ניתוק בעגבנייה לאחר השראת התהליך ובשלביו המתקדמים. תצפית זו גם תומכת בהיפותיזה שתהליך מוות מתוכנת מתרחשת כחלק מתהליך הניתוק. על מנת לבחון אם ניתן לזהות פעילויות פרוטאוליטיות או נוקליאוליטיות המושרות ברקמת הניתוק או הפעלה של גנים המקודדים לאנזימים כאלו בוצעו אנליזות פעילות בג'ל לאחר הפרדה אלקטרופורטית של כלל החלבונים שמוצו מרקמת הניתוק. במקביל על מנת לזהות שינוי בביטוי גנים רלוונטיים נסקרו תוצאות אנליזת המיקרואררי שבוצעה במעבדת ד"ר מאיר לזיהוי גנים שביטויים עולה ומקודדים לפרוטאזות או נוקליאזות. התוצאות המובאות באיור 8 מדגימות עלייה ספציפית ברקמת הניתוק בפעילות של פרוטאז ונוקליאז וכן עלייה בביטוי של גנים המקודדים לפרוטאזות ממשפחות שונות, cysteine protease ו-serine protease.



איור 8. עלייה בפעילות נוקליאז ופרוטאז ובביטוי גנים המקודדים לפרוטאזות ברקמת הניתוק לאחר השראת התהליך. אנליזת פעילות בג'ל המוצגת ב- A, B, C, בוצעה תוך שימוש בכלל החלבונים שמוצו מרקמת הניתוק (AZ), רקמת ביקורת מהעוקץ בסמוך לה (C or NAZ control), וכביקורת מעלה זקן (S) או צעיר (Y). רמת ביטוי שני גנים המקודדים לפרוטאזות על סמך אנליזת מיקרואררי מוצגות (D,E). סימונים בגרפים המציגים את ביטוי הגנים לפי המוסבר באיור 7.

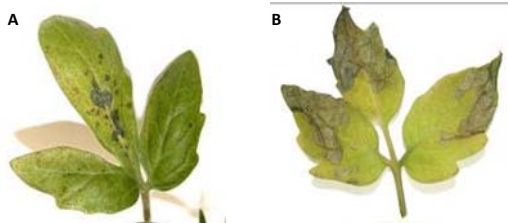
אחד הממצאים המעניינים היה שפעילות הנוקליאז שזוהתה היתה גבוהה בעיקר בצד הדיסטאלי של רקמת הניתוק, בצידו החשוף של פטוטר העלה הנושר (איור 8C) ממצא הנמצא בקנה אחד עם תצפיותינו לגבי התרחשות תהליך המוות המתוכנת וביטוי LX באזור זה של רקמת הניתוק

3.7. מעורבות הגן לריבונקליאז LX בתהליכי מוות המופעלים בתנאי הרעבה לזרחן

ממחקרים קודמים ידוע שביטוי הגן LX כמו ריבונקליאזות נוספות, עולה במהלך חשיפת צמחים או תאים בתרבית להרעבה לזרחן. ההשערה היא של-LX תפקיד במיחזור זרחן בתנאים של מחסור במינרל. לבחינת השפעה של עיכוב ביטוי LX על התפתחות הצמחים בתנאי מחסור לזרחן נערכו ניסויים מתאימים, אולם עד כה בניסויים אלו בהם השוו הצמחים הטרנסגנים לצמחי זן הבר לא קיבלנו תוצאות ברורות המצביעות על פנוטיפ כתוצאה מביטוי נמוך של LX. יחד עם זאת כאשר חשפנו צמחונים תוך שימוש במערכת הידרופונית לתנאי מחסור לזרחן, הבחנו בהתפתחות נקרוזות ותמותה של תאים על גבי העלים כתוצאה מההרעבה לזרחן. הבדל ברור נראה במידת התפתחות הנקרוזות בין הצמחים הטרנסגנים בהם עוכב LX לבין צמחי זן הבר. כיוון שהתוצאות עד עתה תמכו במעורבות של LX בתהליכי מוות החלטנו להמשיך ולבחון את השפעת דיכוי ביטוי על התפתחות נקרוזות ותמותת תאים בתנאי הרעבה לזרחן.

התפתחות נקרוזות בהרעבה לזרחן בצמחי זן הבר

גידול צמחים בתנאים הידרופוניים מאפשר גידול בתמיסה תוך החסרה מלאה של מינרל יחיד החיוני להתפתחות תקינה של הצמח. גידול כזה יגרום להחרפה של התופעות הנגרמות כתוצאה ממחסור באותו מינרל. בניסויים שערכנו גודלו תחילה נבטים במשך כחודש ימים במצע פרלייט עם השקיה בתמיסת מזון מלאה על-מנת לאפשר התפתחות התחלתית טובה של הצמחים, לאחר מכן הם הועברו לגידול הידרופוני בתמיסה חסרת זרחן (כפי שמתואר בפרק השיטות). בתנאי גידול אלו נצפו הבדלים התפתחותיים בין צמחי זן הבר שגדלו בתמיסת מזון מלאה, לבין צמחים שגדלו בתמיסה ללא זרחן. בצמחים שגדלו ללא זרחן נצפה עיכוב בגדילה. בנוסף לאחר כ- 10 ימים של גידול בתמיסה חסרת הזרחן זיהינו קיום מוות תאי שהתבטא בצורת נקרוזות שחורות. אלא הופיעו תחילה בנקודות ממוקדות על-גבי העלה, המשיכו להתפתח כך שחלקים גדולים של העלה מתו, עד שהוא נשר (איור 9). עלים בוגרים פיתחו את תופעת מות התאים מוקדם יותר מעלים צעירים. תופעה זו לא נצפתה כלל בצמחי הביקורת שגדלו בתמיסת המזון המלאה.



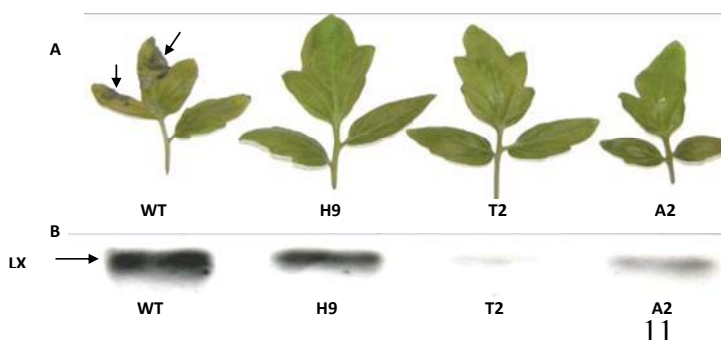
איור 9. שלבים שונים של התפתחות נקרוזות בעלי עגבנייה מצמחים שגדלו במצע הידרופוני חסר זרחן. עלה בשלב מוקדם של התפתחות נקרוזה (A), עלה בשלב מתקדם של התפתחות נקרוזה (B)

השפעת עיכוב ביטוי LX על התפתחות הנקרוזות בהרעבה לזרחן

כאשר גידול הצמחים בוצע במערכת הידרופונית עם תמיסת מזון מלאה, לא נראו הבדלים בהתפתחות הצמחים הטרנסגנים לעומת צמחי זן הבר. אולם כאשר נחשפו צמחי זן הבר והצמחים הטרנסגנים לתנאי מחסור בזרחן, נמצא שהצמחים המעוכבים בביטוי LX, מפתחים את הנקרוזות בשלב מאוחר יותר באופן מובהק לעומת צמחי זן הבר. התופעה מומחשת באיור 6 בה מצולמים עלים מייצגים מאותה עמדה על הצמח מצמח זן הבר (VF36) ושלושת הקווים הטרנסגניים (A2, T2, H9) 14 ימים לאחר ההעברה לגידול הידרופוני. רמת החלבון LX בעלים שגדלו 8 ימים בתנאי מחסור בזרחן נבחנה

באנליזת Western על-מנת לבחון את מידת עיכוב ביטוי הגן בתנאים אלו של מחסור בזרחן בצמחים הטרנסגנים לעומת זן הבר (איור 10).

איור 10. התפתחות נקרוזות בתנאי הרעבה לזרחן בצמחים המעוכבים בביטוי ריבונקליאז LX לעומת צמחי זן הבר ורמת ביטוי החלבון LX בקווים השונים.

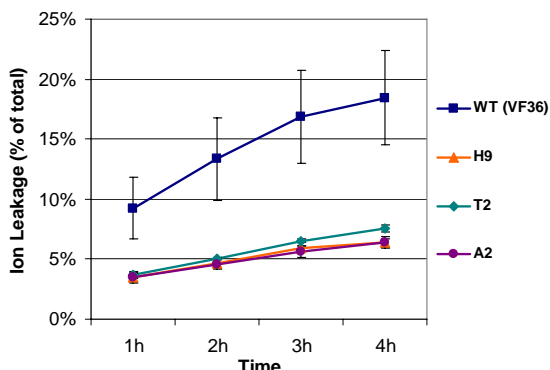


נבטים בגיל 25 יום של צמחי זן הבר (VF36) ושלושת הקווים הטרוסגנים (A2, T2, H9) שגדלו במצע מלא, הועברו לגידול הידרופוני במצע חסר זרחן. לאחר 14 יום צולמו עלים מייצגים מכל קו, כל העלים הם מעמדה ראשונה והחצים מצביעים על אזורי נקרוזה (A). אנליזת Western של חלבון מעלים מעמדה ראשונה של צמחים 8 ימים לאחר העברה לתמיסה הידרופונית חסרת זרחן ולפני התפתחות נקרוזות. חלבון (5 μg) הוטען על גבי הג'ל (B).

השפעת הרעבה לזרחן על זליגת יונים מהעלים

בכדי לבחון את האפשרות שניתן למדוד בצורה כמותית את השינויים ברקמות הצמח שמובילים לתמותת התאים עוד לפני התפתחות הנקרוזות בדקנו את השינויים בקצב זליגת היונים מתאי העלים באמצעות מד מוליכות. זליגת יונים מתאי הצמח החוצה בקצב גבוה נובעת משינויים מוקדמים במבנה הממבראנות או יציבותן [7]. במחקרים שונים נעשה שימוש בקצב זליגת היונים כמדד להתקדמות תהליכי מוות [8]. שינויים בקצב זליגת היונים נמדדו עבור צמחי זן הבר ושלושת הקווים הטרוסגנים. הצמחים הונבטו במצע פרלייט, תוך השקיה בתמיסת הזנה מלאה עד לגיל 26 יום ואז הועברו לגידול הידרופוני בתמיסת מזון חסרת זרחן. לאחר 10 ימים מתחילת ההרעבה נצפתה התחלה של היווצרות נקרוזות בצמחי זן הבר בעלים מעמדה ראשונה. ביום ה-12 לטיפול ההרעבה נאספו עלים מהעמדה השנייה על גבעול הצמח, בין העלים שנאספו היו גם כאלה שבהם כבר נראו לעין נקודות של היווצרות נקרוזות כתוצאה ממוות תאים. כל עלה הועבר לכלי שהכיל כמות קבועה של מים מזוקקים, ורמת מוליכות המים בכלי נמדדה כל שעה מתחילת ההדגרה למשך 4 שעות. לאחר תום המדידה הרקמה עברה טיפול באוטוקלב ורמת המוליכות כתוצאה משחרור כל היונים נמדדה. התוצאות מוצגות כאחוז היונים שזלגו לנוזל המימי מתוך כמות היונים הכללית של העלה.

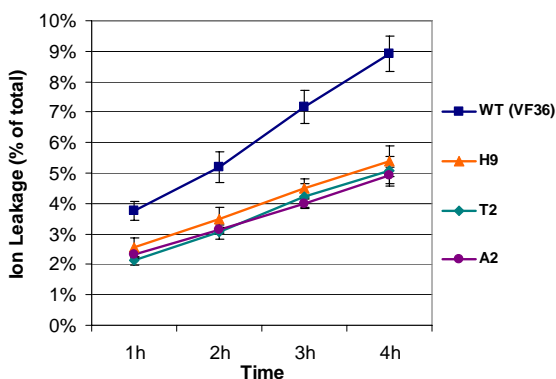
(איור 11).



איור 11. זליגת יונים בצמחי זן הבר ובצמחים הטרוסגנים בהשפעת הרעבה לזרחן. צמחי זן הבר (VF36) ושלושת הקווים הטרוסגנים (A2, T2, H9) שגדלו במצע מלא, הועברו לגידול הידרופוני במצע חסר זרחן. לאחר 12 יום נאספו עלים מעמדה שנייה, שבחלקם נצפתה התחלת היווצרות נקרוזות, והם שימשו למדידת זליגת יונים. כל נקודה מייצגת ממוצע של 3 מדידות (מ-3 עלים שונים) \pm שגיאת תקן.

בתנאי גידול של מחסור חריף לזרחן קצב זליגת היונים בעלים של הצמחים הטרוסגנים מואט באופן מובהק לעומת צמחי זן הבר, וזאת בהתאם לפנוטיפ של הופעת נקרוזות על גבי העלים. לדוגמא לאחר 4 שעות ממועד ניתוק העלים מצמח האם נמדדה זליגת יונים ממוצעת של 18.5% בצמחי זן הבר לעומת זליגת יונים ממוצעת של 6.7% בלבד בכל הקווים הטרוסגנים (איור 11).

ניסוי דומה בוצע על-מנת לבחון האם ניתן למדוד הבדלים בקצב זליגת היונים בין הקווים השונים עוד לפני השלב בו הנקרוזות כבר נראות ברקמת הצמחים. בניסוי זה נאספו עלים מעמדה שנייה על גבי הגבעול, בהם לא נראו סימני נקרוזות ביום ה-15 לטיפול ההרעבה לזרחן (איור 12).

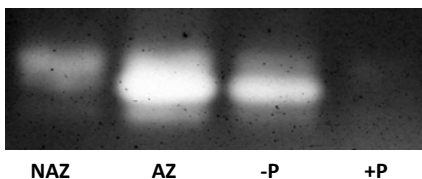


איור 12. זליגת יונים בצמחי זן הבר ובצמחים הטרוסגנים בהשפעת הרעבה לזרחן. צמחי זן הבר (VF36) ושלושת הקווים הטרוסגנים (A2, T2, H9) שגדלו במצע מלא, הועברו לגידול הידרופוני במצע חסר זרחן. לאחר 15 יום נאספו עלים מעמדה שנייה, שטרם נצפתה בהם התחלת היווצרות נקרוזות, והם שימשו למדידת זליגת יונים. כל נקודה מייצגת ממוצע של 5 מדידות (מ-5 עלים שונים) \pm שגיאת תקן.

כפי שנראה באיור 12 שינוי בקצב זליגת יונים מעלים שגדלים בהרעבה לזרחן מתרחש טרם הופעת הנקודות הנקרוטיות, כך שעליה בזליגת יונים מהתאים בתנאים אלו מהווה סמן מוקדם להתרחשות שינויים בממבראות התאים, אולי כתוצאה מתהליך מוות. חיזוק לכך מתקבל ממדידת ערכי זליגת יונים נמוכים יחסית בעלים שטרם נצפו בהם נקרוטיות בהשוואה לערכי זליגת יונים גבוהים יחסית בעלים שמציגים נקרוטיות. גם בניסוי זה התקבלה רמת זליגת יונים נמוכה באופן מובהק בצמחים הטרנסגנים לעומת צמחי זן הבר, הערכים שנמדדו לאחר 4 שעות הם 5% לעומת 9% בהתאמה (איור 12).

אנליזת פעילות נוקליאזות בעלי עגבנייה שגודלו בתנאי הרעבה לזרחן

בעקבות זיהוי התפתחות הנקרוטיות בעלי צמחים הגדלים בתנאי הרעבה לזרחן ועיכוב התפתחותן בצמחים הטרנסגנים בהם ביטוי *LX* עוכב, הועלתה ההשערה שנקרוטיות אלו הן תוצאה של השראת תהליכי מוות במהלך הגידול תחת עקת מחסור בזרחן וכי עיכוב ביטוי *LX* מביא להאטת תהליך מוות זה. בהמשך רצינו לבחון האם בתנאי הרעבה לזרחן מתרחשים תהליכים שמאפיינים תהליכי מוות. ממחקרים קודמים ידוע כי בעת תהליכי מוות מתוכנת של תאים מתרחשים תהליכי פירוק נמרצים של מרכיבי התא, הכוללים עליה בפעילות אנזימים הידרוליטיים, כדוגמת נוקליאזות אשר מפרקים חומצות נוקליאזות (DNA ו-RNA) ופרוטאזות המפרקים חלבונים. אכן הקשר בין עליה בביטוי נוקליאזות לבין תהליכי מוות בתא תואר בצמחים [9], בהתאם לכך ערכנו ניסוי על מנת לבחון האם יש השראה של פעילות נוקליאזות אשר יכולה לתמוך בקיום תהליכי מוות בתגובה למחסור חמור בזרחן. במקביל בחנו גם האם יש השראה של פעילות נוקליאזות ברקמות ניתוק פרחים לאחר השראה מלאכותית לנשירתם, לאור ההשערה כי גם שם מתרחש תהליך מוות מתוכנן. לצורך זיהוי פעילות הנוקליאזות נעשה שימוש בשיטת אנליזת פעילות בג'ל. בשיטה זו מבוצעת הפרדה אלקטרופורטית של החלבונים בג'ל המכיל סובסטרט (DNA). לאחר ביצוע הדגרה המאפשרת לאנזים בג'ל לפעול ולעכל את הסובסטרט ניתן לזהות את מיקום ורמת פעילות האנזים בעקבות צביעה ספציפית לסובסטרט. שטיפה עוקבת מאפשרת לזהות אזורים שלא נצבעים עקב העלמות הסובסטרט מהג'ל. לצורך ביצוע הניסוי מוצו דוגמאות חלבון מעלים של צמחי זן הבר (VF36) שגדלו בתמיסה הידרופונית עם או ללא זרחן. במקביל בוצעה האנליזה תוך שימוש בחלבונים שמוצו מרקמות ניתוק של פרחים בשלב סמוך לנשירה. מיקום ועוצמת הפעילות האנזימית של הנוקליאזות מיוצגים על-ידי האזורים הלבנים בג'ל, בהם התרחש עיכול של מולקולות ה-DNA ולכן אינם נצבעים (איור 13).



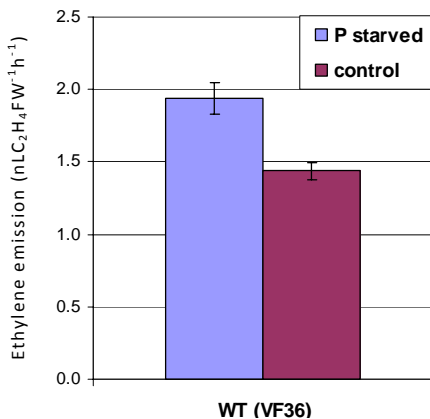
איור 13. אנליזת פעילות בג'ל של נוקליאזות המושרות בתגובה להרעבה לזרחן ובתהליך הניתוק לאחר השראת התהליך. דוגמאות חלבון מוצו מרקמות עלים של צמחי זן הבר (VF36). רקמות עלים מצמחים שגדלו בצורה הידרופונית על מצע מלא (+ P) או מצע חסר זרחן (- P); רקמות ניתוק של פרחים בשלב סמוך לניתוק (AZ); רקמות ביקורת מעוקצי הפרחים (NAZ). על הג'ל הוטענו 20 μ g חלבון כללי. החץ מסמן את מיקום הנוקליאז שפעילותו עלתה.

בתנאי הרעבה לזרחן יש עליה בפעילות נוקליאז ספציפית (בנד אמצעי המסומן בחץ) אשר אינו מושרה בטיפול הביקורת המכיל זרחן. עוד נראה כי נוקליאז זה הוא זהה מבחינת מיקומו בג'ל לנוקליאז שמושרה ברקמת הניתוק באופן ספציפי לאחר השראת התהליך (איור 13). ייתכן שאנזים זה מעורב בתהליכי מוות המתרחשים הן ברקמת הניתוק עם התקדמות התהליך והן בעלים לאחר הרעבה לזרחן.

השפעת ההורמון אתילן על היווצרות נקרוטיות בתנאי הרעבה לזרחן

כפי שצוין אחת מהתופעות הפיסיולוגיות שהתקבלו בצמחים שגדלו ללא זרחן בתמיסה, הייתה צורת גדילה אפינסטית, המאופיינת בקימור של פטוטרות העלים ושלא התקבלה בצמחים שגדלו עם זרחן. גדילה אפינסטית ידועה כמאפיינת

צמחים שחשופים לרמה גבוהה של אתילן. בנוסף, אתילן מוכר כהורמון המעורב בתהליכי מוות מתוכנת בצמחים [10]. לכן השערנו הייתה כי ייצור האתילן מוגבר בעקבות העקה בצמחים שגדלים ללא זרחן בתמיסת הגידול, וייתכן כי רמת האתילן הגבוהה מעורבת בהשראת תהליך היווצרות הנקרוזות. על-מנת לבחון השערה זו בחנו האם צמחים שנחשפים להרעבה לזרחן אכן מייצרים רמה גבוהה יותר של אתילן לעומת צמחי ביקורת. לשם כך גודלו צמחי זן הבר (VF36) בתמיסה הידרופונית חסרת זרחן או בתמיסת מזון מלאה. לאחר 11 ימים מתחילת ההרעבה נכלאו צמחונים בצננות זכוכית אטומות בעלות נפח אחיד למשך 6 שעות, אז נלקחו דוגמאות מהאוויר הכלוא וריכוז האתילן נמדד במכשיר גז כרומטוגרף. התוצאות חושבו ככמות האתילן שנוצר ליחידת משקל טרי ליחידת זמן (איור 14).



איור 14. פליטת אתילן אנדוגני בצמחי זן הבר לאחר הרעבה לזרחן. צמחי זן הבר (VF36) גודלו הידרופונית בתמיסת מזון חסרת זרחן או מלאה (ביקורת), לאחר 11 ימים נמדדה רמת ייצור האתילן. כל עמודה מייצגת ממוצע של 10 מדידות ± שגיאת תקן.

מאיור 14 אפשר ללמוד כי רמת ייצור האתילן של צמחים שגדלים בתנאי מחסור בזרחן מוגברת בהשוואה לצמחים שגדלים בתמיסת מזון שמכילה זרחן, אם כי ההבדל יחסית קטן ויתכן שנובע מכך שלא כל חלקי הצמח ששימשו למדידה מייצרים אתילן ברמה מוגברת (הניסוי בוצע על צמחונים שלמים). תוצאה זו תומכת בהשערה לפיה הרעבה של צמחי עגבנייה לזרחן גורמת לעליה ברמה האנדוגנית של אתילן, שייתכן ומעורב בתהליך המוות המושרה בעלים ושמוביל להיווצרות הנקרוזות.

השפעת מעכב פעילות האתילן 1-MCP על היווצרות הנקרוזות בתנאי מחסור בזרחן
 ממחקר קודם שבצענו ידוע שביטוי *LX* מושרה על-ידי אתילן, בנוסף הצגנו תוצאות לפיהן רמת ייצור האתילן עולה בצמחים בעקבות הרעבה לזרחן. כיוון שאתילן מוכר כהורמון שקשור בתהליכי מוות בצמחים, ההנחה שלנו היא שהגברה בייצור האתילן בתנאי מחסור בזרחן, מביאה לשפעול גנים שקשורים בתהליך מוות בצמח. ייתכן כי *LX* הוא אחד מאותם גנים המעורבים בתהליך המוות וקצב התקדמות התהליך מואט בעקבות העיכוב בביטוי *LX*. על-מנת לבחון את מידת חשיבות האתילן לתהליך התפתחות הנקרוזות ומות התאים, השתמשנו במעכב הישת האתילן 1-Methylcyclopropene (1-MCP) הידוע כמעכב יעיל מאוד שחוסם את הקולטנים לאתילן [11]. לביצוע ניסוי זה גודלו צמחונים מזן הבר ושלושת הקווים הטרנסגנים במצע פרלייט והושקו בתמיסת מזון מלאה למשך 25 יום. לאחר מכן הועברו לגידול הידרופוני. הניסוי כלל גידול צמחונים בתמיסת מזון מלאה או בתמיסת מזון ללא זרחן, בשילוב עם או ללא טיפול במעכב 1-MCP, כך שהניסוי כלל 4 מכלים שמייצגים ארבעה טיפולים שונים, כשבכל מיכל מיוצגים כל הקווים במספר פרטים זהה. תאור סכמתי של הטיפולים מסוכם בטבלה 1. יישום הגז 1-MCP בריכוז 5 ppm בוצע על-ידי הזרקת נפח מתאים של המעכב הגזי לתא אטום בו הודגרו הצמחים למשך 15 שעות. כיוון שהטיפול במעכב יכול לאבד מעילותו עם התפתחות הצמח ויצירת קולטנים חדשים, שלא נחשפו למעכב, חזרנו על הטיפול מספר פעמים במהלך הניסוי, בימים 2,

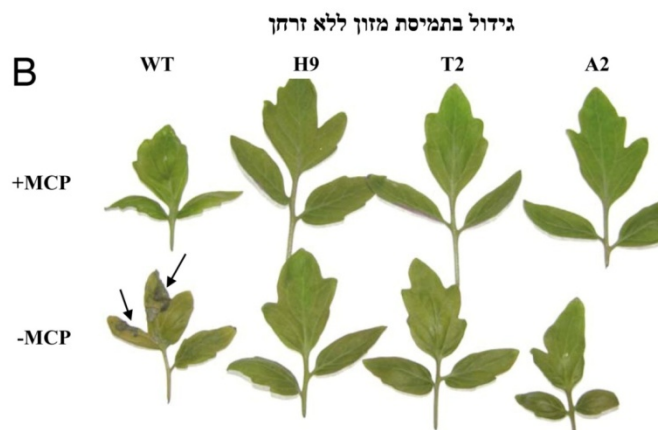
4, 6, 8 על מנת לשמר את אפקט העיכוב של פעילות האתילן. טיפולי הביקורת שהו במקביל בתא אטום ללא יישום המעכב.

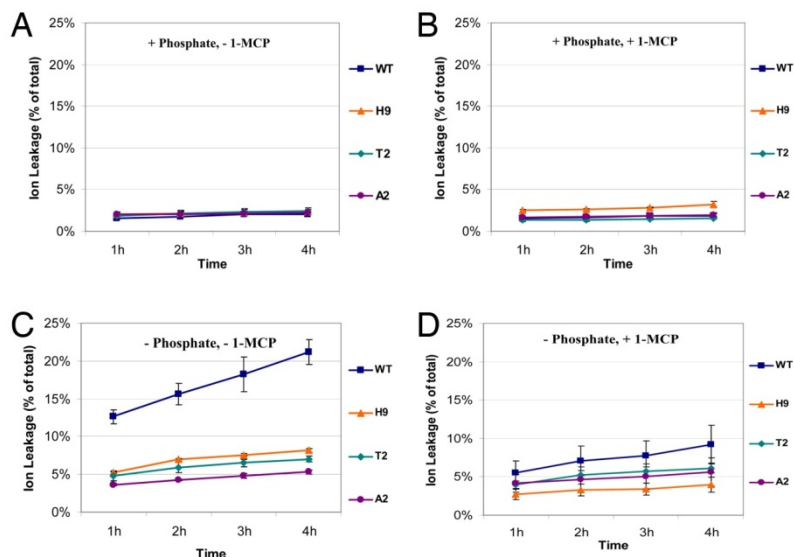
טיפול מס'	זרחן	MCP
1	+	+
2	+	-
3	-	+
4	-	-

טבלה 1: סיכום הטיפולים בניסוי השפעת מעכב פעילות האתילן 1-MCP על היווצרות הנקרוזות בתנאי מחסור בזרחן. ממצאי ניסוי זה הראו כי בנוכחות זרחן בתמיסת הגידול, לא נצפתה כלל תופעת המוות הנקרוטי, ללא תלות בטיפול או חוסר טיפול במעכב. לעומת זאת צמחים מזן הבר שגדלו ללא זרחן וללא טיפול במעכב 1-MCP, הציגו סימני נקרוזה לאחר 10 ימים ממועד העברתם לתמיסה חסרת זרחן. ואילו בצמחי זן הבר שטופלו ב- 1-MCP לא נראו כלל באותו זמן התפתחות של הנקרוזות. בצמחים הטרנסגנים עדיין לא נצפו כלל סימני נקרוזה באותו פרק זמן, הן בטיפול המעכב והן ללא המעכב. באיור 15 מוצג צילום עלים מייצגים שגדלו בתמיסה עם תוספת זרחן במשך 20 יום, ועלים שגדלו בתמיסה ללא זרחן למשך 14 יום, עם או ללא טיפולי 1-MCP. כל העלים הם מעמדה ראשונה. באיור 16 מסוכמים מדדי קצב זליגת היונים של הטיפולים השונים.



איור 15. השפעת יישום 1-MCP על התפתחות נקרוזות בצמחים שגדלו בתמיסות הידרופוניות. צמחי זן הבר (VF36) ושלושת הקווים הטרנסגנים (A2, T2, H9) גודלו במערכת הידרופונית. עלים מייצגים צולמו 20 יום לאחר ההעברה לתמיסת מזון מלאה שהכילה זרחן, עם או בלי יישום 1-MCP (A). או 14 יום לאחר ההעברה לתמיסת מזון חסרת זרחן, עם או בלי יישום 1-MCP, החצים מצביעים על אזורי נקרוזה (B).





איור 16. השפעת יישום 1-MCP על קצב זליגת יונים בצמחים שגדלו בתמיסות הידרופוניות. צמחי זן הבר (VF36) ושלושת הקווים הטרנסגנים (A2, T2, H9) גודלו במערכות הידרופוניות. קצב זליגת יונים נמדד מעלים שגדלו 20 יום בתמיסת מזון מלאה שהכילה זרחן, בלי (A) או עם (B) טיפול 1-MCP. קצב זליגת יונים נמדד מעלים שגדלו 14 יום בתמיסת מזון חסרת זרחן, בלי (C) או עם (D) טיפול 1-MCP. המדידות נערכו על עלים מעמדה ראשונה. כל נקודה מייצגת ממוצע של 3 מדידות \pm שגיאת תקן.

כל קווי הצמחים שגדלו בתמיסת מזון שהכילה זרחן הראו זליגת יונים נמוכה ביותר במהלך

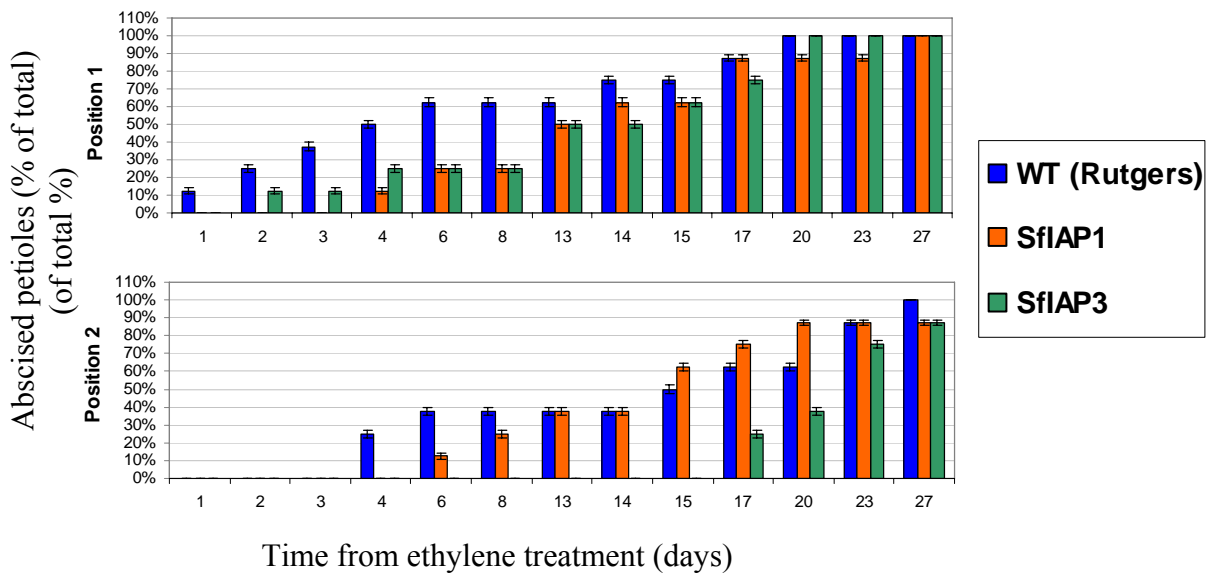
הניסוי, של בין 1.5% ל-3%, ללא קשר לטיפול או חוסר טיפול במעכב 1-MCP (איור A,B 16). לעומת זאת בצמחונים שגדלו ללא זרחן נמדדה השפעה ניכרת של הטיפול במעכב על קצב זליגת היונים. בצמחונים מזן הבר שלא טופלו ב-1-MCP נמדדו ערכים ממוצעים של 21% לאחר 4 שעות מהתחלת המדידה, בעוד באלו שטופלו ב-1-MCP נמדדה זליגת יונים ממוצעת של 9% בלבד באותה נקודת זמן. כלומר יישום מעכב פעילות האתילן 1-MCP בצמחי זן הבר האט את קצב זליגת היונים שנגרם עקב חשיפת הצמחים למחסור בזרחן (איור C,D 16). לעומת זאת בצמחים הטרנסגנים שגדלו ללא זרחן, זליגת היונים הייתה נמוכה ללא תלות בחשיפה למעכב; בקווים A2 ו-T2 לא הייתה כלל השפעה לטיפול המעכב, ואילו בקו H9 יישום ה-1-MCP הוביל לעיכוב קטן ברמת זליגת היונים (איור C,D 16).

3.8. בחינת התרחשות תהליך הניתוק בצמחי עגבנייה בהם יש ביטוי ביתר של גנים אנטי-אפופטוטיים המעכבים את תהליך המוות.

כדי להמשיך ולבחון את ההשערה לפיה מוות מתוכנת מתרחש ברקמות ניתוק ושקימו חשוב להתקדמות תהליך הניתוק בחנו את התקדמות התהליך בצמחי עגבנייה טרנסגניים בהם יש ביטוי הטרולוגי של גנים אנטי-אפופטוטיים. מחקר קודם הראה כי צמחי טבק טרנסגנים המבטאים חלבונים אנטי-אפופטוטיים מבעלי-חיים, הראו עמידות כנגד מספר פתוגנים או עקות אביוטיות. הוצע שבצמחים הללו התרחש עיכוב *in-vivo* של תהליכי מוות מתוכנת, וכי קיים דמיון בין תהליכים של מוות מתוכנת בצמחים לבין אפופטוזיס בבעלי-חיים [12]. הניסוי הראשון נערך בצמחי עגבנייה טרנסגניים בהם יש ביטוי ביתר של הגן האנטיאפופטוטי (Inhibitor of Apoptosis Protein, IAP). לצורך המחקר שלנו קיבלנו מד"ר מרטין דיקמן (ארה"ב) צמחי עגבנייה טרנסגנים, אשר בהם בוטא הגן *SfiAP* מהפרפר *Spodoptera frugiperda*. החלבון *SfiAP* ידוע כמעכב קספאזות (פרוטאזות המושרות ובעלות תפקיד מפתח באפופטוזיס) ונמצא כי הוא אכן מעכב אפופטוזיס בתרביות תאים הומאניים [13]. מטרת הניסויים שערכנו הייתה לבחון האם מתרחש כל שינוי בקינטיקה של תהליך הניתוק בצמחים הטרנסגנים שמבטאים את החלבון *SfiAP* לעומת צמחי זן הבר.

על מנת לעקוב אחר הבדלים בין צמחי זן הבר (Rutgers) לצמחים הטרנסגנים (*SfiAP*), בוצע ניסוי שבו הואץ תהליך הניתוק על ידי שילוב של הסרת הטרף וטיפול באתילן. בצמחים בוצעה הסרה של הטרף ו-24 שעות לאחר מכן הם הועברו לתא סגור שאליו הוזרם אתילן לקבלת ריכוז סופי של 5 ppm. לאחר 24 שעות הדגרה, כאשר הצמחים הראו כיפוף אפינסטי אופייני של פטוטרות העלים בתגובה לאתילן, הוצאו הצמחים והוחזרו לחממה. נערכה תצפית למעקב אחר

קצב נשירת עלים מהעמדות השונות על גבי הצמח (איור 71). בניסוי זה נכללו 2 קווי עגבנייה טרנסגנים בלתי תלויים SfiAP1 ו-SfiAP3.



איור 17. השוואת מידת הנשירה של עלים בצמחים טרנסגנים המבטאים גן אנטיאפופטוטי לעומת צמחי זן הבר. נשירת פטוטרת עלים מצמחי זן הבר (Rutgers) ומצמחי הקווים הטרנסגנים (SfiAP3, SfiAP1) לאחר השראה לנשירה, שבוצעה על-ידי הסרת טרפים וטיפול עוקב באתילן חיצוני. הגרפים מתארים נשירה מעמדת עלים ראשונה (גרף עליון) ושנייה (גרף תחתון) על גבי הגבעול. הניסוי בוצע על 8 צמחים מכל קו. התוצאות מוצגות עם \pm שגיאת תקן.

טיפול צמחים בעזרת אתילן חיצוני אכן הביא לזירוז תהליך נשירת פטוטרת העלים, ונשירה זו עוכבה בצמחים הטרנסגנים שמבטאים גן אנטיאפופטוטי יחסית לצמחי זן הבר. לדוגמא בעמדת עלים ראשונה, ביום 6 לאחר הטיפול, נשרו 62.5% מהפטוטרת בצמחי זן הבר, לעומת 25% נשירה בכל אחד משני הקווים הטרנסגנים. ביום ה-13 החל להצטמצם ההבדל בין הקווים, וביום 17 כבר כמעט ולא היה הבדל ברמת הנשירה בין הקווים הטרנסגנים לזן הבר. בעמדת עלים שנייה ישנה מגמה דומה, כאשר הקו הטרנסגני SfiAP3 מעוכב מאוד בשלבים הראשונים של תהליך הניתוק והנשירה בו מתחילה רק ביום 17 ממועד הטיפול. הגברה בתהליך הניתוק התקבלה בימים שלאחר מכן, תוך צמצום פערים מהיר לעומת צמחי זן הבר (איור 18). ממצאים אלו, שמציגים עיכוב בנשירת עלים בצמחים שמבטאים גן אנטיאפופטוטי לעומת צמחי זן הבר, תומכים בהיפותזה שתהליכי מוות מתוכנת מעורבים בתהליך ניתוק עלים, לפחות בשלב ההתחלתי של התהליך.

(1) מטרות המחקר תוך התייחסות לתכנית העבודה:

הכנת צמחים טרנסגניים בהם ביטוי LX יעוכב באופן יעיל באמצעות RNAi; לימוד השפעת מניפולציית ביטוי הגן על הניתוק בצמחים אלו יחד עם המשך אפיון הטרנסגנים הקיימים; אנליזת צמחים בהם גם LX מבוטא ביתר; לימוד מעורבות LX בניתוק והקשר לתהליך PCD ברקמת הניתוק.

(2) עיקרי הניסויים והתוצאות:

הוכנו צמחים טרנסגניים בהם עוכב ביטוי LX באמצעות טכנולוגיית RNAi. עיכוב ביטוי LX נמצא מעכב גם ניתוק בפרחים וביטויו של הגן נמצא ספציפי לאזור הדיסטלי לרקמת הניתוק. זהו מאפיינים שונים של תהליך מוות באזור רקמת הניתוק ובעבות כך נחשפו עדויות ראשוניות לכך שתהליך הניתוק מתרחש בצורה א-סימטרית כשתהליך המוות מתרחש בעיקר בצד הדיסטלי. עיכוב תהליך הניתוק הודגם בצמחים טרנסגניים בהם יש עיכוב תהליכי מוות כתוצאה מביטוי הטרולוגי של חלבונים אנטי-אפופטוטיים. נמצא שבעת חשיפה להרעבה לזרחן יש השראת תהליך מוות בעלים, התלוי באתילן, ועיכוב ביטוי LX מעכב מוות זה.

(3) מסקנות מדעיות והשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח:

במחקר להבנת תפקיד הרנאז ותהליך המוות בתהליך הניתוק היתה התקדמות טובה. הממצאים ממשיכים לתמוך במעורבותו המרכזית של LX בתהליכי מוות בעגבנייה ונראה כרגע שעיכוב תהליך הניתוק נובע מתפקיד האנזים בתהליך מוות הדרוש להשלמת הניתוק. פותחו צמחים בהם עיכוב חזק יותר אך לא הושלם איפיונם הפנוטיפי.

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

יש צורך בהשלמת אנליזת הצמחים טרנסגניים ללימוד השפעת עיכוב חזק של LX על תהליך הניתוק והיבטים נוספים של התפתחות הצמח והתמודדות עם עקות.

(5) הפצת הידע:

Farage Barhom, S., Bar, T., Burd, S., Sonogo, L. and Lers, A. (2008) Function, regulation and localization of nucleic acid degrading enzymes involved in senescence, PCD and abscission. *The Gordon Research Conference on Plant Senescence and Programmed Cell Death. South Hadley, USA, June 15-20, 2008.*

Farage Barhom, S., Bar, T., Burd, S., Sonogo, L. and Lers, A. (2009) Function, regulation and localization of nucleic acid degrading enzymes involved in senescence, PCD and abscission. *The 4th European Senescence Network (SenNet) meeting, Arvidsjaur, Lapland, Sweden Feb 20-24, 2009.*

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

~~רק בספריות~~

~~ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)~~

✓ חסוי – לא לפרסם

- .1 Roberts, J.A., K.A. Elliott, and Z.H. Gonzalez-Carranza, *Abscission, dehiscence, and other cell separation processes*. Annual Review Of Plant Biology, 2002. **53**: p. 131-158.
- .2 Taylor, J.E. and C.A. Whitelaw, *Signals in abscission*. New Phytologist, 2001 : (2)151 .p. 323-339.
- .3 Lewis, M.W., M.E. Leslie, and S.J. Liljegren, *Plant separation: 50 ways to leave your mother*. Current Opinion in Plant Biology, 2006. **9**(1): p. 59-65.
- .4 Lers, A., et al., *Suppression of LX ribonuclease in tomato results in a delay of leaf senescence and abscission*. Plant Physiology, 2006. **142**(2): p. 710-721.
- .5 Farage-Barhom, S., et al., *Expression analysis of the BFN1 nuclease gene promoter during senescence, abscission, and programmed cell death-related processes*. Journal of Experimental Botany, 2008. **59**(12): p. 3247-58.
- .6 Clement, M.V. and S. Pervaiz, *Reactive oxygen intermediates regulate cellular response to apoptotic stimuli: An hypothesis*. Free Radical Research, 1999. **30**(4): p. 247-252.
- .7 Krzymowska, M., et al., *Infection of tobacco with different Pseudomonas syringae pathovars leads to distinct morphotypes of programmed cell death*. Plant J, 2007. **50**(2): p. 253-64.
- .8 Watanabe, N. and E. Lam, *Arabidopsis Bax inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic types of cell death*. Plant J, 2006. **45**(6): p. 884-94.
- .9 Ito, J. and H. Fukuda, *ZEN1 is a key enzyme in the degradation of nuclear DNA during programmed cell death of tracheary elements*. Plant Cell, 2002. **14**(12): p. 3201-11.
- .10 Bae, H., et al., *Necrosis- and ethylene-inducing peptide from Fusarium oxysporum induces a complex cascade of transcripts associated with signal transduction and cell death in Arabidopsis*. Plant Physiol, 2006. **141**(3): p. 1056-67.
- .11 Blankenship, S.M. and J.M. Dole, *1-methylcyclopropene: a review*. Postharvest Biology and Technology, 2003. **28**(1): p. 1-25.
- .12 Dickman, M.B., et al., *Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(12): p. 6957-62.
- .13 Huang, Q., et al ., *Evolutionary conservation of apoptosis mechanisms: lepidopteran and baculoviral inhibitor of apoptosis proteins are inhibitors of mammalian caspase-9*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(4): p. 1427-32.