

דו"ח מסכם לתכנית מחקר 203-0626: אפיון הורמון חדש בגפן ובחינת השפעתו על תהליכי התפתחות בגפן

צוות המחקר: אתי אור, אמנון ליכטר, אבי פרל, שמעון לביא. המכון למטעים, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן, ת.ד. 50250. דואר אלקטרוני: vhattior@agri.gov.il

## Characterization of a new hormone in grape and analysis of its influence on grape developmental processes

Etti Or, Amnon Lichter, Avi Perl, Aliza Ogredovitch, Shimon Lavee. Institute of Horticulture, Volcani Center, Bet Dagan, P.O.B. 50250. Email: vhattior@agri.gov.il

2. הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

חתימת החוקר:

### תקציר

פיטוסולפוקינים הינם קבוצת פפטידיים צמחיים שהתגלתה לפני כ-13 שנים במהלך מחקר שעסק בזיהוי גורמים המעודדים התפתחות בתרביות בעלות צפיפות נמוכה. איתור של הומולוג לגן בגפן שהראה שינוי בתגובתו לאחר מתן ג'יברלין אקסוגני לגרגר הניע אותנו לנסות ללמוד על ביטוי הגן ותפקידו בגפן, מתוך הנחה שהוא עשוי להיות מתווך בתהליכי בקרה הורמונלית של תהליכי צמיחה.

אותרו ארבעה גנים מהמשפחה ברצף הגנום של גפן ונערכה אנליזה ביואינפורמטית משווה המצביעה על שימור הקצה הקרבוקסי טרמינלי המקודד לפרקורסור של הפפטיד גם בצמחים אחרים. מסגרות הקריאה והפרומוטורים שובטו. אותר ושובט גם ההומולוג של גפן לרצפטור AtPSKR1 לפיטוסולפוקין. נבנו קונסטראקטים לביטוי מוגבר של הרצפטור ושל VvPSK1 ונערכו טרנספורמציות לטבק ולקאלוס של גפן ויש טראנסגנים בכל המערכות. לא נראה פנוטיפ מורפולוגי בולט בצמחי טבק, בקאלוס של גפן ובצמחוני גפן טרנסגנים עד כה. הממצא היחיד הוא הצהבת קאלוסים טרנסגניים בתנאי הארה בהשוואה לצבעו הלבן של קאלוס של תאי הבקורת. נבנה גם מיניגן תחת פרומוטור אידיוסאבילי להשבת ביטויים של כל ארבעת הגנים במקביל. הקאלוס שאמור לבטא מבנה זה אינו מראה עדיין פנוטיפ אולם בחינתו עדיין לא הסתיימה.

נלמד דגם ביטויים של שניים מהגנים (VvPSK1 ו-VvPSK5) באיברי הצמח השונים, במהלך התפתחות תפוחת וגרגר, במהלך אמבריוגנזה ובתגובה לעקה חמצונית ועקת קור בפקעים. נמצאו הבדלים בדגמי הביטוי אולם ככלל יש ביטוי גבוה בתפוחת ובחנט צעיר, הביטוי יורד בהמשך אך עולה בזמן ואריזון ויורד שוב בהמשך. נמצאה אינדוקציה בולטת של שני הגנים במהלך יצירת עוברים בתרבית ובפקעים שטופלו ב שוברי תרדמה המפעילים עקה נשימתית וייצור אתילן.

העדר פנוטיפ בולט בעקבות ביטוי יתר והשבתה של גן יחיד לרצפטור או לפיטוסולפוקין לא מאפשר הסקה לגבי תפקיד הפפטיד בשלב זה. תופעה דומה נמצאה לאחרונה במחקר בנושא במערכות צמחיות אחרות ורק השבתה בו זמנית של שלושה רצפטורים לשני פפטידים בעלי חפיפה תפקודית הצביעה על פנוטיפ של נינוס/עיכוב צמיחה. העובדה כי מערכות הסינתזה והעיבוד של הפפטיד מופעלות בזמן עקה הוכחה לאחרונה באורז ובארידופסיס וממצאינו תומכים בתפקיד דומה בפקעים ובפרי במבשיל בגפן. בכמה מן המערכות האמורות יש עקה נשימתית ובקרת צמיחה ע"י אינטראקציה בין אתילן, חומצה אבסיסית וג'יברלין. בשילוב עם הפנוטיפ הננסי שמתקבלת בהשבתה מוחלטת של סיגנל הפפטיד מועלית ההיפותזה כי ייצור ועיבוד הפפטיד מושרה ע"י אתילן ומתווך בינו לבין מטבוליזם וחישת ג'יברלין. היפותזה זו תבחן בהמשך.

## רקע מדעי מקוצר

(לסקירת ספרות נרחבת יש לפנות לתכנית המחקר).

פיטוסולפוקינים הינם קבוצת פפטידיים צמחיים שהתגלתה לפני כ-13 שנים במהלך מחקר שעסק בזיהוי גורמים המעודדים התפתחות בתרביות בעלות צפיפות נמוכה. זוהי פפטיד בעל חמש חומצות אמינו הכולל שני טירוזינים (YIYTQ) והוא עדיין שסולפונציה של הטירוזינים חיונית לפעילותו של הפפטיד. זהו 5 גנים בארבידופסיס המקודדים לפרהפרופרוטאין בן כ-80 חומצות אמיניות עם שימור ביניהם בצד הקרבוקסילי הכולל את רצף הפפטיד ורצפים נוספים מצידו שהם בעלי חשיבות לעיבוד הפרוטאוליטי של הפפטיד מהפרקורסור שלו. נמצא כי הפפטיד המופרש נקשר לרצפטור קינאז על ממברנת התא שהוא בעל רצף עשיר בלאוצין.

איתור של ארבעה הומולוגים לגן בגפן שאחד מהם הראה שינוי בתגובתו לאחר מתן ג'יברלין אקסוגני לגרגר הניעו אותנו לנסות ללמוד על ביטוי הגן ותפקידו בגפן, מתוך הנחה שהוא עשוי להיות מתווך בתהליכי בקרה הורמונלית של תהליכי צמיחה.

עד לתחילתו של המחקר הנוכחי המחקר לגבי פיטוסולפוקין נעשה ברובו על ידי מעבדה יפנית אחת ורובו נעשה בתרביות בעוד שלא נלמדו בהעמקה התגובות בצמח השלם. בחפיפה לתקופת המחקר החלו להופיע עבודות שעוסקות בצמח השלם מהמעבדה המוזכרת ומעוד שתי מעבדות. מאינטגרציה של הנתונים מעבודות אלו נראה כי ביטוי יתר של גן יחיד, PSK או הרצפטור, וגם מוטציה בגן יחיד לא הראתה כל השפעה בולטת על הפנוטיפ בתנאי גידול רגילים (Howel et al., Plant Journal 2008 Kutschamar et al., New phytologist 2008). התברר שיש תפקוד חופף של יותר מפפטיד אחד (PSK ו-PSI) ותפקוד חופף של שלושה רצפטורים (שניים ל-PSK ואחד ל-PSI) ונדרשה השבתה של שניים או שלושה מהם במקביל על מנת לקבל פנוטיפ של עיכוב צמיחה (Amano et al., PNAS 2007 Kutschamar et al., New phytologist 2008). התייחסות למידע חדש זה תובא בעת הדיון בתוצאות.

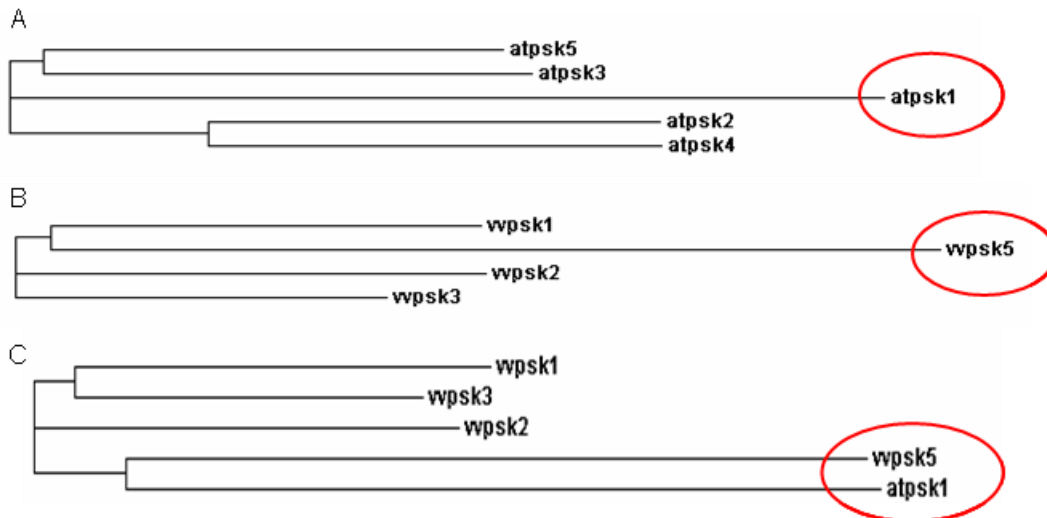
החידוש החשוב ביותר בעבודות מהתקופה האחרונה (2008-2009) הוא האינדיקציה כי נדרשת עקה כמו פציעה או הכנסת אקספלט לתרבית על מנת לקבל פפטיד סופי מעובד מהפרקורסור. עוד נמצא כי אין צורך באוקסין/ציטוקינים להפעלת הפרוטאוליזה והעיבוד אינו מיידי וחל רק כ-8 שעות לאחר מתן העקה, רמז לכך שיש מרכיבים קודמים בהולכת סיגנל העקה הנדרשים להפעלת העיבוד. ממצאים אלו תומכים בהנחה שפיטוסולפוקין הוא פפטיד מופרש המעורב במסלולי העברת סיגנל, בדומה לפפטידים באנימלים. שתי עבודות נוספות תומכות בהנחה כי תפקידו העיקרי של PSK הוא בהפחתת תגובת עקה ונמצא כי ביטוי עולה בתגובה לעקה ומתן חיצוני מפחית הצטברות של גנים אינדיקטיביים לעקה (Motos et al., Plant Phys. 2009) אם ניתן בשלב מתאים. תוספת מאוחרת (24 שעות ואילך) ממתן עקה מקטינה את השפעת הפפטיד על הקלת העקה.

## תוצאות ודיון

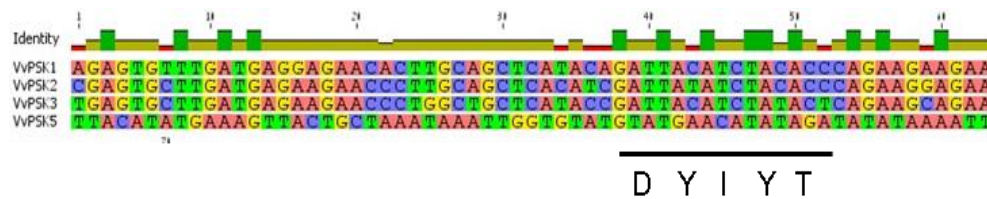
### אנליזות ביו-אינפורמטיות של משפחת הגנים של PSK בגפן ואיתור מסגרות הקריאה השלמות והפרומוטורים

בארבידופסיס נמצאו חמישה גנים המקודדים ל-PSK המחולקים לשלוש תת קבוצות על בסיס רצף, כאשר AtPSK1 שונה מכל האחרים (תמונה 1A). באמצעות אנליזה ביו-אינפורמטית מצאנו במאגר ה-EST של גפן ב-TIGR ארבעה גנים המכילים את הרצף המקודד ל-PSK. דרגת ההומולוגיה ברמת רצף ה-DNA בין ארבעת הגנים במשפחה היא נמוכה אולם ישנו רצף בין כ-70 בסיסים בצד ה-3 טרמינלי שבו דרגת ההומולוגיה היא בסביבות 90% (תמונה 2). בתמונה 1B ניתן לראות את הקשרים בין ארבעת הגנים. השוואות שנערכו בין הגנים מגפן לאלו מאראבידופסיס תוך שימוש ברצף החלבון המלא או ברצף בצד האמינו טרמינלי לא אפשרו לקבוע באופן חד משמעי איזה גן מגפן דומה לאיזה גן מאראבידופסיס אולם על בסיס אנליזה זו והשוואת הרצפים מגפן (תמונה 1C) נראה כי AtPSK1 ו-VvPSK5 הם

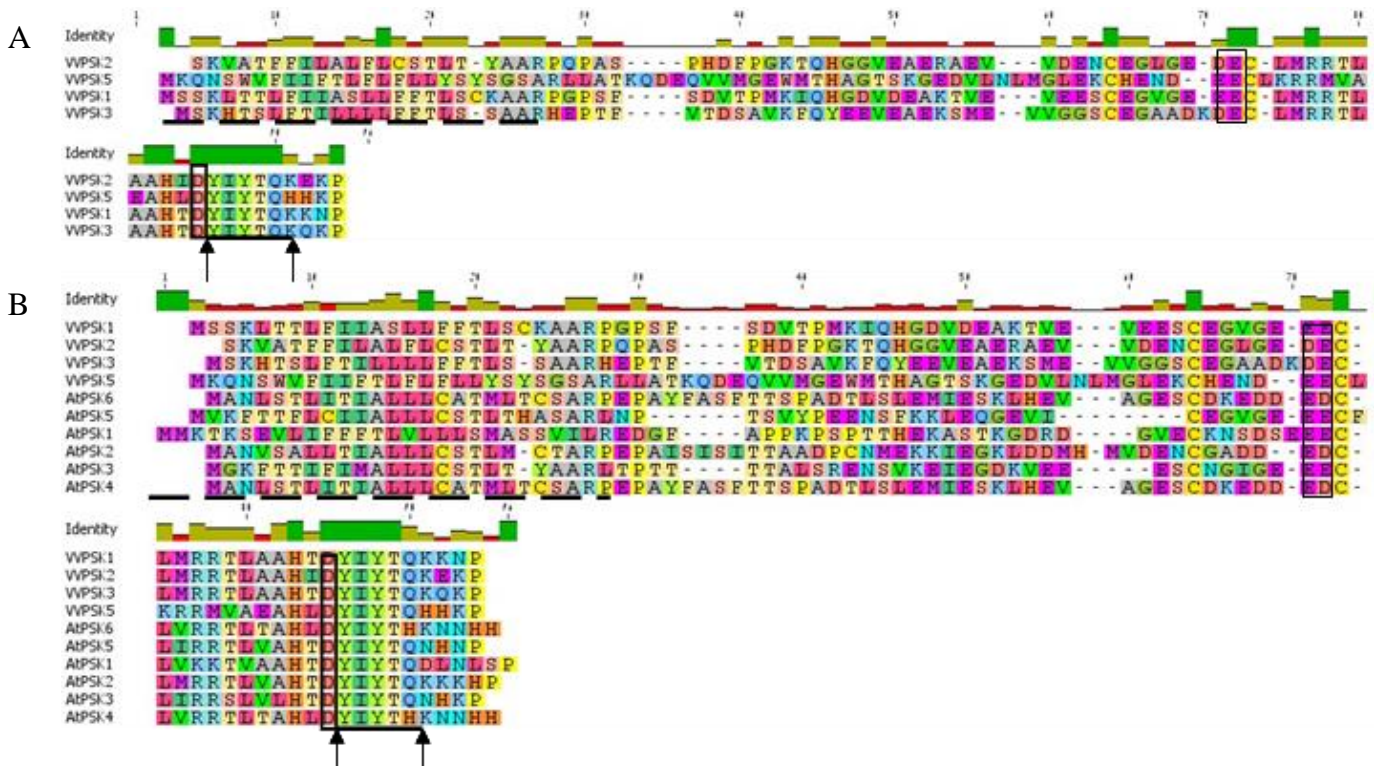
החריגים בשתי המשפחות ודומים ביניהם. בתמונה 3 ניתן לראות את רמת ההומולוגיה בין ארבעת החלבונים מגפן (3A) ואת רמת השימור באזור השמור בהשוואה של כל הגנים מגפן ומארבידופסיס (3B).



**תמונה 1:** השוואת רצפי החלבון של ארבעת הגנים ממשפחת הפיטוסולפוקינים מגפן בינם לבין עצמם ובהשוואה לרצפים נבחרים מארבידופסיס. ההשוואה נערכה תוך שימוש בתוכנת ClustalW. מספרי הזיהוי של הרצפים הם AtPSK1 (At1g13590), AtPSK2 (At2g22860), AtPSK3 (At3g44735), AtPSK4 (At3g49780), AtPSK5 (At5g65870), VvPSK1 (CD720049), VvPSK2 (CF609276), VvPSK3 (CF201816), VvPSK5 (CB917184). הפנל העליון A – מציג את ההשוואה בין רצפי PSK בארבידופסיס, הפנל האמצעי B – מציג את ההשוואה בין רצפי PSK בגפן והפנל התחתון C – מציג את ההשוואה בין כל הגנים הידועים של PSK בגפן מול AtPSK1 מארבידופסיס.



**תמונה 2:** אזור רצף הומוולוגי בין ארבעת הגנים ממשפחת הפיטוסולפוקינים מגפן. השוואת רצף בן כ-70 בסיסים בצד ה-3 טרמינלי. מספרי הזיהוי של הרצפים ע"פ תמונה 1.



**תמונה 3:** רמת ההומולוגיה בין ארבעת החלבונים מגפן (A) ורמת השימור באזור השמור בהשוואה של כל הגנים מגפן ומארבידופסיס (B). רצף PSKα מסומן בקו תחתון, ח.א. חומציות מוקפות במלבן, אתרי ביקוע מסומנים בחצים, בקצה האמינו טרמינלי נמצא אזור הידרופובי בן 22 ח.א. שמראה דמיון ל-cleavable leader peptide- מסומן בקו מקווקו.

## בידוד מסגרות הקריאה השלמות והפרומוטורים

לאחרונה הושלם ופורסם פרוייקט ריצוף הגנום של הגפן, אי לכך בטלנו את התכנית לשימוש בספריית BAC לבידוד הפרומוטורים ולחלופין נעשה שימוש ברצפים הגנומיים. על סמך הרצפים הידועים עד כה של PSK מצמחים אחרים הצלחנו לבודד את הרצפים המלאים של ה-ORF של ארבעת הגנים (תמונה 4) ושל ושל רצף של 2KB נוספים מעל למסגרת הקריאה, אם כי אין לנו מידע בהווה מה אורכו של האזור המתפקד כפרומוטור עבור כל גן. מסגרות הקריאה ל- VvPSK1 ו-VvPSK5 שובטו לתוך gateway based entry clones בשתי גרסאות-עם וללא קודון פסק לצרכים עתידיים שונים.

אזורי הפרומוטור שובטו ב-PCR מתוך כוונה לאחות אותם בהמשך לגן מדווח ולבחון השפעת הורמוני צמיחה על בקרת פעילות מהפרומוטור. נערכה השתלמות בגרמניה לגבי עבודה עם פרוטופלסטים של גפן ואינפילטרציה בגפן על מנת להשתמש בטכנולוגיה לבחינת קשר אפשרי בין ביטוי מהפרומוטורים ומאזן חומרי צמיחה אולם לא הצלחנו להפעיל את הטכנולוגיה במעבדה עד כה.

## איתור הומולוג לרצפטור ל PSK

לאחר כתיבת הצעת המחקר הנדונה פורסמה עבודה שהראתה כי השראת חלוקות תאים ודיפרנציאציה של תאים באמצעות פיטוסולפוקין מתווכת על ידי רצפטור מטיפוס Kinase domain LRR protein שנקרא PSKR1. ביטוי הרצפטור זוהה בחלקי הצמח השונים בגזר וגם בתרבית תאי גזר. ביטוי ביתר או השתקת ביטוי הרצפטור באראבידופסיס השפיעו במידה מאוד מוגבלת על הארכת חיי התא ועל פוטנציאל הגדילה שלהם ללא שינוי פנוטיפי במורפוגנזה בסיסית של הצמח. על בסיס תוצאות אלו הסיקו המחקרים כי AtPSK1 ו-AtPSKR1 עשויים להיות מעורבים בבקרת אורך חיי התא. איתרנו את ההומולוג ל-AtPSKR1 בגפן. בדומה לרצפטור מאראבידופסיס ובגזר ההומולוג מגפן מורכב מאקסון אחד ומאופייין ב"אי" המשייך אותו לרצפטורים של PSK (תמונה 5). במהלך בידוד הרצף של הרצפטור נתקלנו במספר בעיות טכניות שנבעו מגודלו אולם בסופו של דבר הצלחנו לשבט מקטע זה במערכת שיבוט של gate way –topo cloning והוא שימש לטרנספורמציה לתאי גפן שתואר בהמשך.

### VvPSK1

```
ATGTCCTCCAAGCTCACCACCCTCTTCATAATAGCCTCCCTCCTTCTTCACTCTATCCTGCAAGGCCGCCGCCAGGCCCTTCATTCTCCGATGTCA  
CTCCAATGAAAATCCAACATGG  
GGTATGTTAATTTTCTCAAAATGTATCATTTTTCACATAAAAAATGAATCCAACCCTGACTCTTCAAAAAATAGTTCTGGGTTTTGCTCATATTTCTG  
TTAATTTTCATGTATTGAAGG  
ATGTTGATGAAGCAAGACCGTTCGAGGTGGAGGAGAGCTGTGAAGGAGTTGGGGAAGAAGAGTGTGTTGATGAGGAGAACACTTGCAGCTCATAACAGATTA  
CATCTACACCCAGAAGAAGAATCCA
```

### VvPSK2

```
ATGTCCTCCCAAGGTTGCCACCTTCTTCATACTAGCTCTCTTCTCTGCTCCACCCTGACCTACGCCGCCGCCACAGCCAGCCTCTCCCCACGATTTTC  
CTGGGAAAACCAACACGGG  
GTTGGTTGAATTTCTGTGCTATTCATCTTGTTCGATTTTGTAAACAGTTCTGTGATTTGATTCATGGGCTTTTTGTTTTGTCA  
GGGCGTTGAAGCTGAGCGTCTGAGGTGGTGGATGGAACTGCGAAGGTGTTGGAGAAGACGAGTGTGATGAGAAGAACCCTTGCAGCTCACATCGAT  
TATATCTACACCCAGAAGGAGAAGCCA
```

### VvPSK3

```
ATGTCCTAAGCATACCTCCGCTTCCACATACTACTCCTCCTGTTCTTCACACTATCCTCCGCCGACGCCATGAGCCGACCTTCGTCACCGACTCTGCTG  
TGAAATTTTCAGTACGAG  
GTACCTCCATCAATTTTCATTTTCATCATCAACAGCGATCTCTTTCACAACAACAGTAACTGATTGATTTTGGGGTTTTGGTTTGTGC  
AGGAAGTGGAAAGCAGAGAAGCATGGAGGTCTGGCCGGGAGTTGCGAAGGGGACAGAGATAAGGATGAGTGTGATGAGAAGAACCCTGGCTGCTCA  
TACCGATTACATCTATACTCAGAAGCAGAAGCCCTGA
```

### VvPSK5

```
ATGAAGCAAAATTCCTGGGTGTTTATTATCTTCACTCTCTTCTTTTCTTCTTCTACTCCTACTCAGGATCTGCGCGTCTCCTTGCAACAAAACAA  
GGTACTAACCCAGGTTTCTTTCTGATCATCCTGCCTTTTCCCTTCCCTGTCATCCATTTGACGAATCTTTAATGATTTTACGGGATTTAC  
AGATGAGCAGGTGGTGTGATGGGTGAGTGGATGACTCATGCAGGTACATCAAAAAGGGAGGATGTGCTGAAT  
GTGAGAATATTTGCTCAGAATGTGCTCTTCTTTCTTATTATTGAACATATATTTTTTTCTTTTGTATCTTTTCTGATGTTGTTCTCCCTACTT  
TTTTCTCATTTGGGTGCTTTTCTATCTTTTGTAGCA  
GCTGATGGGGTTGGAAAAATGTCATGAGAATGATGAAGAATGTCTGAAGAGAAGGATGGTGGCAGAGGCTCACTTGGATTACATTTATACCCAAACATCAT  
AAGCCTTAAGATTTCTGTACAGAGGACACGAACCTCAGTTCCACGGCTCTTGTGAATGGAACCTACATATGAAAGTTACTGCTAAAATAAATGGTGTAT  
GTATGAACATATAGATATATAAAATACAGTAA
```

## תמונה 4 – רצפים מלאים של ORF של ארבעת PSK מגפן.

VvPSK1 מורכב משני אקסונים וגודל הגן ללא אינטרון הוא 250 בסיסים. VvPSK2 מורכב משני אקסונים וגודל הגן ללא אינטרון הוא 254 בסיסים. VvPSK3 מורכב משני אקסונים וגודל הגן ללא אינטרון הוא 250 בסיסים. VvPSK5 מורכב משלושה אקסונים וגודל הגן ללא אינטרון הוא 399 בסיסים. האקסונים מסומנים באפור, ה-Met הראשון מסומן באדום, וקודון פסק מסומן בכחול.

(A)

ATGACTTTCCTCAAGTGGGCATTGTTGGCTTGTCTTGTGTTGCTCTTTAAGCCTTCAAATTCACAACTAACCCAATCCTGTGATCCAAATGATTTGC  
GTGCACTGAAGGAATTTGCAGGAAACCTCACCAATGGGTCAATTTTCTCCCTTGGTCCAATGATTCTCAGTGTAGATGGGATGGTGTGGTGTGTA  
GGATTCTAATAATGGGTGGTGTCTAGTAGAGTCACTAGCTTGATTCTGCCCCACAAGGCCCTCAAAGGAGTGAATTTAACAGCTTTGGGTCGTTAGAT  
CATTGAAATTCCTTGATCTTTCAAGCAATCAACTAGATGGTGAATACCCATGGAGCTCTCAAATCTGCATCAGCTGGAAGTCTTGTATTTGAGCTACA  
ACAAGCTCCTGGGACAGTTTCAAGATCCCTTCTTGGCTTGAATCTATAAAGTCACTCAATATTTCAAGCAATTTATTCAGTGGGGATTTCTTGGGAGT  
TGGAGGGTTTCTGAATCTTGTGTGTTCAACATAAGCAACAATTTCTTCAATGGCAGTATCAGTCTCAGTCTTTCAGTCTTCTAATGCAATTCAGATG  
ATTGATTTGTCAATGAACCATTTCACAGGGGGGCTTGAAGGCTTAGGCAACTGCAGCTTTACATCTCTCCAGAACCTGCATGTGGATTACAATTTCTCTTT  
CAGGCCAGCTTCCAGAGTTTTTGTGTTTTCATTGCCATCTTTGGAGCAGCTCTCGATCCCCGGCAACAATTTCTCCGGCCATTTAAGCAGAAAATTTAGTAA  
GCTCCACAGCCTTAAAGCCTTGGTTATATTTGGAAACCGATTCAGGGTCCAATTCGGAATGATTTGGGAACCTTACACAACCTGGAATATTAATTGCA  
CACTCAAATTCATTCTATGGGGTGTGCCTTCAACCTTGGCTTGTGCTCAAAGCTTCGAGTGTCTGATCTTCGAAACAATTCCTTAACAGGTCGTATTG  
ACCTTAATTTCACTGGGTGGCACATCTCTGTGCGCTTGATCTTGCACAAATCATTTTCTGGTTTCTTCCGAAACACACTCTCTAGTTGTAGGGAAT  
GAAACTCTTGGCCTTGTCTAAGAATGATTTACGAGGGCCCGTCCCTGAAAGTTTGGCAAACCTCAAATACCTTTCCGGTCTCAGCTTGTGCAACAACAGT  
TTTGTGAACCTTGACTAGGCAATATCTGTACTGCAGCAGTGCAGCAAGTCAAAATCTTACCACCTTATCTCCTTAAGAATTTCCATGGAGAAGAAATTC  
ATGTGAAGGGGTTTGGAGCTTAATGATTTTTCGCACTTGGGATTTGTGCACTTCGTGGCCAAATCCCATATTTGGTTATTAATGCAAGAAGTTGCAAGT  
CCTTGATTTGTCGTGGAATCACTTGGATGGGAGTATCCCTCCTTGGATTTGGTGAATGGAGAAATTTGTTTTACTTGGACTTCTTAATAACTCGCTCACA  
GGACGAATACCGAAAAGCTTACGGAGCTGAAGAGCCTTATCTTCAAAAAATGTAACCTCGTCAAATATTACTACTTCTGCAGGCAATTCACACTATATGTA  
AGCGAAACCGAGTGAATGTTTGAATCAACAACCGAGTCAAGTTCCTCCTCATGAATTTCTGAGCAATAACAGAATTAATGGGACAAATTTGGGCC  
TGAAATTTGGGAACTTAAACAGCTCCACGTCTTAGATTTGAGCAGAAAACAACATTACAGGTACCATCCCTGACTCCATTTCGAACATGGGAAATTTGGAA  
GTTCTGGATTTATCATGCAATGACCTGCATGGGAGATCCCTTCACTATTGAACAAGCTCATTTCCTATCAAAGTTCAGTGTGGCTGACAATCAGTTGC  
GTGGAATGATTTCCACTGGGGGGCAGTTCCTAAGCTTTCCCAACTCGAGCTTTGAGGGTAAACCTGGCCTCTGTGGAGAAGTGTATATTCCTTGTGACAC  
TTTGTGAACCTTGACTAGGCAATATCTGTACTGCAGCAGTGCAGCAAGTCAAAATCTTACCACCTTATCTCCTTAAGAATTTCCATGGAGAAGAAATTC  
ATTGCTTTACTTCTGCGAGTGTGTTGGCTTGAATGTCAAGGAGAGATGTGGGGGATCCAATCGTTGATCTGGATGAGGAAATCAGCCGGCCACACAGGC  
TATCTGAAGTGTCTGGGCTTCAAAGCTGGTCTTTCAGAAATTCAGGTTGCAAGGATCTCTCAGTAGCAGACTTGTGAAAGTCAACAAACAAATTTCAA  
CCAAGCAAAATATAATTTGGTTGTGGTGGATTTGGTCTGGTTTACAAAGCCAAATCTTCTGATGGCACAAGGGCTGCAATCAAGAGGCTTTCTGGGGATTGC  
GGCAGATGGAGCGCAGTTCGAGCTGAAGTGAAGCCCTCTCAAGGCTCAGCATAGAATCTTGTCTTCAAGGGTATTGCCGGCATGGTAAATG  
ATAGATTTGTTAATTTACTCCTACATGGAGAATGGAAGCTTGGACTATTTGGCTGCATGAAAGAGTTGATGGAGGTTCAATTTCTTACATGGGACACAAGAGT  
CAAGATTGCTCAAGGAGCAGTTCGGGATTAGCTTACTTGCACAAGTGTGAGCCAAAGTGTAGTTCATCGAGACATTAATCTAGCAACATTTCTTTG  
GATGAACATTTGAAGCTCATTTAGCAGATTTTGGTCTCTCAAGGCTACTTCGGCCTTATGATACTCATGTAAACAACGGATTTGGTTGGGACTTTGGGTT  
ATATTCCTCCTGAATATAGTCAGACATTAACAGCAACCTTCAAAGGTGATGTTACAGCTTTGGTGTGTTCTTCTCGAGCTTCTTACTGGTAGGAGGCC  
TGTGGAAGTATGCAAAGGAAAAAATTTGAGGACTTGGTGTATGGGTTTTCAGATGAAATCAGAGAAGAAAGAGGAGCAGATTTATGGATTCATCGGTT  
TGGGATAAGGATCGTGAAGCAGTCTTAGAAGTGTGTTGCTGTAGATGTATAGACCAAGATCCAAGGCAGAGACCCTCAATCGATCAAGTTG  
TCTCATGGCTTGATGCTGTTGGAAAGGAGGGCGTGTAA

(B)

MTFLK WALLACLVCSSLSLQIPNLTQSCDPNDLRALKEFAGNLTNGSIFFLWSNDSHCCRWDVGVGCEDSNNGSVASRVTLIILPHKGLKGVNLTALGRDL  
HLKFLDLSSNQLDGLPELMSLNHLQLEVLDSLKNLGLPVSRLGLKSLKSLNLSNLFSGDFLGVGGFLNLVVFNI SNNFNNGSISQFCSSNAIQM  
IDLSMNHFTGGLGNCSTSLQNLHVDYNSLSGQLPEFLPSLEQLSPGNFSGHLSRKLKSLHSLKALVIFGNFRFGPIPNVFGNLTQLEILIA  
HSNSFYGVLPSTLALCSKLRVLDLRNNSLTGRIDLNFTGLPHLCALDLATNHFSG  
FLPNTLSSCRELKLKSLAKNDLRGVPVSEFANLKYLSVLTLSNNSFVNLTALSVLQCKNLTTLILTKNFHGEIIPKNVKGFESLMIFALGYCALRGQI  
PYWLLNCKKLQVLDLSWNHLDGSI PPWIGEMENLFYLD FSNNLSLTGRIPKSLTELKSLIFTKCNSSNITTSAGIPLYVKRNQSANGLQYNQVSSFPPIF  
LSNNRINGTIWPEIGKLLKQLHVLDSLRRNITGTIPDSISNMGNEVLDSLSCNDLHGEIPSSLNKLTFLSKFSVADNQLRGMIP TGGQFLSFPNSSFEGNP  
GLCGEVYIPCDTDDTMDPKPEIRASSNGKFGQGSIFGITISVGVGIALLLAVVWL  
RMSRDRVGDPIVDLDEEISRPHRLSEVLGSSKLVLFQNSGCKDLSVADLLKSTNNFNQANIIGCGGFLVYKANLPDGTAAIKRLSGDCQMEREFRAE  
VEALSRAQHKNLVSLQGYCRHGNDRLLIYSYMENGLDYWLHERVDGGSFLTWDTRVKIAQAGRGLAYLHKVCEPSVVRDIKSSNILLDETFEAHLAD  
FGLSRLLRPYDHTVTDLVGLGIIPPEYSQTLTATFKGDVYSFGVVLLELLTGRRPVEVCKGNCRDLVSWVFMKSEKKEEQIMDSVWWDKREKQFL  
EVLGIACRCDIDQDPRQPSIDQVVSWLDAVGKEGV

תמונה 5 – רצף חומצות אמינו במסגרת הקריאה של הרצפטור של VvPSKR1. הרצף המסומן באפור הינו הרצף המאפיין את הרצפטור ל-PSK בקבוצת ה-LRR receptors.

## מעקב אחר רמות ביטוי PSK ברקמות שונות של הצמח ובמועדים התפתחותיים שונים באמצעות Real Time PCR.

עם התרבות הנתונים במאגרי המידע נבחנו התפלגות הטרנסקריפטים לגנים הנבחנו ברקמות שונות בצמחים נוספים וזו מעלה נוכחות בולטת של ביטוי בפירות, עלים ושורשים.

Plant	Total number of finds	Berries/ fruits	Flower, leaf, root normalized	Abiotic stress leaves	Pericarp	Seed	Buds	Flower	Leaf	Roots
צפצפה	14		12			1		1		
חסה	7								7	
עגבניה	3	Ripening 2			1					
תפוח עץ	3	3								
תפוח אדמה	4								2	2
בטטה	9									9
סויה	9	8		Callus grown in dark - 1						
צ'ילי	4	Infected plant 4								

התוצאות הפרלימינריות שתוארו בהצעת המחקר ואנליזה ביו-אינפורמטית ראשונית המתבססת על מידת הייצוג של EST clones לגן VvPSK1 בספריות cDNA שונות, על פי נתונים שהופקדו במאגר הנתונים TIGR, מצביעות על נוכחות של התעתיק בעיקר בפרי ובעלים (ראה טבלה). יחד עם זאת תת הייצוג של גרגרים צעירים, שורשים, פקעים ותפרחות בספריות שעליהן מתבסס מאגר הנתונים חייבו בדיקת ביטוי ישירה.

Total number of finds	Berries Early	Berries normalized	Abiotic stress berries	Cell culture	Buds	Inflorescence	Leaves	Petiole	Roots
21	1	4	3	1		1	7	4	

השונות ברמת ה-DNA אפשרה תכנון של זוגות פריימרים ייחודיים לארבעת הגנים ששמשו לבחינת הביטוי של הגנים באברי גפן שונים בשלבי התפתחות שונים באמצעות Real Time PCR. תכנון הפריימרים הספציפיים נעשה באמצעות תוכנת Primer Express, על בסיס מקטע לא הומולוגי ברמת החלבון בין ארבעת הגנים. מקטעי ה-DNA שהתקבלו מכל זוג פריימרים שובטו על מנת לוודא שהפריימרים אכן ספציפיים לכל גן וגן ונשלחו לריצוף. תוצאות הריצוף אכן אישרו את הספציפיות של הפריימרים לגנים הרצויים.

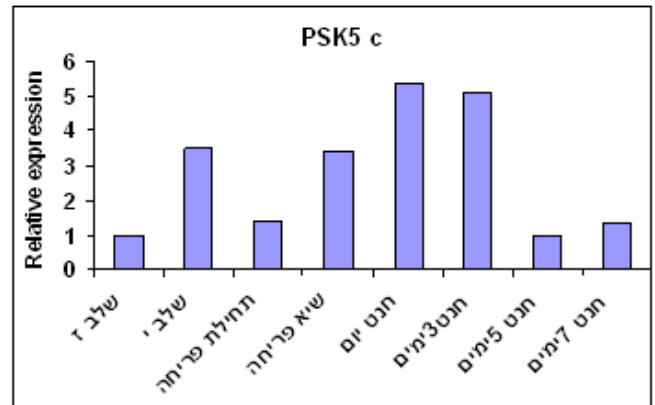
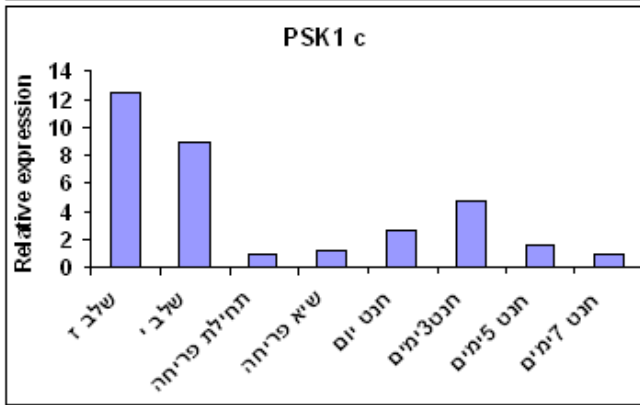
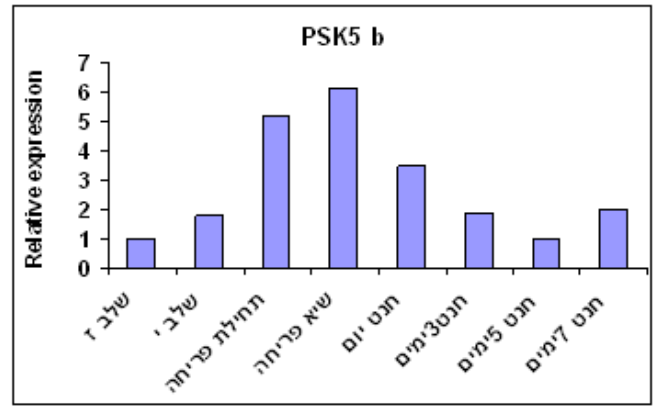
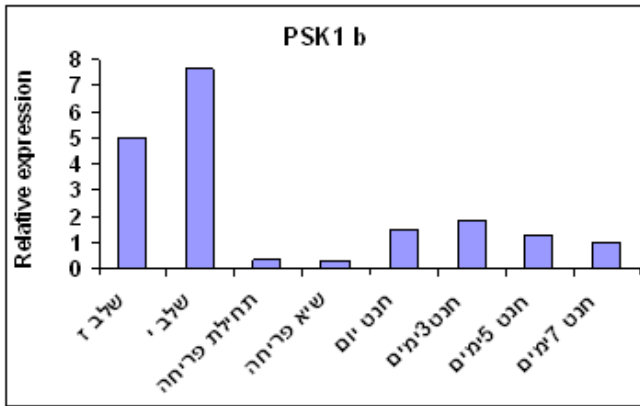
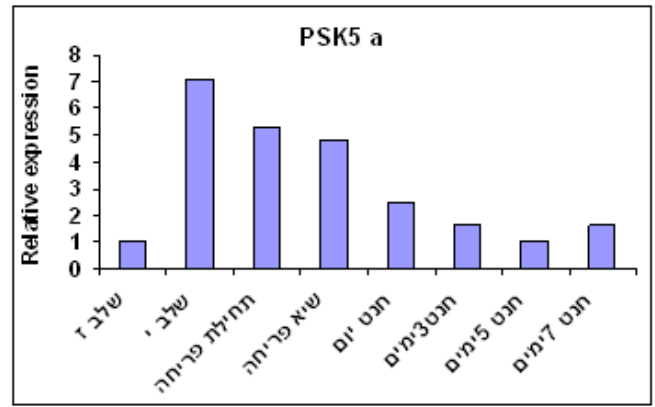
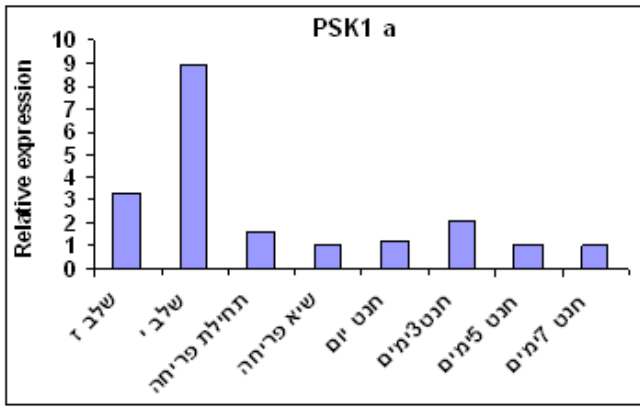
לאנליזה של ביטוי נבחרו הגנים VvPSK1 ו-VvPSK5, וזאת משום שהראו עוצמה שונה של ירידה בביטוי עם התפתחות הגרגר, דגם ביטוי שונה בתגובה לג'יברלין ושונות גדולה יחסית ברצף ביניהם. על מנת לבחון התבטאותם של VvPSK1 ו-VvPSK5 במהלך התפתחות התפרחת והגרגר הצעיר נדגמו תפרחות וחנטים מכרם סופיריור בפתחיה ממועד פריצת הפקע. בחירת המועדים ההתפתחותיים של התפרחת והחנטים ששימשו לבדיקת דגם הביטוי התבססה על המופע החיצוני של התפרחת. תפרחת צעירות נאספו בשלמותן, ללא הפרדה בין הסעיפים (שלב ז' בתמונה 6) ומרגע שהתפרחת נפרשה דיה (שלב י' והלאה בתמונה 6) נדגמו סעיפים מתפרחות רבות על מנת לקבל אוסף המייצג שלב מסויים. שלב שיא הפריחה של האשכול הוגדר כזמן 0 לחנטה. חנטים צעירים בני יום שלושה ושבעה ימים לאחר הפריחה

(תמונה 6) הופרדו משדרות והוקפאו בנפרד. דגם הביטוי נבדק על סמך שלוש הפקות RNA באמצעות Real Time PCR.

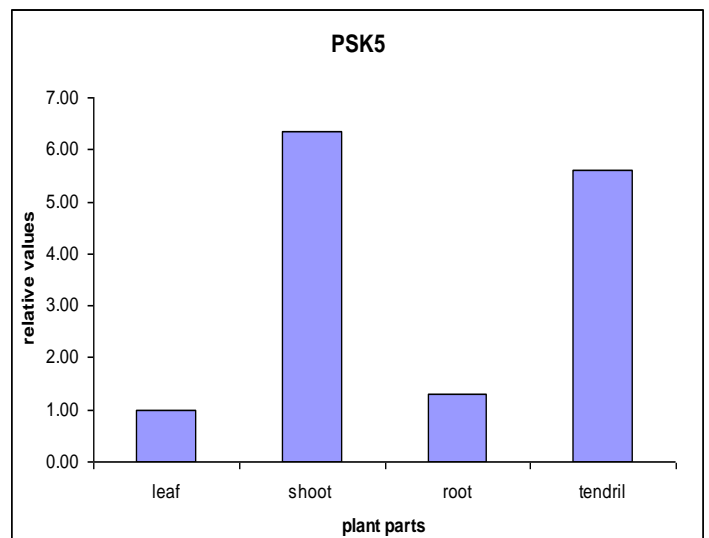
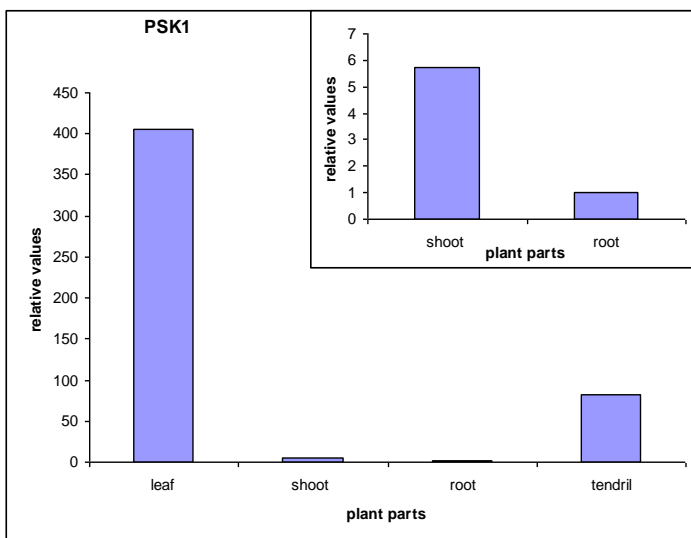


שלב ז'    שלב י'    תחילת פריחה    שיא הפריחה    חנט 1d    חנט 3d    חנט 5d    חנט 7d

תמונה 6: שלבי התפתחות הפרח והחנט בזן Superior. שלב ז – פריצת אשכול מהפקע. שיא הפריחה (80-90% פריחה) הוגדר כתחילת החנטה.



תמונה 7: השוואת דגם הביטוי של PSK1 ו-PSK5 במהלך התפתחות התפרחת והחנט בן Superior באמצעות Real Time PCR. מוצגים ערכים מנורמלים ויחסיים. כל גרף מייצג חזרה ביולוגית. שליב התפתחות מתוארים בתמונה 6.

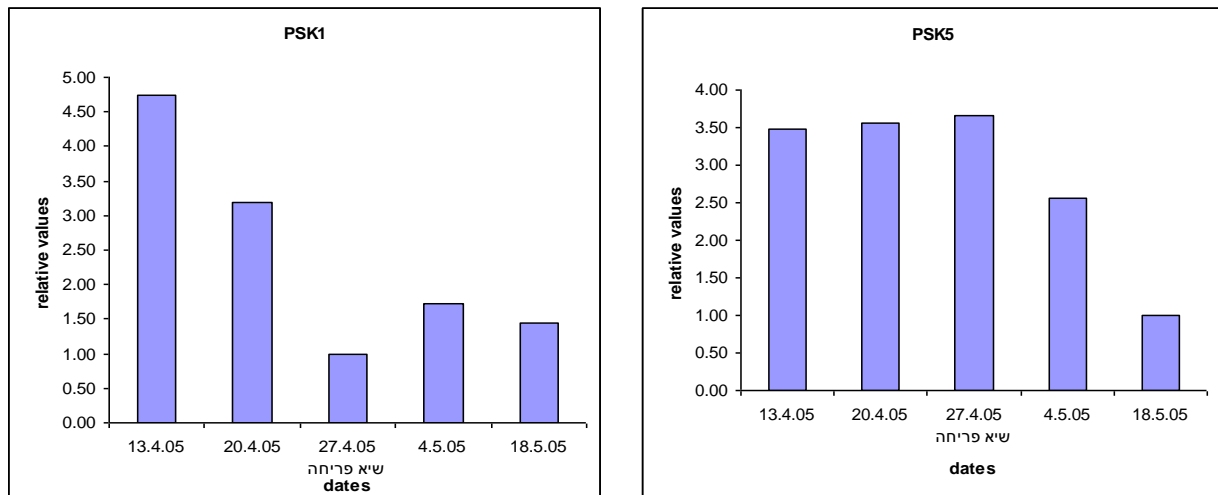


תמונה 8: השוואת דגם הביטוי של PSK1 ו-PSK5 בחלקים וגטיביים בן Superior באמצעות Real Time PCR. מוצגים ערכים מנורמלים ויחסיים. כל גרף מייצג שלוש חזרות ביולוגיות.



בתמונה 7 מוצג דגם הביטוי של VvPSK1 שהתקבל על פני השלבים הנבחרים בשלושת החזרות. מדגם זה נראה כי רמות ביטוי גבוהות קיימות בתפרחת הצעירה וירידה דרסטית עד פי 8 ברמות הביטוי חלה בשלב פריחה. במהלך התפתחות החנט נראית עלייה ברמת הביטוי עד לשלושה ימים לאחר חנטה (פי 2) ואז יש שוב ירידה בביטוי.

מהסתכלות בדגם הביטוי של VvPSK5 במהלך השלבים המוזכרים לעיל בשלושת החזרות (תמונה 7) נראה כי הביטוי נמוך בתפרחת הצעירה ועולה בשיא הפריחה עד פי 5. משלב זה יש ירידה בביטוי מהגן עד לקראת שבוע לאחר חנטה בו נראה שיש שינוי מגמה. את ההבדלים בין החזרות אפשר לייחס לעובדה כי אין סינכרוניזציה מלאה של הפריחה. למרות זאת, אפשר להבחין בבירור בדגם הביטוי השונה של VvPSK1 בהשוואה ל- VvPSK5 יחס ל- VvPSK5 ומן התוצאות ניתן אולי לשער כי ל- VvPSK1 יש אולי תפקיד בהתפתחות החנט בעוד ש- VvPSK5 נראה קשור יותר לשלב הפריחה.



תמונה 9 : השוואת דגם הביטוי של PSK1 ו-PSK5 בפקעים צעירים מן Superior באמצעות Real Time PCR. מוצגים ערכים מנורמלים ויחסיים. כל גרף מייצג שלוש חזרות ביולוגית.

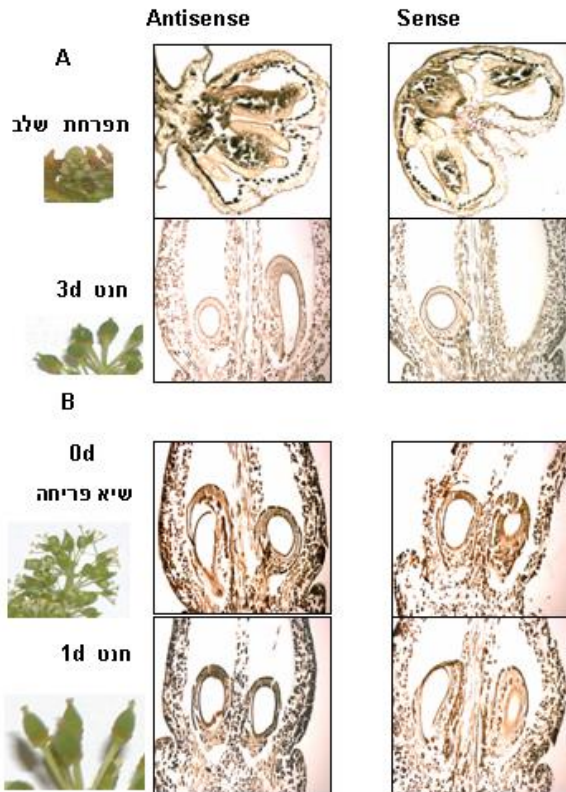
### ביטוי בחלקים וגטטיביים של גפן

בנוסף לבחינת הביטוי במהלך התפתחות התפרחת והגרגר הצעיר נבחן דגם הביטוי של VvPSK1 ו- VvPSK5 בחלקים וגטטיביים של גפן בזן סופרירור. נמצא כי ביטוי מהגן VvPSK1 חלש בשורשים, גבוה יותר בקנוקנות וחזק מאד בעלים (תמונה 8). לעומתו VvPSK5 מתבטא בעיקר בציר השריג והקנוקנת וביטויו חלש יותר בעלים (תמונה 8 פנל ימני). נבחן גם דגם הביטוי של שני הגנים בפקעים המתפתחים על השריג (תמונה 9) ונראה כי ביטויים של שני הגנים גבוה בפקע בשלבי ההתפתחות הראשונים ויורד בהמשך.

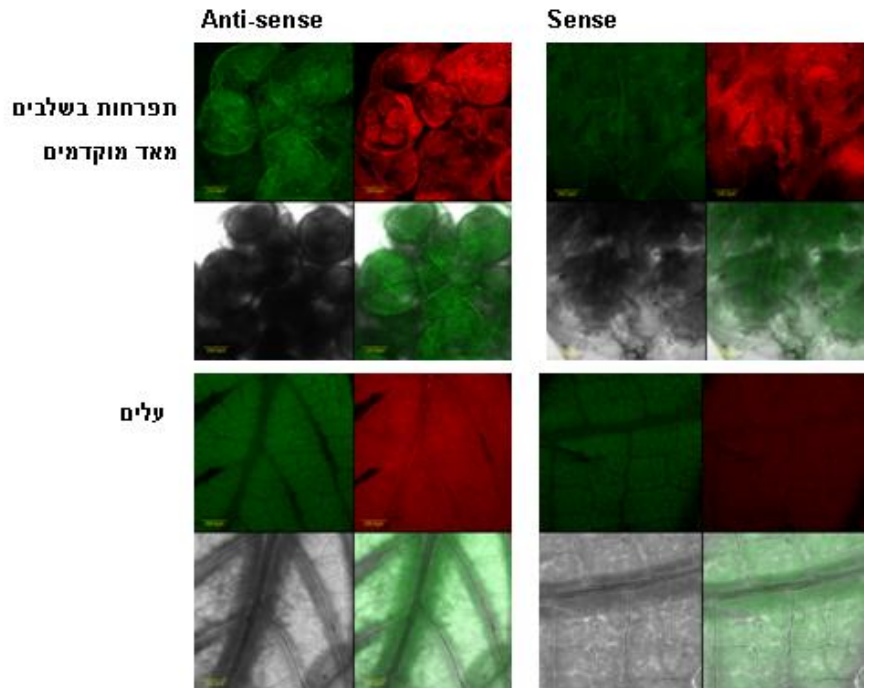
חלק מהדוגמאות ששימשו אותנו לביצוע אנליזות הביטוי של הגנים קובעו ב-FAA, ומהן הוכנו חתכים היסטולוגיים ששימשו אותנו לנסיונות לזיהוי ביטוי הגנים ברקמות השונות של התפרחת והחנטים באמצעות *In situ*. הסימון נעשה הן עם הסמן של הגן PSK1 בגודל של 443 בסיסים (תמונה 10A) והן עם הסמן של הגן PSK5 בגודל של 336 בסיסים (תמונה 10B). לפי התוצאות נראה כי לא נחלנו הצלחה יתרה ולא הצלחנו להבחין בביטוי ברקמה המקובעת, אולי עקב אופיים הקצר של הגנים.

לחלופין, חלק מהדוגמאות ששימשו אותנו לביצוע אנליזות הביטוי של הגנים של החלקים הוגטטיביים הטריים קובעו בתמיסת קיבוע המכילה chloroform : acetic acid : ethanol ושימשו לתהליך הנקרא *In vivo in-situ*. בניסויים אלו סומנו פרוב sense ופרוב anti-sense של הגן VvPSK1 בגודל של 598 בסיסים (כולל ה-UTR3) בסמן פלורסנטי והודגרו עם הרקמות המטופלות ללא חיתוך. לאחר הדגרה ושטיפות של הגלאים בתהליך דומה לריאקציית סימון של *In situ* הדוגמאות נבדקו מיד במיקרוסקופ קונפוקלי (תמונה 11). לא נמצא הבדל בין סנס לאנטי-סנס בשורשים בהתאמה

לעצמת הביטוי באנליזות Real time . לעומת זאת ניתן לראות ביטוי של הטרנסקריפט בסמיכות לעורקי העלה ועל פני כל התפרחת בשלב התפתחותה הראשוני (מיד עם היציאה מהפקע).



**תמונה 10 – דגם ביטוי של VvPSK1, 5**  
**במהלך התפתחות התפרחת והגרר.**  
 הפנל העליון A – מציג תוצאות סימון בשיטת In situ על ידי סמן ספציפי ל-PSK1 בגודל של 443 בסיסים. הפנל התחתון B - מציג תוצאות סימון בשיטת In situ על ידי סמן ספציפי ל-PSK5 בגודל של 336 בסיסים. כל התמונות מוצגות בהגדלה 10x למעט תמונה של חנטים בני יום PSK5 – הגדלה 5x.



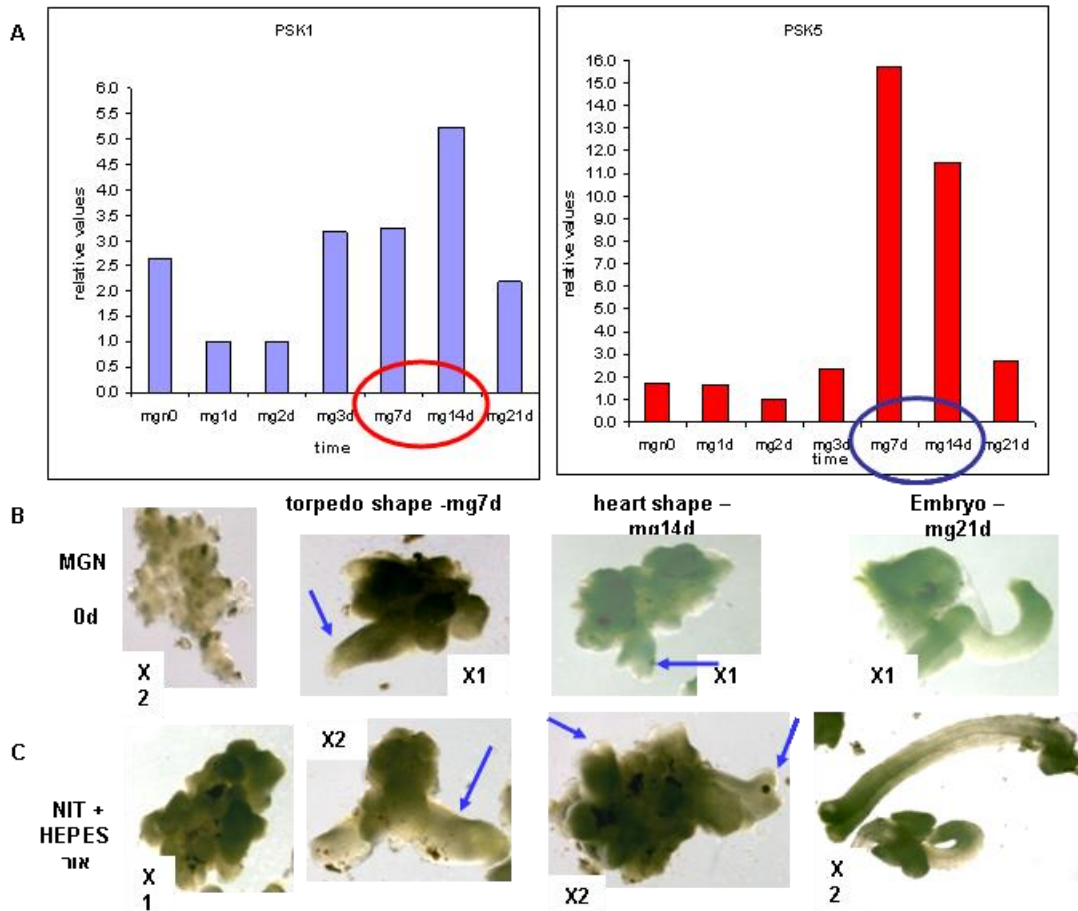
**תמונה 11 – דגם ביטוי של VvPSK1**  
**בחלקי צמח בשיטת *In vivo in-situ*.**  
 בניסויים אלו סומנו פרוב sense ופרוב anti-sense של VvPSK1 בגודל של 598 בסיסים (כולל ה-UTR3) בסמן פלורסנטי.

### ביטוי בתרבית תאים

בבחינת דגם ביטוי של VvPSK1 ו-VvPSK5 בתרבית תאים אמבריוגנית נראה כי הביטוי ביומיים הראשונים לאחר החשיפה לאור והורדת האוקסין מהמצע (הטריגר לתחילת יצירת עוברים) נמוך יחסית וביטוי משני הגנים הוא גבוה במיוחד בשלבי ה- heart shape וה- Torpedo המאפיינות תחילת יצירת עוברים - כאשר עוצמת הביטוי הגבוהה ביותר נראתה לאחר שבועיים מהחשיפה לאור (תמונה 12).

### השתקת ביטוי וביטוי מוגבר

על בסיס התוצאות מנסיונות שעקבו אחרי ביטוי הגנים PSK1 ו-PSK1 החלטנו כי ייצור ביתר ייבדק תחילה על הגן VvPSK1 שכנראה מעורב בהתפתחות החנט ובעל דגם ביטוי שונה מזה של VvPSK5. VvPSK1 שובט תוך שימוש במערכת ה- GATEWAY (Invitrogen) בתוך הווקטור הבינרי (destination vector) pK7WG2D. ביטוי המחדר נמצא תחת בקרה קונסטטיטטיבית של 35S. ווקטור בינרי המכיל את המחדר הרצוי (PSK1) עבר טרנספורמציה ל- *Agrobacterium* מזן EHA105. על מנת לוודא את הימצאות המחדר באגרובקטריום נעשו ריאקציות PCR עם התחלים הספציפיים לגן על מושבות של החיידקים ושלוש מושבות חיוביות נשלחו לריצוף. העמדנו תשתית לטרנספורמציה בשתי

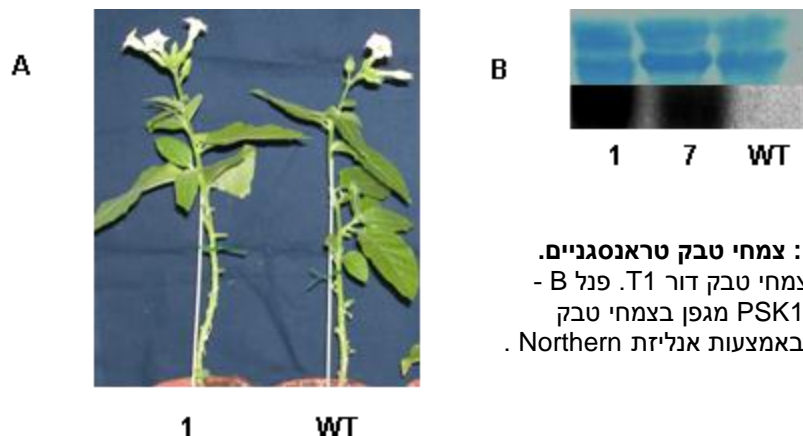


**תמונה 12 : מעקב התפתחות תרבית ברמת הטראנסקריפט וברמה פיסיולוגית**

פנל A - השוואת דגם הביטוי של PSK1 ו-PSK5 בתרבית תאים אמבריונית באמצעות Real Time PCR. מוצגים ערכים מנורמלים ויחסים. כל גרף מייצג שלוש חזרות ביולוגיות. פנל B - שלבי התפתחות של עוברים מתרבית פרה-אמבריונית לאחר הסרת האוקסין וחשיפה לאור. פנל C - התאמת מצע גידול לעבודה ב-pH גבוה מהמקובל - מצע NIT בתוספת HEPES 50mM ב-pH 7.5 מאפשר יצירת עוברים תקינה.

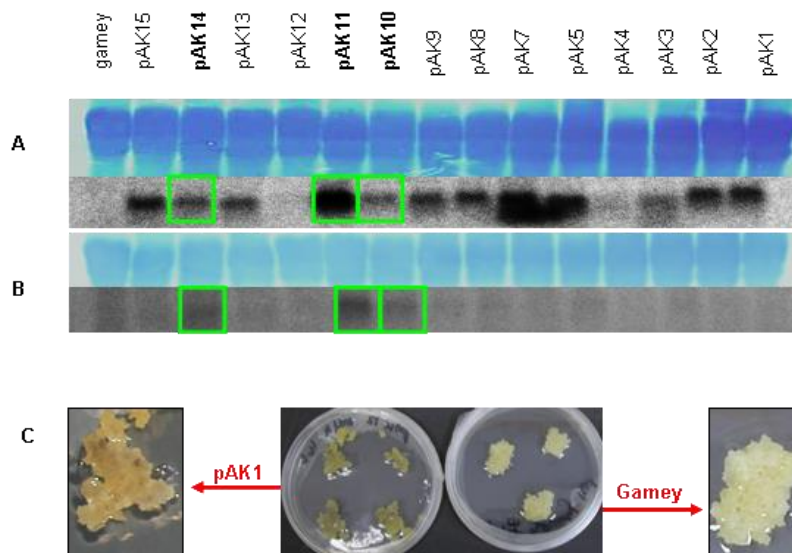
מערכות (טבק וגפן). תהליך דומה נערך עבור מסגרת הקריאה של הרצפטור עד לקבלת וקטור בינארי באגרובקטריום (PSKR1).

צמחים טרנסגניים של טבק גודלו ומזרעיהם הונבטו צמחי T1. שניים מתוך צמחים אלו מראים ביטוי מוגבר של המחזר מגפן ברמת ה-RNA אולם אין כל פנוטיפ המבדיל בינם לבין צמחי הביקורת בתנאי גידול רגילים (תמונה 13). לקבלת קווים הומוזיגוטיים לטרנסגן אנו חוזרים על התהליך לקבלת זרעי T2 שימשו כבנק זרעים לקו יציב הומו-זיגוטי (כרגע הצמחים פורחים).



**תמונה 13: צמחי טבק טראנסגניים.**  
 פנל A - צמחי טבק דור T1. פנל B - ביטוי של PSK1 מגפן בצמחי טבק טרנסגניים באמצעות אנליזת Northern.

במשך זמן רב נסיונות ההתמרה של גפן לא צלחו עקב בעיות גם בטרנספורמציה וגם ברגנרציה. ראשונה נפתרה בעיית הטרנספורמציה לתאי תרבית מזן גאמי שאינם עוברים רגנרציה. בוססו קווי קאלוס טרנסגניים מהעוברים הטרנספורמנטים עבור עבודה בתרבית ולפחות שלושה מתוך קווי הקאלוס שנבחנו מייצרים את הטרנסקריפט ביתר. גם כאן מצאנו כי הפנוטיפ של הטרנסגנים אינו נבדל מהפנוטיפ של תאי גאמי לא מותמרים בתנאי תרבית רגילים למעט צבעו של הקאלוס שהוא צהוב יותר מתאי הבקורת בתנאי הארה (תמונה 14).



**תמונה 14: בחינת דגם הביטוי של PSK1 בתרבית תאים ומופע פנוטיפי.**  
 פנל A, B מציגים חזרות ביולוגיות לבדיקת ביטוי PSK1 בתרביות טראנסגניות המבטאות ביתר את הגן של PSK1. בריבוע ירוק מסומנים קווים טראנסגניים הראו ביטוי מוגבר בשתי החזרות.  
 פנל C מציג תרבית תאים על מצע מוצק gamey- WT – pAK1 – אחת המושבות המודגשות בפנלים A, B.

תהליך דומה נערך עבור הקונסטראקט של הרצפטור וקיימים קווי קאלוס עמידים לאנטיביוטיקה אולם עדיין לא נערכו האנליזות להוכחה של הגברת רמת התעתיק. גם הקאלוסים המבטאים את הרצפטורים הם צהובים בתנאי אור בשונה מקאלוס לבנבן של תאי גאמי לא מותמרים. העולתה השערה שמדובר בתגובת התגוננות מעקת אור וכרגע נערך ניסיון לזיהוי מטבוליטים שרמתם עולה באמצעות אנליזה של מיצויים ב-HPLC. ניסיון ראשוני הראה הבדל ברמתם של שני חומרים בלתי מזוהים (התוצאות לא מובאות).

בשנה האחרונה נפתרה בעיית הרגנרציה של הטרנספורמנטים ונעשתה טרנספורמציה של הקונסטראקט המבטא ביתר PSK1 גם לקו תאים שאפשר רגנרציה. בנקודת הזמן הנוכחית קיימים בידינו מספר שתילי גפן טרנסגניים שעדיין לא נבחנו עבורם רמת הטרנסקריפט המיוצר. בנקודת הזמן הנוכחית הם אינם מראים שוני בהשוואה לצמחי בקורת. לבחינת השפעת השבתת ביטוי מהגן על פעילות התאים בתרבית ועל התפתחות הגפן השתמשנו בטכנולוגיית synthetic microRNAs. תכננו מבנה hairpin שיאפשר השתקה בו-זמנית של כל הגנים במשפחה באמצעות רצף שמור אחד. על סמך השוואה של 4 הגנים איתרנו רצף של 21bp שישמש לבניית synthetic microRNA על פי הנחיות שנוסחו על ידי ד"ר יובל אשד. מקטע זה הוא חלק ממקטע ארוך יותר של microRNA טבעי וידוע. synthetic microRNA שובט לתוך וקטור של pER10 תחת בקרת פרומוטור אינדיוסאבילי המופעל על ידי מתן חיצוני של אסטרדיול. נערכה טרנספורמציה לתאי אגרובקטריום מזן ותאים אלו שימשו לטרנספורמציה של תרבית גפן מזן גאמי שאינה עוברת רגנרציה. תאים טראנספורמנטים נבדקו לנוכחות מקטע ההשתקה ברמת ה-DNA ונמצאו חיוביים.

הפעלה ע"י אסטרדיול נערכה בריכוזים של 5, 10, 20  $\mu\text{M}$ . נבדקה תגובת התאים לאינדוקציה לאחר פרקי זמן קצרים (שעות) וארוכים (ימים). על בסיס נסיונות ראשוניים וסקירת ספרות הוחלט להתרכז באינדוקציות הקצרות של מספר שעות: 2, 4, 6, 8. כרגע אין כל שינוי בפנוטיפ בתנאים אינדוקטיביים ויש לבחון את רמת ההשתקה של כל גן לפני

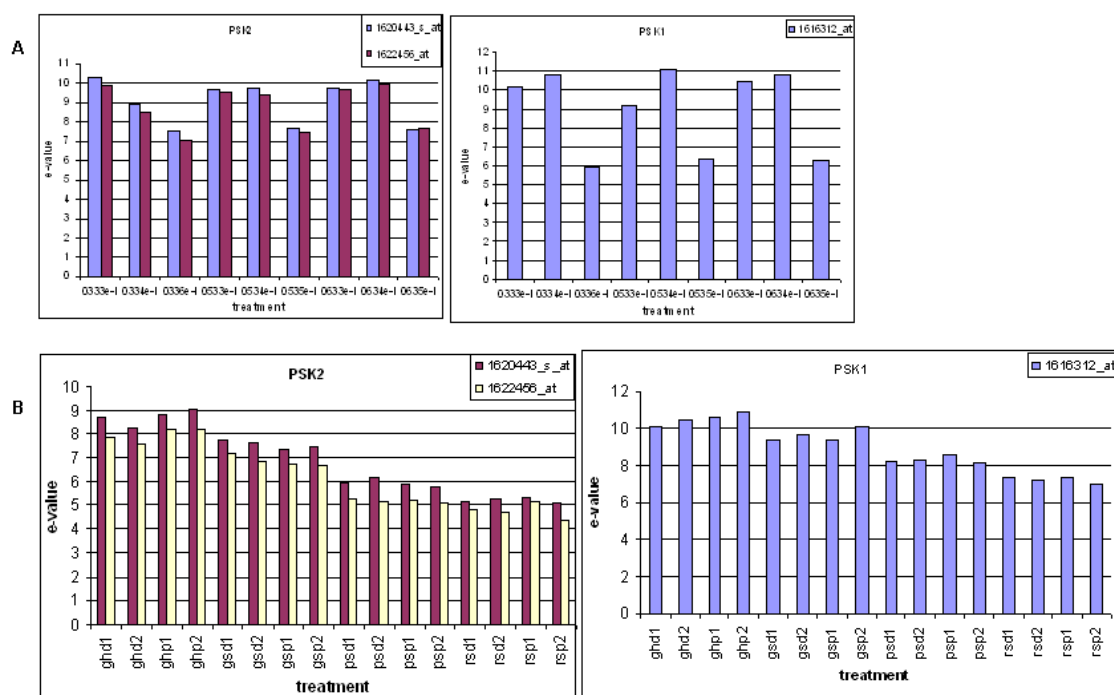
הסקה או שינוי בתנאי הבחינה. הסיגנלים באנליזת northern לבחינת רמת ארבעת הטראנסקריפטים של PSK היו נמוכים גם בתנאים שאינם מפעילים את ביטוי המיניגן, אולי כנראה משום שהגלאי הוא קטן מאוד ומפריע לסימון יעיל. בחינה חלופית תערך באמצעות סימון קצה או בשיטה רגישה יותר – Real Time PCR.

כאמור במבוא אינטגרציה של נתונים מעבודות חדשות שהתפרסמו מראה כי ביטוי יתר של גן יחיד, PSK או הרצפטור, וגם מוטציה בגן יחיד לא הראתה כל השפעה בולטת על הפנוטיפ בתנאי גידול רגילים (Howel et al., Plant journal 2008 Kutschamar et al., New phytologist 2008). כמוכן יש תפקוד חופף של יותר מפפטיד אחד (PSK ו-PSI) ותפקוד חופף של שלושה רצפטורים (שניים ל-PSK ואחד ל-PSI) ונדרשה השבתה של שניים או שלושה מהם במקביל על מנת לקבל פנוטיפ של עיכוב צמיחה (Amano et al., PNAS 2007 Kutschamar et al., New phytologist 2008). ממצאים אלו תומכים בתוצאות שהתקבלו במחקר הנוכחי שלא הראו שינוי בולט בפנוטיפ בהשפעת ביטוי יתר של 1PSK והרצפטור. המסקנה המצערת היא שלמרות המאמץ הרב שהושקע בניסיונות ההתמרה לא התקדמו עד כה בהבנת תפקידו של הפיטוסולפוקין מגפן בתרבות או בצמח השלם.

### ביטוי בגפן בתגובה לעקה

החידוש החשוב ביותר בעבודות מהשנה האחרונה שהוזכרו במבוא עקת משרות ביטוי מהגן לפפטיד וכי נדרשת עקה כמו פציעה או הכנסת אקספלט לתרבות על מנת לקבל פפטיד סופי מעובד מהפרקורסור (ראה מבוא). על בסיס זה התחלנו לבחון תגובת הגן מגפן לעקות.

אנליזה של נתונים ממספר נסיונות שתעדו שינויים בטרנסקריפטום הגפן באמצעות ציפים של אפימטריקס שהכילו 16 אלף יוניגנים מגפן ואת ארבעת הגנים לפיטוסולפוקין ביניהם, לא הראתה אינדוקציה של ביטוי הגנים בטווח זמנים קצר לאחר הצמאה, המלחה או הדבקה בוירוס אולם נמצאה עלייה בביטויים בטווח זמנים ארוך יותר (16 יום) לאחר המלחה והצמאה (הנתונים לא מובאים עקב מגבלת נפח הדו"ח). בנוסף, במספר נסיונות בלתי תלויים נמצאה ירידה בולטת בביטויים של 1PSK ו-2PSK אחרי שלב הבוחל שבו יש שינויים מאוד דרמטיים הכוללים בין היתר עלייה ברמת אתילן ועקה חמצונית במקביל להתחלה של צבירת סוכר (תמונה 15).

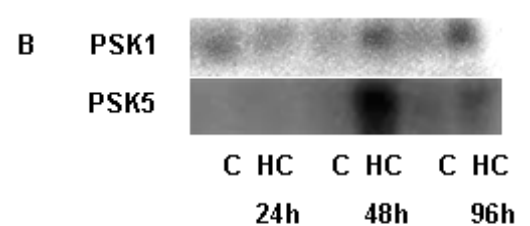
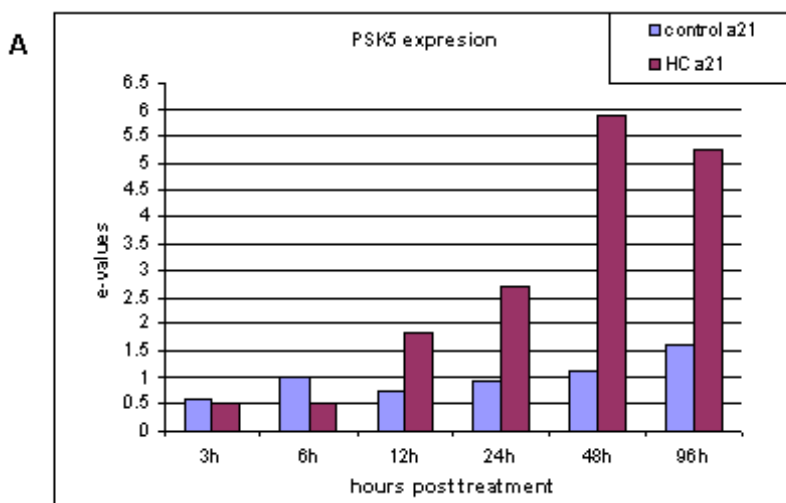


תמונה 15: דגם ביטוי של 1PSK ו-2PSK בפרי בוגר על בסיס אנליזה של נתונים ממאגרי האתר pleXdb

פנל A – ביטוי של הגנים בגרגרי פינט-נואר במהלך הבשלה כפי שמוצע ממעקב בן 3 שנים. L-33E - לפני הבוחל כאשר הגרגרים עדיין ירוקים וקשים וצוברים חומצה מאלית. L-34E – נקודת טרום בוחל- גרגר ירוק עם רמה מקסימלית של חומצה. L-36E - לאחר בוחל - ירידה ברמת חומצה, עלייה ברמת סוכרתהליך, גדילה מהירה, שינוי צבע בפרי.  
 פנל B - המתמקד ברמות ביטוי של הגנים השונים בגרגרים בודדים הממוקמים במקומות שונים על האשכול ובמועדי הבשלה שונים. D- מרוחק, P- קרוב יותר, 1, 2 – גפנים, gh - שלב ירוק גרגר קשה, gs - שלב ירוק גרגר רך, ps - שריר צבע רך, rs - אדום רך.

במחקר הנעשה במעבדתנו להבנת המנגנון המוביל לשבירת תרדמה בפקעים הוכחנו התפתחות מצב עקה אוקסידטיבית זמנית בעלת מאפיינים אנארוביים בתגובה לטיפולם שוברי תרדמה. על בסיס הממצאים שפורסמו לאחרונה לגבי אינדוקציה של פיטוסולפוקין במצבי עקה הועלתה ההשערה כי רמתו פיטוסולפוקין תעלה בתגובה לטיפול ואכן גם PSK1 וגם PSK5 הראו עלייה בולטת בביטויים בהשפעת טיפול בציאנמיד חומצי וגם בהשפעת חשיפה לקור על פי נתוני היברידיזציה לציפים ועל פי ולידציה באמצעות northern blot (תמונה 16).

העובדה שבשתי המערכות, פרי בואריזון ופקע המגיב לשוברי תרדמה, יש מעורבות של ABA ואתילן עשויה להציע כי פיטוסולפוקין עשוי להיות מעורב בהעברת סיגנלים דומים בפקע המתעורר ובגרגר המבשיל. גם העלייה בביטוי פיטוסולפוקין בשלב החשיפה לאור של עוברים בתרבות עשויה להיות תלויה עקה. ההסתכלות על פיטוסולפוקין כחלק ממערכת התגובה לעקה מהווה אולי פתח להבנת תפקידו. שינוי כיוון המחקר באמצעות הצבה של סדרת שאלות למחקר עתידי עשוי להביא לבירור מהות מעורבותו במצבי עקה שונים.



**תמונה 16: בחינת דגם הביטוי של PSK**  
**בפקעים כתוצאה מטיפול ב- HC.**

פנל A: דגם ביטוי של PSK5 בפקעים בוגרים מטופלים בציאנמיד חומצי ובפקעי ביקורת-נתונים מתוך אנליזה כוללת של הטרנסקריפטום בציפים ייעודיים (Ophir et al., 2009. PMB). פנל B – אנליזת Northern עבור אותן דוגמאות עם גלאים ל-1PSK ו-PSK מגפן.

### סינטיזת הפפטיד והנוגדנים

לבחינת השפעתו הביולוגית של פיטוסולפוקין-אלפא ולמעקב אחר ביטוי ברקמה, תכננו לסנתז פפטיד שימש גם להכנת נוגדנים באמצעות מעבדת שירות.

מאחר וזהו פפטיד קצר המכיל שתי אתרי סולפונציה על שני טירוזינים הסתבר בבירורים שערכנו כי המשימה של ייצוב הסולפונציות אינה טריוויאלית וקיים חשש להסרתם בסביבה חומצית. לשם כך עסקנו ראשית בבחינה של אפשרות גידול התאים ב-pH ניטרלי.

תרבויות אמבריוגניות מזן Superior גודלו באור בתנאים שונים תוך כדי בדיקת פרמטרים רבים של המטריצה המורכבת מסוג מצע מזון, pH התחלתי של מצע ותוספים מייצבי pH בריכוזים שונים. pH נמדד לפני עיקור המצעים ולאחריו, ועל בסיס יומי במשך כל 7 ימי גידול עד להחלפת המצע. בנוסף עקבנו אחר רגנרציה של התרבית ויצירת עוברים, דבר המצביע על התפתחות תקינה של העוברים שנחשפים לאור וניתנת להם האפשרות ליצור עוברים ובהמשך צמחונים (תמונה 12).

מצע מזון	MGN, NN, NIT
pH התחלתי	8, 7.5, 7
מייצבי pH	HEPES, MES, PIPES
ריכוז מייצבי pH	10, 25, 50, 75, 100 mM

מניסויים אלו למדנו כי התנאים האופטימליים לשמירת התאים הם: NIT, 50mM HEPES –pH7.5. **לצערנו לא התאפשרה סינתזת הפפטיד המסולפן ולפיכך גם לא הוכנו נוגדנים.** בכירורים שערכנו עם מספר גורמים העוסקים בסינתזת פפטידים רב הייצרנים סרבו לקחת על עצמם את המשימה עקב הקושי בייצוב הסולפונציות ולכן חוסר האפשרות להתחייב על איכות התוצר. שתי המעבדות המובילות בעולם בסינתזת פפטידים אליהם הופנינו לאחר דיון ע"י מומחי פפטידים בארץ (מנהל יחידת הפפטידים בטבע, פרופ' מתי פרידקין בוויצמן) הסכימו לסנתז את הפפטיד אולם העלו חששות מהותיים לשמור על יציבותו ובנוסף דרשו סכומי עתק עבור סינתזה של כמות מזערית שלא תספיק לנסיונות אפליקציה אקסוגנית ( בין 20 ל-30 אלף שקלים) שלא היו אפשריים מבחינת התקציב שעמד לרשותנו (שחלקו לא הגיע עד היום ממועצת הפירות).

### **נסיון לכימות הפפטיד על בסיס שימוש ב LC-MS**

בהתייעצות עם המומחים ובבחינה חוזרת של המשימה הועלתה אפשרות של ניקוי הפפטיד ממדיום הגידול באמצעות שימוש בהפרדה על בסיס מטען ובהמשך זיהוי באמצעות LC-MS. הרציונל היה שבמידה וניתן יהיה לזהות את הפפטיד במדיום תסונתז כמות קטנה של הפפטיד באחת משתי המעבדות שתוארו ויעשה בו שימוש כסטנדרט באנליזות לכימות על בסיס שימוש ב-LC-MS.

בנסיונות שנעשו תוך הסתייעות במחלקה לכימיה באוניברסיטה העברית ניסינו לזהות את הפפטיד במדיום של תרבית תאים טרנסגניים של גפן. המדיום נוקה דרך קולונה על בסיס מחליף יונים חלש DEAE-Sephadex, עבר ניקוי נוסף ב-HPLC ונעשו נסיונות זיהוי באמצעות MALDI ו-LC-MS. לצערנו לא הצלחנו לזהות את הפפטיד או הפרקורסור ואחת המכשלות היא העדר סטנדרט להרצה.

במחקר שנעשה לאחרונה על ידי קבוצה אירופית שבחנה השפעות של הפפטיד על שורשים ( Kutschamar et al., New phytologist 2008) נמצאה השפעה מובהקת גם לפפטיד הלא מסולפן, אם כי קטנה יותר מהשפעתו של הפפטיד המסולפן. זאת בניגוד למסקנות הגורפות של הקבוצה המרכזית (ועד לאחרונה היחידה) העוסקת בנושא ביפן שגרסה כי הפפטיד הלא מסולפן אינו פעיל כלל-מסקנות שעליהן הסתמכנו עד כה. על בסיס התוצאות החדשות שהתפרסמו הזמנו וקבלנו בסוף אוגוסט 2009 פפטיד לא מסולפן כדי לנסות לבחון את השפעתו על תרביות גפן. נשקול בעתיד אפשרות לשימוש בפפטיד זה כסטנדרט וננסה לזהות פפטיד לא מסולפן במדיום מתוך הנחה שחלק מהפפטיד עובר למצב לא מסולפן במדיום.

## סיכום

### מטרות המחקר

זיהוי ואפיון משפחת גנים המקודדת לפפטיד פיטוסולפוקין ונסיון להבנת תפקידו בגפן.

### עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח

אותרו ארבעה גנים מהמשפחה ברצף הגנום של גפן ונערכה אנליזה ביואינפורמטית משווה המצביעה על שימור הקצה הקרבוקסי טרמינלי המקדד לפרקורסור של הפפטיד גם בצמחים אחרים. מסגרות הקריאה והפרומוטורים שובטו. אותר ושובט גם ההומולוג של גפן לרצפטור AtPSKR1 לפיטוסולפוקין. נבנו קונסטראקטים לביטוי מוגבר של הרצפטור ושל VvPSK1 ונערכו טרנספורמציות לטבק ולקאלוס של גפן ויש טראנסגנים בכל המערכות. לא נראה פנוטיפ מורפולוגי בולט בצמחי טבק, בקאלוס של גפן ובצמחוני גפן טרנסגנים עד כה. הממצא היחיד הוא הצהבת קאלוסים טרנסגניים בתנאי הארה בהשוואה לצבעו הלבן של קאלוס של תאי הבקורת. נבנה גם מיניגן תחת פרומוטור אידיוסאבילי להשבתת ביטויים של כל ארבעת הגנים במקביל. הקאלוס שאמור לבטא מבנה זה אינו מראה עדיין פנוטיפ אולם בחינתו עדיין לא הסתיימה.

נלמד דגם ביטויים של שניים מהגנים (VvPSK1 ו-VvPSK5) באיברי הצמח השונים, במהלך התפתחות תפוחת וגרגר, במהלך אמבריוגנזה ובתגובה לעקה חמצונית ועקת קור בפקעים. נמצאו הבדלים בדגמי הביטוי אולם ככלל יש ביטוי גבוה בתפוחת ובחנט צעיר, הביטוי יורד בהמשך אך עולה בזמן ואריזון ויורד שוב בהמשך. נמצאה אינדוקציה בולטת של שני הגנים במהלך יצירת עוברים בתרבית ובפקעים שטופלו ב שוברי תרדמה המפעילים עקה נשימתית וייצור אתילן.

### המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו

העדר פנוטיפ בולט בעקבות ביטוי יתר והשבתה של גן יחיד לרצפטור או לפיטוסולפוקין לא מאפשר הסקה לגבי תפקיד הפפטיד בשלב זה. תופעה דומה נמצאה לאחרונה במחקר בנושא במערכות צמחיות אחרות ורק השבתה בו זמנית של שלושה רצפטורים לשני פפטידים בעלי חפיפה תפקודית הצביעה על פנוטיפ של נינוס/עיכוב צמיחה. העובדה כי מערכות הסינתזה והעיבוד של הפפטיד מופעלות בזמן עקה הוכחה לאחרונה באורז ובארבידופסיס וממצאינו תומכים בתפקיד דומה בפקעים ובפרי במבשיל בגפן. בכמה מן המערכות האמורות יש עקה נשימתית ובקרת צמיחה ע"י אינטראקציה בין אתילן, חומצה אבסיסית וג'יברלין. מועלית ההיפותזה כי ייצור ועיבוד הפפטיד מושרה ע"י אתילן ומתווך בינו לבין מטבוליזם וחישת ג'יברלין. היפותזה זו תבחן בהמשך.

### פרסום הדו"ח

ניתן לפרסם את הדו"ח ללא הגבלה.