

**תפקידי הריבונוקליאז LX בעגבנייה  
ומעורבותו האפשרית בתהליכי מוות מתוכנת**

**עבודת-גמר**

**מוגשת לפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה**

**של האוניברסיטה העברית בירושלים**

**לשם קבלת תואר 'מוסמך למדעי החקלאות'**

**מאת**

**טל בר**

**עבודה זו נעשתה בהדרכתם של:**

**ד"ר אמנון לרס**

**המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר קטיף**

**מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני**

**וד"ר נעמי אורי**

**המכון למדעי הצמח וגנטיקה חקלאית**

**הפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה**

**האוניברסיטה העברית בירושלים**

## תקציר

ריבונוקליאזות הם אנזימים שמפרקים מולקולות RNA ומעורבים בהיבטים שונים של מטבוליזם שלהם. אחת מקבוצות הריבונוקליאזות המכונה T2/S-like שמורה במבנה החלבון במגוון אורגניזמים בטבע, ופעילותם האנזימתית לא נמצאה כבעלת ספציפיות לרצפים מסוימים במולקולות ה-RNA. על אף תפוצתם הנרחבת וחשיבות המולקולות אותן הם מפרקים, מידע אודות תפקידם הביולוגי הינו מוגבל. הריבונוקליאזות הכלולות בקבוצת T2/S-like הוצעו כמשתתפות במטבוליזם זרחן בצמח, בהזדקנות עלים ובתהליכי מוות מתוכנת בצמח. מטרתה המרכזית של העבודה הנוכחית הייתה ללמוד אודות תפקידי הריבונוקליאז LX, הנכלל במשפחת ה-T2/S-like, וזאת באמצעות אפיון צמחי עגבנייה טרנסגנים בהם ביטוי הגן לריבונוקליאז LX עוכב על ידי החדרת עותק אנטי-סנס לגן.

במחקר קודם נמצא כי בצמחים שמעוכבים בביטוי LX ישנה דחייה בהזדקנות עלים ובנשירת עלים בהשוואה לצמחים מזן הבר. בעבודת המשך זו העמקנו וביססנו את הממצאים לגבי מעורבות LX בהזדקנות עלים. עוד הראנו כי בנוסף למעורבותו בנשירת עלים, LX מעורב בתהליך נשירת פרחים, על פי הדחייה שנמצאה בתהליכי נשירת פרחים בצמחים הטרנסגנים. בקרת רמת LX על ידי ההורמונים אוקסין ואתילן הראתה השראת ביטוי הגן על ידי אתילן ומניעת השראה זו על ידי טיפול מקדים באוקסין. אופן בקרה זה מתאים למעורבות LX בתהליך הנשירה, כיוון שהמודל המקובל הוא שאוקסין מעכב ואתילן מזרז את התקדמות תהליך הנשירה. הממצאים המפתיעים אודות מעורבות LX בתהליך הנשירה הביאו אותנו להעלות את ההשערה לפיה ברקמת הניתוק מתרחש תהליך של מוות מתוכנת. אכן במסגרת העבודה אובחנו מספר סמנים למוות מתוכנת, כגון ביטוי הגן *Le-pirin* והיווצרות צורוני חמצן ריאקטיביים, שהתגברו באופן ספציפי ברקמת הניתוק, במהלך תהליך הנשירה. בגישה מחקרית נוספת נבחנו צמחי עגבנייה טרנסגנים שמבטאים גן אנימאלי המקודד למעכב תהליכי מוות אפופטוטיים בבעלי-חיים ובהם נמדד עיכוב של תהליכי נשירת עלים ופרחים לעומת צמחי זן הבר.

הגברה בביטוי LX בעקבות הרעבה לזרחן, ותפקידו המוצע במטבוליזם זרחן בצמח, הובילו אותנו לבחון את פנוטיפ הצמחים המעוכבים בביטוי LX לעומת צמחי זן הבר בתנאי הרעבה לזרחן. בתנאי מחסור מוחלט לזרחן החלו להיווצר נקרוזות על גבי העלים אשר הלכו וגדלו עד מות כל העלה. מהשוואת קווי הצמחים התגלה שתופעת מוות התאים נדחתה באופן משמעותי בצמחים בהם ביטוי הגן ל-LX עוכב לעומת זן הבר. אנו מניחים כי כתוצאה מגידול צמחים בתנאי מחסור לזרחן מושרה תהליך מוות מתוכנת, וכי LX מעורב בתהליך מוות זה. אכן סמנים של מוות מתוכנת, כגון עליה בביטוי נוקליאז והגברה ברגישות לאתילן, אובחנו בעלים שגדלו במחסור לזרחן.

ממצאי עבודה זו תומכים בכך שריבונוקליאז LX מעורב בתהליכי מוות מתוכנת בצמחי עגבנייה שכוללים הזדקנות עלים, נשירת פרחים, והתפתחות נקרוזות בתנאים של גידול במחסור חמור לזרחן, וזאת כיוון שעיכוב ביטוי בצמחים הטרנסגנים גרם לדחייה בתהליכים הללו בצמחים.

## תוכן עניינים

4	רשימת קיצורים.....
5	1. סקירת ספרות.....
5	1.1. ריבונקליאזות.....
5	1.2. ריבונקליאזות ממשפחת T2 בצמחים.....
7	1.3. הזדקנות עלים ומעורבות ריבונקליאזות בתהליך.....
8	1.4. עקת זרחן ומעורבות ריבונקליאזות בתגובה לה.....
9	1.5. תהליכי מוות מתוכנת ומעורבותן של ריבונקליאזות.....
10	1.6. תהליכי נשירה.....
11	1.7. ריבונקליאז LX.....
12	מטרות העבודה.....
13	2. שיטות וחומרים.....
20	3. תוצאות.....
20	3.1. אפיון מעורבות LX בתהליך הזדקנות עלים.....
24	3.2. אפיון מעורבות LX בתהליכי ניתוק פרחים.....
26	3.2.1. ביטוי החלבון ריבונקליאז LX ברקמות ניתוק של פרחים.....
28	3.2.2. תבנית ביטוי החלבון LX בתגובה למתן ההורמונים הצמחיים אתילן ואוקסין.....
29	3.3. בחינת ההיפותזה לפיה מנגנוני מוות מתוכנת מעורבים בתהליך ניתוק איברים.....
29	3.3.1. ביטוי הגן <i>Le-pirin</i> ברקמת הניתוק כסמן לתהליכי מוות מתוכנת.....
30	3.3.2. נוכחות reactive oxygen species ברקמות ניתוק של פרחים ועלים.....
32	3.3.3. השפעת הגן למעכב אפופטוטי על קינטיקה של נשירת עלים ופרחים.....
32	3.3.3.1. נשירת עלים בצמחים שמבטאים גן אנטיאפופטוטי.....
35	3.3.3.2. נשירת פרחים בצמחים שמבטאים גן אנטיאפופטוטי.....
36	3.4. מעורבות הגן לריבונקליאז LX בתהליכי מוות המופעלים בתנאי הרעבה לזרחן.....
36	3.4.1. התפתחות נקרוזות בהרעבה לזרחן.....
38	3.4.2. השפעת הרעבה לזרחן על זליגת יונים מהעלים.....
40	3.4.3. אפיון תופעת היווצרות הנקרוזות.....
40	3.4.3.1. אנליזת פעילות נוקליאזות בעלי עגבנייה שגודלו בתנאי הרעבה לזרחן.....
41	3.4.3.2. השפעת ההורמון אתילן על היווצרות נקרוזות בתנאי הרעבה לזרחן.....
42	3.4.3.3. השפעת מעכב פעילות האתילן 1-MCP על היווצרות הנקרוזות בתנאי מחסור בזרחן.....
46	4. דיון.....
54	5. רשימת ספרות.....
I	תקציר באנגלית.....

1-MCP, 1-methylcyclopropene  
2,4-D, dichlorophenoxyacetic acid  
AZ, Abscission Zone  
DCF, 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate  
GUS,  $\beta$ -glucuronidase  
HR, hypersensitive response  
IAP, inhibitor of apoptosis protein  
PCD, programmed cell death  
PCR, polymerase chain reaction  
PSR1, phosphorus starvation response  
RNases, ribonucleases  
ROS, reactive oxygen species  
SAGs, senescence associated genes  
SAR, systemic acquired resistance  
SDS, sodium dodecyl sulfate  
TBS, tris buffered saline  
TMV, tobacco mosaic virus

## 1. סקירת ספרות

### 1.1. ריבונוקליאזות

ריבונוקליאזות (Ribonucleases, RNases) הם אנזימים בעלי חשיבות גדולה במטבוליזם של RNA בכל האורגניזמים. הם מפרקים חומצות נוקליאיות מסוג RNA וניתן לחלקם לקבוצות שונות על פי המבנה והמיקום שלהם בתאים, הרצף בסובסטרט ה-RNA אותו הם מפרקים וה-pH האופטימלי לפעילותם. בחלוקה לפי דרגת החומציות המיטבית לפעילותם ניתן להגדיר 4 קבוצות מרכזיות. חלבונים מקבוצת RNase T1, שפעילים בתנאים בסיסיים, נפוצים בעיקר בפטריות ובבקטריות. קבוצה נוספת של חלבונים שפעילים בתנאים בסיסיים היא RNase A הקרויה על שם החלבון הידוע ביותר שלה, bovine RNase A אשר פעיל בלב לב ובבלוטות רוק של יונקים (Irie, 1999). החלבון onconase מביצי צפרדע, ששייך לקבוצה זו, נמצא כבעל פעילות אנטי סרטנית (Suhasini and Sirdeshmukh, 2006). קבוצת חלבונים שפעילה בתנאים חומציים נקראת RNase 2, והם נפוצים בכבד, בטחול, בשתן ובתאי דם לבנים של בעלי חוליות. הם דומים ברצף החלבון ל-RNase A ונמצאו כבעלי פעילות רעילה כנגד בקטריות, רטרו וירוסים וגיידולים סרטניים (Irie, 1999). משפחת הריבונוקליאזות הנפוצה ביותר היא RNase T2 והיא קרויה כך על שם נציגה הידוע ביותר, הריבונוקליאז T2 שאופיין בפטריות. נציגים שלה נמצאו בוירוסים, בחיידקים, בצמחים וביונקים. אנזימים ממשפחה זו פעילים בתנאים חומציים, ופירוק ה-RNA מתבצע לרוב ללא ספציפיות גבוהה לרצפים מסוימים במולקולות הסובסטרט (Bariola and Green, 1997). במסגרת עבודה זו בוצע מחקר ללימוד תפקידו של הריבונוקליאז LX (LX) מעגבנייה (*Solanum lycopersicum*) המשתייך למשפחת T2.

### 1.2. ריבונוקליאזות ממשפחת T2 בצמחים

פעילות ריבונוקליאזות ממשפחת T2 זוהתה בצמחים במגוון איברים כדוגמת עמוד העלי, פירות, זרעים וטרכיאות בשלב ההתמיינות לצרורות הובלה. במחקרים שונים לזיהוי מיקומם של אנזימים אלו בתאים נמצא שהם יכולים להיות בציטופלסמה (Intracellular), מחוץ לתא (Extracellular) או בחללית (Vacuolar) (Deshpande and Shankar, 2002).

הריבונוקליאז הנחקר ביותר ממשפחת T2 בצמחים הוא S-RNase, והוא גם היחיד אשר קיים ידע לגבי תפקידו הביולוגי במנגנון אי-ההתאם העצמי. ריבונוקליאז זה מושרה בעמוד העלי של פרחים בעלי תכונה של אי-התאם עצמי, שם פעילותו האנזימית דרושה לצורך דחייה של גרגר האבקה הזכרי הנושא אלל S זהה לזה של הנקבה (Huang et al., 1994; Lee et al., 1994). כל האנזימים הנוספים בצמחים השייכים לקבוצת ה-T2 ואשר הינם בעלי הומולוגיה גבוהה ברצף החלבון לזה של הריבונוקליאז S-RNase, אך אינם מעורבים במנגנון אי-ההתאם העצמי, מכונים S-like RNase (Bariola and Green, 1997).

פרט ל-S-RNase, מעט ידוע בצמחים, כמו גם באורגניזמים אחרים, על תפקידם הביולוגי של הריבונוקליאזות ממשפחת T2. במהלך השנים הועלו השערות שונות לגבי תפקידם, בעיקר על סמך מיקומם המשוער בתא ותבנית ביטוי הגנים המקודדים להם. התפקידים המרכזיים אותם מייחסים לריבונוקליאזות בצמחים הם מעורבות בתהליכי

הזדקנות בצמח, ובמיוחד בשלב המתקדם של התהליך בו מתקיים מיחזור של מקרומולקולות לחומרי הזנה שונים. ההנחה היא שהם מעורבים במיחזור הזרחן בצמח על-ידי שחרורו ממולקולות RNA לאחר פירוקן. פירוק זה מאפשר את ייצוא הזרחן לרקמות מבלע בצמח (Deshpande and Shankar, 2002). בדומה לכך, ועל סמך השראת ביטוי ריבונוקליאזות בתנאי הרעבה לזרחן, מייחסים להם תפקיד במטבוליזם של זרחן בתגובה למחסור לו במהלך הגידול, ועוד לפני שלב ההזדקנות (Bariola and Green, 1997). בנוסף, מייחסים לריבונוקליאזות תפקיד בתהליכי מוות מתוכנת (programmed cell death, PCD) בצמח ובהגנה מפני פתוגנים (Deshpande and Shankar, 2002). תהליך הזדקנות עלים, תגובת צמחים למחסור בזרחן ותהליכי מוות מתוכנת שבהם מתמקדת עבודה זו, והתפקידים המוצעים לריבונוקליאזות בתהליכים אלו, יפורטו בהמשך פרק המבוא.

תמיכה לתפקידם האפשרי של ריבונוקליאזות במיחזור זרחן בצמח מתקבלת משתי עבודות שונות עם צמחים טרנסגנים שמעוכבים בביטוי ריבונוקליאזות מטיפוס ה- *LX :S-like* מעגבנייה ו- *RNS1* ו- *RNS2* מארבידופסיס (*Arabidopsis thaliana*). כאשר גודלו צמחים טרנסגנים אלה בתנאי מחסור לזרחן, הם הראו צבירה מוגברת של אנתוציאנינים לעומת צמחי זן הבר. מפני שהצטברות אנתוציאנינים מאפיינת צמחים שנתונים בתנאי עקת זרחן, הוצע כי בצמחים הטרנסגנים המעוכבים בביטוי ריבונוקליאזות נפגעה יכולת מיחזור הזרחן מעלי המקור לעלי המבלע (Bariola et al., 1999; Lers et al., 2006).

בנוסף הועלתה השערה, שריבונוקליאזות משתתפות במנגנוני הגנה מפני חדירת פתוגנים לצמח. השערה זו התבססה, בין היתר, על התצפיות שריבונוקליאזות רבות מושרות בעקבות פגיעה, מאחר והתקפה על-ידי פתוגנים מתרחשת לרוב תוך פגיעה מכאנית של הרקמה הצמחית. הגנים לריבונוקליאזות *ZRNaseII* מהצמח ציניה (Ye and Droste, 1996), *LE* מעגבנייה (Lers et al., 1998; Kock et al., 2004) וההומולוג לו מטבק *NW* (Kurata et al., 2002), שופעלו בצורה ניכרת בעקבות פגיעה של הרקמה הצמחית. עוד הראו בארבידופסיס כי מתרחשת עליה בביטוי הגן לריבונוקליאז *RNS1* בעלה שעבר פגיעה מכאנית ואף בעלים סמוכים לו שלא עברו פגיעה כלל. מכאן הוסק, כי ריבונוקליאזות משתתפות בתגובה מערכתית של הצמח לפגיעה (LeBrasseur et al., 2002). עדות נוספת לתפקיד ריבונוקליאז בהגנה מפני פתוגנים לקוחה מהצמח הטורף *Drosera adelaae*, בו נמצא כי החלבון ריבונוקליאז *DA-I*, מצוי בכמויות גדולות בנוזל הדביק שמעכל את הטרף. החוקרים מציעים כאן תפקיד כפול לריבונוקליאז, כמשחרר זרחן מה- RNA של הטרף ובכך הופך אותו זמין לצמח וכמנגנון הגנה של הצמח מפני פגיעה של פתוגנים (Okabe et al., 2005).

לאחרונה הוצעה תיאוריה חדשנית שעל פיה לריבונוקליאזות יש תפקיד בבקרה על חדירות ו/או יציבות של ממבראנות בתנאי עקה. זאת בעקבות מחקר בתאי שמר מהונדסים בהם שיבשו את ביטוי הגן לריבונוקליאז *RNY1*. בחשיפת התאים לתנאי עקת חום ועקה אוסמוטית התקבלו בקו המהונדס תאים מוגדלים ביחס לתאי שמר הבר (MacIntosh et al., 2001). מאחר ובעבודה קודמת הראו שמולקולות RNA נקשרות לממבראנות ושקשירה זו משנה את חדירות הממבראנה ליונים (Khvorova et al., 1999), הוצע מודל על ידי החוקרים לפיו בתנאי עקה מתרחש ייצוא של ריבונוקליאזות אל האפופלסט, שם הם מעכלים את מולקולות ה- RNA ובכך משפיעים על חדירותה ויציבותה של הממבראנה (MacIntosh et al., 2001). יחד עם זאת דרוש מחקר נוסף לביסוס תפקיד זה.

מעניין לציין כי הריבונליאז ACTIBIND מפטריית העובש השחור (*Aspergillus niger*) הוא בעל פעילות של קשירת אקטין, ובצמחים חלבון זה משבש את גדילת נחשון האבקה על-ידי שיבוש של רשת האקטין התאית. כיום ישנם מחקרים שבוחנים שימוש באנזים זה ובאנזימים הומולוגיים לו לעצירת גדילה של גידולים סרטניים על ידי הפרעה של מבנה האקטין שלהם (Roiz et al., 2006; Smirnoff et al., 2006).

### 1.3. הזדקנות עלים ומעורבות ריבונוקליאזות בתהליך

הזדקנות מהווה את השלב האחרון בהתפתחות איבר/צמח אשר מוביל למות התאים. קיום תהליך מאורגן של הזדקנות עלים מקנה יתרון לצמח וייתכן כי היה בעל חשיבות אבולוציונית. בעת הזדקנות מתרחש פירוק מקרומולקולות מתאים שסיימו את תפקידם ואינם מהווים יותר אתרי מקור לתוצרים פוטוסינטטיים. ייצוא של תוצרי הפירוק לתאים הזקוקים לחומרי הזנה בצמח (תאי מבלע), מאפשר ניצול יעיל של אותם חומרים ומינרלים שנצברו בצמח ושלרוב (בתנאים טבעיים) חסרים בקרקע. בשל העובדה כי תהליך ההזדקנות מושפע ממספר רב של גורמים סביבתיים והתפתחותיים, המחקר אודות אופן בקרתו והאלמנטים המרכזיים המשתתפים בו הינו בעייתי (Lim and Nam, 2005; Lers, 2007).

הזדקנות עלים מבוקרת על ידי מגוון אותות הן סביבתיים ואוטונומיים בצמח (Guo and Gan, 2005). אותות אוטונומיים הם גיל העלה (Hensel et al., 1993), גדילה רפרודוקטיבית בחלק ממיני הצמחים (Pic et al., 2002) הצטברות סוכרים (Wingler et al., 2006) והורמונים צמחיים שרמתם יכולה להשתנות בתגובה לגורמים חיצוניים ופנימיים. האתילן הוא ההורמון המזוהה ביותר עם התקדמות תהליך ההזדקנות, אך ישנן עדויות לפיהן יש חשיבות בהשראת תהליך ההזדקנות גם להורמונים חומצה ג'סמונית, חומצה סאליצילית וחומצה אבציסית, לעומת זאת ההורמון ציטוקינין פועל לדחיית תהליך ההזדקנות (Guo and Gan, 2005). גורמים חיצוניים שמזרזים הזדקנות עלים הם, בין היתר, התקפה על-ידי פתוגנים, מחסור בנוטריינטים כגון חנקן, מחסור במים, חושך או הצללה ועקה חימצונית כתוצאה מעוצמות קרינה גבוהות או אוזון (Buchanan-Wollaston et al., 2003). במהלך השראת והתקדמות תהליך ההזדקנות כתוצאה מהגורמים שתוארו לעיל יש הפעלה של גנים ספציפיים המכונים senescence associated genes (SAGs). גנים אלה מקודדים לחלבונים הממלאים תפקיד בתהליך, כגון אנזימים שמפרקים את מרכיבי התא או שמשתתפים בהפעלת/דיכוי ביטוי גנים המבקרים את תהליך ההזדקנות (Lim et al., 2007). חפיפה מסוימת התגלתה בזהות הגנים שביטויים עולה במהלך הזדקנות ובמהלך הדבקה על-ידי פתוגנים, תוצאה המצביעה על חפיפה מסוימת אפשרית בין שני התהליכים (Quirino et al., 2000).

תהליך הזדקנות העלה מאופיין חיצונית בשינוי צבע מירוק לצהוב באופן הבולט לעיין. ברמה המולקולארית מתרחשים מספר תהליכים חשובים המביאים בסופו של תהליך ההזדקנות למות התאים בעלה. שלב מרכזי בתהליך הוא הרס מערכת הפוטוסינתזה אשר מאופיין בפירוק מהיר של הכלורופיל. הכלורופיל הוא מולקולה בעלת ריאקטיביות גבוהה, ולכן יש יתרון בפירוקה המהיר, תוך נטרול רעילותה במטרה להגן על מרכיבי התא במהלך ההזדקנות (Buchanan-Wollaston et al., 2003). תהליך נוסף שמתרחש בעת הזדקנות עלים הוא פירוק מואץ של חלבונים וייצוא מרכיביהם המשמשים כמקור חשוב לנוטריינטים שונים ובמיוחד חנקן לרקמות מבלע. בתהליך



פירוק זה משתתפים אנזימים פרוטאוליטיים (מפרקים חלבון) כגון ציסטאין פרוטאז (Cysteine protease) (Buchanan-Wollaston et al., 2003) ומרכיבים של מערכת הפרוטאזום (Gepstein et al., 2003). לדוגמה הגן *ORE9* המקודד לחלבון F-box הוצע כבעל תפקיד בבקרת התקדמות ההזדקנות בארבידופסיס, על-ידי פרוטאוליזה תלויה מערכת היוביקוויטין (ubiquitin) של חלבונים המעורבים בדחיית ההזדקנות (Woo et al., 2001). במהלך ההזדקנות מתרחשת פגיעה במבנה ובתפקוד ממבראנות בתוך התא כתוצאה מהאצת פירוק של השומנים המרכיבים אותן. אנזימים כדוגמת פוספוליפאז (phospholipase D) וליפוקסיגנאז (lipoxygenase) אחראיים לפעולת הרס הממבראנות וביטוי הגנים המקודדים להם עולה בהזדקנות (Thompson et al., 1998). עיכוב ביטוי הגן *SAG101* המקודד לאנזים בעל פעילות של אציל הידולאז (acyl hydrolase) גרם לדחייה בקצב הזדקנות עלי ארבידופסיס, בעוד שביטוי ביתר שלו גרם להאצת הזדקנותם (He and Gan, 2002). בעקבות חשיבותם של תהליכי פירוק הכלורופיל והחלבון והירידה ביציבות הממבראנות בתהליך הזדקנות עלים, המדדים המקובלים במחקר לאפיון ותיעוד התקדמות שלבי התהליך הם תכולת הכלורופיל והחלבון בעלה ולעיתים גם מדידה של זליגת היונים מהתאים (בהתאמה).

במהלך הזדקנות עלים מתרחשת ירידה דרמטית בכמות ה-RNA הכללי בעלה (Lers et al., 1998). כיוון שפירוק RNA הוא מקור חשוב לזרחן, מקובל לחשוב שפירוקו בהזדקנות עלים מתבצע כחלק ממנגנון מיחזור וייצוא של הזרחן שמועבר לרקמות מבלע. פירוק ה-RNA יוצא לפועל באמצעות פעילות של נוקליאזות (מפרקות RNA וגם DNA) וריבונוקליאזות, שפעילותן וביטוי הגנים המקודדים להן עולה במהלך ההזדקנות ובמיוחד בשלבים המאוחרים של התהליך. לדוגמא נמצא, שרמת התעתיק של הגן לריבונוקליאז *RNS2* מארבידופסיס הצטברה בעת הזדקנות עלים ופרחים (Taylor et al., 1993). כמו כן גם ביטוי הריבונוקליאזות *RNS1* ו-*RNS3* מארבידופסיס עלה בעת הזדקנות, אך באופן מתון יותר (Bariola et al., 1994). עוד נמצא, כי הגן לריבונוקליאז *AhSL28* מלוע הארי (*Antirrhinum*) (Liang et al., 2002) שועתק בעת הזדקנות עלים.

#### 1.4. עקת זרחן ומעורבות ריבונוקליאזות בתגובה לה

זרחן הוא מינרל הדרוש בריכוזים גבוהים להתפתחות אופטימאלית של צמחים, אך בתנאי גידול טבעיים לרוב ריכוזו/או זמינותו בקרקע אינם גבוהים מספיק להתפתחותם האופטימאלית של צמחים. זרחן מהווה מרכיב חיוני במולקולות שונות כגון חומצות גרעין וחשוב לקיום תהליכים בסיסיים בתא כגון הפקת ואחסון אנרגיה או מטבוליזם של סוכרים. צמחים שומרים על ריכוז קבוע של זרחן בצייטופלסמה, דבר המתאפשר כתוצאה מאגירתו בחללית בתנאי גידול טובים ושחרורו לציטופלסמה בתנאי עקת מחסור בזרחן (Mimura, 1995). בצירוף עם הממצאים כי בחללית מתרחשת פעילות של פירוק RNA (Abel et al., 1990) נראה כי לחללית יש תפקיד מרכזי במטבוליזם של זרחן.

בתנאי הרעבה לזרחן מופעלים בצמח מנגנוני הסתגלות המאפשרים לצמחים לשרוד את העקה. הסתגלות זאת כוללת תגובות מורפולוגיות כגון גדילת שורשים מואצת שמגדילה את שטח המגע עם הקרקע ומאפשרת קליטה יעילה יותר של הזרחן (Abel et al., 2002). הסתגלות לעקת מחסור בזרחן ברמה המולקולארית כוללת הפעלת פקטורי שיעתוק, כדוגמת PSR1 (phosphorus starvation response) המפעיל גנים שמביאים להגברת קליטת

זרחן מהקרקה, וגנים שקשורים בנטרול האלקטרונים החופשיים שנוצרים בתנאי עקת זרחן כתוצאה מעקה חמצונית והוא חיוני לשרידות הצמח בתנאים אלו (Wykoff et al., 1999; Moseley et al., 2006). במחקר שבוצע לאחרונה נמצא כי בעקבות הרעבה לזרחן של צמחי ארבידופסיס מתקבלת השראה של ביטוי microRNA ספציפי, אשר מדכא גן מטרה ממשפחת E2, שהוא חלק ממערכת הפרוטאזום וכי אינטראקציה זו גורמת לשינוי בהובלה של הזרחן בצמח (Chiou et al., 2006).

אחת התגובות האופייניות לתנאי הרעבה לזרחן, אשר דווחה בצמחים שונים, היא עליה בפעילות ריבונוקליאזות וביטוי הגנים המקודדים להן. על כן רווחת ההנחה שלאנזימים אלו תפקיד במטבוליזם של זרחן בצמח. הדיווח הראשון לגבי ריבונוקליאז שפעילותו הוגברה בעקבות הרעבה לזרחן התקבל במסגרת לימוד תגובת תאי עגבנייה בתרבית במהלך העברתם ממצע שהכיל זרחן למצע חסר זרחן ובמחקר זה זוהה הריבונוקליאז LE (Nurnberger et al., 1990). ריבונוקליאזות נוספות שדווח על עליה בפעילותן כתגובה לתנאי מחסור בזרחן הם LX מעגבנייה (Loffler et al., 1992), RNS1 (Bariola et al., 1994) ו-RNS2 (Taylor et al., 1993) מארבידופסיס, NE מטבק (*Nicotiana tabacum*) (Dodds et al., 1996) ו-AhSL28 מלוע הארי (Liang et al., 2002).

### 1.5. תהליכי מוות מתוכנת ומעורבותן של ריבונוקליאזות

מוות מתוכנת מתאר תהליך של תמותת תאים או רקמה באופן ממוקד ואשר מותם והסרתם הכרחי לצורך התפתחותו הנורמאלית או שרידותו של הצמח (Rogers, 2005). תהליכי מוות מתוכנת בצמחים מתרחשים בשלבי התפתחות שונים וברקמות שונות, כגון מוות תאי האנדוספרם במהלך התפתחות זרעים (Young and Gallie, 2000), תמותת תאי שכבת האלורון (aleurone) בזרעים במהלך נביטה (Fath et al., 2000), התמיינות תאים לטרכיאיות בתהליך היווצרות העצה (Fukuda, 2000), התנוונות אברי רבייה בצמחים חד מיניים (van Doorn and Woltering, 2005), מוות תאים של 2-3 שכבות תאים בקצה השורש (root cap) במהלך גידול בכדי להקטין את חיכוך השורש עם הקרקע (פעולה שמזכירה תאי עור) (Rogers, 2005) ומות תאים במסגרת תגובת רגישות יתר (hypersensitive response, HR) להתקפת פתוגנים (Greenberg and Yao, 2004). תהליך הזדקנות עלים מוביל למוות מבוקר של תאים, אך הדעות חלוקות לגבי מידת הדמיון בין ההזדקנות לבין שאר תהליכי המוות המתוכנת המתרחשים בצמחים. יש הטוענים שיש דמיון ביניהם והזדקנות צריכה להיות מסווגת עם תהליכי מוות מתוכנת אחרים בצמח (van Doorn and Woltering, 2004) אך אחרים טוענים כי ההבדלים בין התהליכים הם עקרוניים ואין לסווגם יחד (Thomas et al., 2003).

שאלה נוספת אשר מעסיקה את החוקרים, ובה מתקיים דיון ומחקר היא מידת הדמיון או השוני בין תהליך מוות מתוכנת בבעלי-חיים המכונה אפופטוזיס (Apoptosis) לבין תהליכי מוות מתוכנת המתרחשים בצמחים. עד היום נראה שיחד עם קיום מאפיינים משותפים בין השניים, קיימים ביניהם הבדלים משמעותיים. תהליך מוות מתוכנת בבעלי-חיים מאופיין בהגברה של פעילות אנזימי קספאזות (caspases), שהינם בעלי פעילות פרוטאוליטית ומשתתפים כגורם מפתח בבקרת תהליך המוות (Sanmartin et al., 2005). בצמחים לא נמצאו גנים אורתולוגיים לקספאזות, אך נמצאו חלבונים בעלי פעילות של קספאזות (caspase-like activities) אשר ביטויים גובר עם התקדמות תהליכי מוות מתוכנת (Danon et al., 2004). מאורעות נוספים שמאפיינים מוות מתוכנת בצמחים

כוללים הצטברות מהירה של סידן תוך תאי, חיתוך ופרוק של ה-DNA הגרעיני, התפקעות החללית ושחרור לציטופלסמה של אנזימים הידרוליטיים שגורמים לעיכול מרכיבי התא, הצטברות מולקולות ריאקטיביות (reactive oxygen species, ROS) (Rogers, 2005), ושחרור של ציטוכרום c מהמיטוכונדריה (Vianello et al., 2007).

דיווחים שונים בצמחים קושרים בין עליה בפעילות אנזימים מפרקים חומצות נוקליאיות (ריבונוקליאזות ונוקליאזות) וביטוי הגנים המקודדים להם, לבין תהליכי מוות מתוכנת. לדוגמא, תגובת רגישות ביתר מתרחשת כחלק ממנגנון הגנה של צמחים מפני פתוגנים, על ידי האצת תהליכי מוות מתוכנת באזור פלישת הפתוגן, כך שההרס המהיר של הרקמה מונע את התבססות הפתוגן. הגברה בתעתיקי הגן ריבונוקליאז *NRG3* מתקבלת כ-48 שעות לאחר הדבקת צמחי טבק בוירוס ה-TMV (tobacco mosaic virus) הגורם לתגובת רגישות ביתר (Kurata et al., 2002). גם הגברה בפעילות נוקליאזות אובחנה בצמחי טבק לאחר הדבקה בוירוס ה-TMV (Mittler and Lam, 1995). הועלתה ההצעה כי נוקליאזות מפרקות את DNA הפתוגן הפולש, מקטינות את יכולת ההתרבות שלו בצמח, ובכך תורמות להגנה של הצמח מפני התפשטות הפתוגן (Mittler and Lam, 1997). אפשר להרחיב היפותזה זו גם לגבי פירוק RNA של הפתוגן הפולש על ידי ריבונוקליאזות. מספר עבודות מציעות תפקיד לריבונוקליאזות במנגנון הגנה מערכתי בפני התקפת פתוגנים. מנגנון ה-SAR (systemic acquired resistance) היא מערכת שמופעלת כאשר הצמח מותקף על-ידי פתוגן ומאופיינת בהשראת ביטוי של גנים רבים הקשורים להגנה מפני פתוגנים, כך שהצמח כולו הופך להיות עמיד בפני טווח רחב של פתוגנים (Durrant and Dong, 2004). כאשר בוצעה בטבק השראה לתגובת SAR ובעקבותיה הדבקה עם פטרייה פתוגנית, התקבלה הגברה בביטוי הגן ריבונוקליאז *NE* (Galiana et al., 1997) ופעילות האנזים NE אף הביאה לעיכוב בגדילת הפטרייה (Hugot et al., 2002).

זוהו מספר נוקליאזות המעורבות בתהליכי מוות מתוכנת בעלי חשיבות רבה להתפתחות צמחים. לדוגמא, הגנים *BEN1* משעורה (*Hordeum vulgare*) ו-*ZEN1* מצייניה (*Zinnia elegans*) הושרו במהלך הנביטה ובמהלך התמיינות לתאי עצה בהתאמה (Aoyagi et al., 1998). בהמשך הוצגה עדות ישירה לגבי מעורבות הנוקליאז *ZEN1* בתהליך התמיינות תאי עצה בציניה, והראו שהוא חיוני לעיכול ה-DNA בגרעין בזמן ההתמיינות וכי בהעדרו התהליך מדוכא (Ito and Fukuda, 2002).

## 1.6. תהליכי נשירה

היפרדות תאים זה מזה באופן מבוקר הינו תהליך הכרחי לצורך התפתחותם התקינה של צמחים (Jarvis et al., 2003). דוגמאות לכך ניתן למצוא לאורך חיי הצמח, החל בשלב הנביטה בה היפרדות תאים דרושה לשם פריצת נחשון הנביטה. בהמשך היפרדות תאים דרושה לריבוי המין כך שזרעים מופצים מהתרמיל הבוגר הודות לניתוקם מרקמת צמח האם ופרי נושר כאשר הוא בשל ונמצא בשלב המתאים על מנת להפיץ את הזרעים שלו (Roberts et al., 2002). ברמה הגידולית נשירת עלים פרחים ופירות משפיעה על איכות התוצרת החקלאית, ועל-כן יש לה ערך כלכלי רב. לדוגמא האטה בנשירה הינה תכונה נדרשת בתפרחות של פרחי קטיף, ובפירות עגבנייה מזן צ'רי שמשווקים באשכולות. מצד שני בגידולים מסוימים יש חשיבות רבה דווקא לזירוז הנשירה במועד המתאים וזאת

על מנת לאפשר קטיף יעיל יותר או ממוכן. לדוגמא זירוז ניתוק פירות דרוש בזיתים על-מנת לאפשר מסיק יעיל, או בהדרים על מנת לאפשר קטיף ממוכן. כמו כן בכותנה יש צורך להשרות את שילוך העלים לפני איסוף ההלקטים. תהליך הניתוק, הגורם לנשירת איבר מגוף הצמח מהווה למעשה את השלב ההתפתחותי האחרון של אותו איבר. עלה או פרח לא מופרה נושרים בעקבות הזדקנות או בעקבות האצת תהליך הניתוק על ידי עקות שונות והתקפה על-ידי פתוגנים. הניתוק של העלה/הפרח/הפרי מתרחש ברקמה הקרויה רקמת ניתוק (Abscission Zone, AZ). רקמה ייחודית זו כוללת מספר מצומצם של שכבות תאים שמתמיינים במהלך ההתפתחות בין האיבר שעתידי לנשור לבין גוף הצמח. תאים אלה הינם בעלי מבנה מורפולוגי ופיסיולוגי אופייני הנבדלים מזה של התאים הסמוכים להם על-גבי הגבעול (Osborne, 1989). רקמת הניתוק בנויה מתאי קולנכימה (Collenchyma) המוכרים כרקמה מחזקת של איברים וגטיביים. עובדה זו מרמזת על כך שבתאים אלו נעצרה ההתפתחות/ההתמיינות בשלב התפתחותי צעיר. בהתאם, התאים שעתידים להתפתח לרקמת הניתוק הינם קטנים, בעלי ציטופלסמה צפופה, מתחלקים בתדירות גבוהה ובעלי תכולת עמילן גבוהה, בעוד שרמת הליגנין בהם נמוכה, כנראה עקב יציבות הליגנין כנגד פעילות אנזימים הידרוליטיים (הדרושה לשם ניתוק הקשר הבין תאי) (Sexton and Roberts, 1982). רקמת הניתוק היא בעלת רגישות משתנה להורמונים אוקסין ואתילן. המודל המקובל היום בקרב מדענים הוא ששטף האוקסין המגיע לרקמת הניתוק מטרף העלה, או משחלת הפרח, או מפרי מתפתח, גורם לרגישות של הרקמה לאוקסין וחוסר רגישות שלה לאתילן. כל עוד נשמר המצב המתואר של קיום מקור אוקסין לא תתקיים נשירה של אותו האיבר. ברגע שמתרחש שינוי באיבר המיועד לנשירה כגון הזדקנות או פציעה, ריכוז האוקסין ברקמת הניתוק יורד והרגישות לאתילן עולה. בהמשך פעולת האתילן תביא להפעלת תהליך הניתוק כתהליך אקטיבי שבסופו תתרחש הפרדות בין שכבות התאים ברקמת הניתוק ונשירה של האיבר מגוף הצמח (Taylor and Whitelaw, 2001). המנגנון המולקולרי של רגישותו המשתנה של איזור הניתוק להורמונים אוקסין ואתילן ומנגנון הפעולה טרם פוענח. בשלביו המאוחרים של תהליך הניתוק מתרחשת עליה בביטוי הגנים לאנזימים הידרוליטיים אשר מופרשים מהתאים ברקמת הניתוק, כגון פוליגלקטורונאזות (Gonzalez-Carranza et al., 2002) וצולואזות, (Gonzalez-Bosch et al., 1997) הפועלים לפירוק מרכיבי דופן התא ומרכיבי למלת הביניים. פעילות זו של האנזימים ההידרוליטיים הכרחית לצורך ביצוע ההפרדה הבין תאית המאפשרת את הניתוק.

## 1.7. ריבונוקליאז LX

הריבונוקליאז LX מעגבנייה זוהה ובודד לראשונה כאנזים אשר רמת פעילותו עלתה בתאי תרבית רקמה בעקבות הרעבה לזרחן במצע הגידול (Loffler et al., 1992). LX הוא אנזים ציטופלסמטי שמצוי מחוץ לחללית, וככל הנראה ממוקם באתר על גבי הרשתית האנדופלסמטית (ממברנת ה-ER) הודות להכוונה על ידי רצף חומצות אמינו המצויות בקצה הקרבוקסילי שלו (Kaletta et al., 1998; Lehmann et al., 2001). עליה ניכרת בביטוי הגן LX ובפעילות האנזים זההה בשלבים מתקדמים של תהליך הזדקנות עלי עגבנייה (Lers et al., 1998; Lehmann et al., 2001). יתר על כן נמצא שביטוי עולה בעלים צעירים בתגובה לטיפול אתילן

(Lers et al., 1998). מעבר לכך דווח כי בצמחים טרנסגנים בהם ביטוי *LX* מעוכב מתקבלת דחייה בתהליך הזדקנות העלים (Lers et al., 2006). עליה בביטוי החלבון *LX* זוהתה בצורה ספציפית ברקמות ניתוק של עלים מזדקנים, וברקמות ניתוק של פרי בשלבי הבשלה מתקדמים (Lers et al., 2006). במחקר בו צמחים טרנסגנים ביטאו את הפרומוטור ל-*LX* מאוחה לגן מדווח *GUS* התקבלה צביעה ברקמות ניתוק של פסיגים (Kock et al., 2006). ממצא חדש מגלה כי בצמחים טרנסגנים בהם יש עיכוב בביטוי הגן ל-*LX* יש עיכוב בנשירת עלים. נראה כי השפעת עיכוב ביטוי *LX* על תהליך הנשירה אינו נובע מעיכוב תהליך ההזדקנות, שכן גם בתנאים בהם בוצעה השראה לנשירה בעלים צעירים, התקבלה דחייה בנשירה בצמחים הטרנסגנים (Lers et al., 2006). עבודה ביואינפורמטית איתרה רצף לאורך הפרומוטור ל-*LX* שמכיל אזור קשירה שמור לחלבון השיעתוק *PHR1*, שהוא מתווך תגובת צמחים לתנאי מחסור בזרחן. ממצא זה מרמז על בקרה אפשרית לביטוי של *LX* בתנאי מחסור לזרחן (Rubio et al., 2001; Kock et al., 2006). השערה לגבי מעורבות *LX* בתהליכי מוות מתוכנת בצמחים מסתמכת על הגברה בביטוי ברקמת האנדוספרם בעת נביטת זרעי עגבנייה, וכן נוכחות שלו בתאים המתמיינים לרקמת עצה (Lehmann et al., 2001). באפיון צמחים טרנסגנים להם הוחזר גן מדווח *GUS* מאוחה לפרומוטור ל-*LX* התקבלה צביעת *GUS* בשורשים של צמחי עגבנייה שגדלו בתנאי הרעבה לזרחן, ובאופן ספציפי בתאי אפידרמיס של אזורים מתארכים ואזורים מריסטמטיים בקצה השורשון (root tip), אזור בו מתרחש מוות מתוכנת. צביעה נראתה גם בצלקות פרחים, משלב פקע עד שלב בוגר (Kock et al., 2006).

### מטרות העבודה

המטרה הכללית של עבודת מחקר זו הייתה להבין את תפקידי הריבונוקליאז *LX* בעגבנייה, וכן לבחון את אפשרות מעורבות תהליך מוות מתוכנת בתהליך הניתוק בעגבנייה.

פירוט של מטרות העבודה:

- 1) אפיון מעורבות *LX* בתהליך הזדקנות עלים תחת תנאי עקה שונים.
- 2) אפיון מעורבות *LX* בתהליך נשירת פרחים.
- 3) בחינת ההיפותזה לפיה מנגנוני מוות מתוכנת מעורבים בתהליך ניתוק איברים.
- 4) אפיון מעורבות *LX* בתגובת צמחים לגידול בתנאי מחסור לזרחן.

## 2. שיטות וחומרים

### רשימת חומרים

מדינה	יצרן	חומר
מושב גן חיים, ישראל	דע קדם	מגן 2001
USA	Sigma-Aldrich	2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF)
Jerusalem, Israel	Bio-lab	2-propanol
Jerusalem, Israel	Bio-lab	Acetone
Germany	Merck	Boric acid
Germany	Merck	Calcium nitrate
USA	Sigma	Cupric sulfate
USA	Sigma	2,4-D
USA	Sigma	Dimethyl sulfoxide (DMSO)
USA	Sigma	DNA (from salmon sperm)
Haarlem, Netherlands	Duchefa	Ethylenediaminetetraacetic acid Ferric Sodium salt (EDTA)
Jerusalem, Israel	Bio-lab	Ethanol Abs
Philadelphia, USA	Rohm and Haas Company	Ethylbloc
קיבוץ בית העמק	בית העמק	EZ-ECL Chemiluminescent
USA	Sigma	Ferrous sulfate
California, USA	Bio-Rad	goat anti-rabbit IgG:horseradish peroxidase conjugate
USA	Sigma	KOH
Germany	Riedel-deHaen	Magnesium sulfate
USA	Sigma	Manganese chloride
Germany	Merck	Molybdic acid sodium salt
Germany	Boehringer	Phenylmethyl-sulfonylfluoride (PMSF)
USA	Sigma	Polyvinylpyrrolidone (PVP)
Germany	Merck	Potassium phosphate monobasic
Germany	Merck	Potassium sulfate
California, USA	Bio-Rad	Protein Assay

Jerusalem, Israel	Bio-lab	Sodium chloride - NaCl
Jerusalem, Israel	Bio-lab	Sodium dodecyl sulfate (SDS)
Ohio, USA	Amresco	toludine blue
Jerusalem, Israel	Bio-lab	Tris-HCl
Ohio, USA	Amresco	Tween20
Ohio, USA	Amresco	Tween-80
USA	Sigma	Zinc sulfate

## שיטות

### גידול צמחים

צמחי עגבנייה (*Solanum lycopersicum*) מזן VF36 ומזן Rutgers שימשו לביצוע המחקר. הנבטת הזרעים נעשתה על מצע פרלייט בטמפרטורה של 28°C בחושך, לאחר 3 ימים הועברו הנבטים לאור. לאחר כשבוע כאשר הפסיגים היו מפותחים, הועברו הנבטים להמשך גידול בעציצים בנפח 150 סמ"ק או 400 סמ"ק או לחישתיל (15 סמ"ק). כלי הגידול מולאו במצע פרלייט או באדמה מלאכותית HR1 (Hagarin Ltd) בהתאם למטרת הניסוי. הצמחים גודלו בחממה בתנאי בקרת טמפרטורה של 25°C ואור יום טבעי. צמחים שגודלו במצע פרלייט הושקו באופן ידני בתמיסת מזון שהוכנה על פי המתואר (Bosse and Kock, 1998). התמיסה הכילה: יסודות מקרו: 18 μM; 46 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 1 Mm MgSO<sub>4</sub>; 4 Mm KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2.85 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>; 0.3 μM CuSO<sub>4</sub>; 0.5 μM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>; μM 0.7 ZnSO<sub>4</sub>; 14 μM MnCl<sub>2</sub>; 16 μM Na<sub>2</sub>EDTA; FeSO<sub>4</sub> בניסויים בהם היה צורך להאיץ את תהליך ההזדקנות, הצמחים הושקו בתמיסת נוטריינטים אשר נמהלה פי חמישה במים מזוקקים. צמחים שיועדו לניסויי נשירת פרחים הועברו בשנית לעציצים גדולים (2000 סמ"ק) והושקו במערכת אוטומטית עם תוספת דשן (אולטרה דשן, הגרעין). נבטים שיועדו לגידול במערכת הידרופונית הושארו בכלים בהם הונבטו והושקו בתמיסת נוטריינטים מלאה עד גיל 25 יום. במועד זה הוצאו הצמחונים בזהירות ממצע הפרלייט, שורשיהם נשטפו על מנת להסיר את שאריות מצע הגידול והוכנסו לתוך ספוג אינרטי לאחר ביצוע חתך בספוג. בהמשך הספוגים עם הצמחונים הונחו בתוך בארות של מגש המיועד לשתילה אוטומטית (Semireco Inc, Murcia Spain). המגש עם הצמחים הונח בתוך מיכל פלסטי המכיל את תמיסת המזון הנוזלית המלאה כפי שתוארה לעיל. עבור ניסויי הרעבה לזרחן הוכנה תמיסת מזון מתאימה בה KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> הוחלף ב- 2 Mm KHSO<sub>4</sub> (Bosse and Kock, 1998). כל משך הגידול עורבל אוויר לתמיסה באמצעות משאבת אוויר המשמשת לגידול דגים באקווריום.

## השראה לנשירת עלים ופרחים

השראה מלאכותית לנשירת עלה בוצעה על-ידי חיתוך הפטוטרת בסמוך לטרף (Deblading), כאשר בחלק מהמקרים בוצע בהמשך טיפול באתילן (לאחר כ- 24 שעות ממועד החיתוך) להאצת התהליך. השראה לנשירת פרחים בוצעה על-ידי הסרתם באזור העוקץ, בסמוך לבסיס הפרח (איור 5) באמצעות סכין גילוח. על אזור הפציעה נמשח בזהירות חומר "מגן 2001" שהוא חומר אינרטי 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. בשעות שלאחר הסרת הפרחים נבחנה מידת נשירת העוקצים על-ידי נגיעה קלה עם מברשת מכחול.

## טיפול הורמונים ו-1-MCP

לצורך יישום אתילן הוכנסו צמחים שלמים או עלים מנותקים למיכלים אטומים עם צינוריות כניסה ויציאה שמותאמים למערכת של זרימת גזים. אויר (ביקורת) או אתילן מעורבב עם אויר לריכוז של 5 ppm הוזרמו אל תוך המערכת בקצב של 100 מ"ל לדקה, לאחר שבעבעו במים מזוקקים בכדי לשמור על תנאי לחות מתאימים. טיפול באוקסין בוצע על ידי טבילת עלים מנותקים למשך חצי שעה בנוזל מימי שהכיל אוקסין סינטטי 2,4-D  $\mu\text{M}$  200 עם חומר משטח Tween-80 0.1%. בניסוי הביקורת נעשה שימוש במים המכילים רק את החומר המשטח. במידה ובוצע טיפול עוקב באתילן הוא בוצע רק 24 שעות לאחר הדגרת העלים תחת זרימת אויר לח על מנת לאפשר זמן תגובה לאוקסין.

מעכב האתילן הגזי 1-MCP הוכן על ידי המסת 2.5 גרם אבקת Ethylbloc ב- 70 מ"ל 1% KOH בתוך ארלנמייר זכוכית (500 מ"ל) אטום בפקק גומי. המסת האבקה בוצעה על ידי הזרקת התמיסה (דרך פקק הגומי) לתוך הארלנמייר שהכיל את האבקה, פעולה זו גורמת לשחרור גז בריכוז 10000 ppm לחלל הכלי (Lomaniec et al., 2003). חשיפת הצמחים למעכב בוצעה בתוך תא אטום שמותאם לצורך הזרקת גז. מיכלי הגידול ההידרופוני הוכנסו לתאים אלו ולאחר אטימתם הוזרק לתוכם נפח ה- 1-MCP המתאים לקבלת ריכוז סופי של 5 ppm של המעכב. הטיפול בוצע בכל לילה שני במהלך הניסוי על מנת לשמר את פעולת העיכוב וזמן הטיפול בכל פעם היה כ- 14 שעות. טיפולי הביקורת שהו במקביל למשך אותו פרק זמן בתא האטום אך ללא הזרקת המעכב. לאחר תום הטיפול הוחזרו הצמחים להמשך גידול בחממה.

## מדידת רמת ייצור אתילן

צמחונים שלמים שגודלו בתנאים הידרופוניים נכלאו למשך מספר שעות בצנצנות זכוכית אטומות. דגימת גז נלקחה באמצעות מזרק שהוחדר לצינור גומי אטום המחובר לצנצנת האטומה, דבר המאפשר לבצע את הדגימה ללא פתיחת הצנצנת. הגז הנדגם הוזרק למכשיר גז כרומטוגרף 3300 (USA, Varian) ורמת האתילן בדגימת הגז שנמדדה לאחר ההרצה במכשיר כומתה על-ידי אינטגרטור HP3396 (USA, HP). רמת גז האתילן שנדגמה מכל צנצנת תוקנה יחסית למספר שעות הכליאה של הצמחים ומשקלה הטרי.



וחושבה לפי הנוסחה:

$$\frac{\text{קריאת האינטגרטור (ppm)} * \text{נפח הצנצנת (ml)}}{\text{משקל רקמה טרי (gr)} * \text{שעות הכליאה (hr)}}$$

### מדידת זליגת יונים

מדידת זליגת יונים בוצעה תוך שימוש בעלים מנותקים אשר טופלו בעדינות על-מנת לשמור על שלמותם, שכן כל פגיעה ברקמה יכולה לגרום לעליה ברמת האלקטרוליטים המשתחררים. העלים הוכנסו כל אחד בנפרד לכוס זכוכית לה נמזגו מים מזוקקים בנפח של 20 מ"ל, והכוסות הודגרו באמבט מים בטמפרטורה קבועה של 27°C. מדידה של רמת זליגת היונים על פי שינוי המוליכות של תמיסת ההדגרה בוצעה באמצעות מד-מוליכות TH 27 (USA, Hanna Instruments) כל שעה במשך שלוש שעות. עם סיום המדידות בוצע טיפול על ידי אוטוקלאב במטרה לשחרר את כלל היונים מהעלה לתמיסה ומדידה זו שימשה כרמת 100% כלפיה בוצע חישוב זליגת היונים בכל אחת מנקודות הזמן שנמדדו (Watanabe and Lam, 2006).

### צביעות ROS

צביעות לצורך זיהוי ROS ברקמות ניתוק של עלים ופרחים התבצעו עם החומר 2'-7'-dichlorofluorescein (DCF) diacetate אשר הופך לתוצר פלואורסצנטי בנוכחות ROS. הוכנה תמיסת אם של החומר בריכוז 20 mM ב-DMSO ובסמוך למועד הצביעה התמיסה נמהלה פי 1000 בבופר פוספאט בריכוז 50 mM. הרקמות הודגרו למשך 10 דקות בתמיסה ואז נשטפו פעמיים במים מזוקקים למשך מספר דקות (Rosenvasser et al., 2006). זיהוי צביעה פלואורסצנטית ברקמה בוצעה תוך שימוש בבינקולר מסוג Leica MZFLIII (Leica, Germany). זיהוי צביעה פלואורסצנטית ברקמה בוצעה תוך שימוש בבינקולר מסוג Leica DC200 (Leica, Germany). המחוברת לבינקולר (Excitation at 488 nm, emission at 515-540 nm) והתמונות צולמו במצלמה דיגיטלית.

### איסוף דוגמאות צמחיות

דוגמאות מרקמות ניתוק של פרחים נאספו בפרקי זמן שונים לאחר מועד הסרת הפרח, כאשר ביקורת נלקחה או בזמן אפס או מפרחים צעירים שבהם לא בוצעה הסרה של הפרח. חיתוך ידני של הדוגמאות בוצע עם סכין גילוח, כאשר החיתוך בוצע כ- 2 מ"מ משני צידי רקמת הניתוק. רקמת הביקורת בגודל דומה נאספה במרחק של כ- 5 מ"מ מאזור הניתוק (איור 5). דוגמאות עלים נאספו כדסקיות בקוטר 7 מ"מ. הדגימות הצמחיות הוקפאו מייד בחנקן נוזלי ונשמרו עד ביצוע האנליזות ב-70°C. עמדת העלה מתייחסת לסדר הכרונולוגי בו נוצר, כך שעלה מעמדה ראשונה הוא הבוגר ביותר (לאחר הפסיגים).

## מדידות כלורופיל וחלבון מסיס

מדדי תכולת כלורופיל וחלבון מסיס נקבעו מאותן דוגמאות רקמה שנאספו. לצורך האנליזה נאספו 9 דסקיות עלים לתוך מבחנת אפנדורף, אליה הוסף  $150 \mu\text{l}$  של בופר מיצוי (10% polyvinylpyrrolidone, 1 mM PMSF, EDTA mM, 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5). הרקמה נכתשה בתוך המבחנה באמצעות מקדחה ממונעת מודל 212 (USA, Dremel) עם ראש מתאים. חלק מהמיצוי שהתקבל שימש למדידת כלורופיל שמוצה מהדוגמאות בעזרת הוספת אצטון לריכוז סופי של 80%. ריכוז הכלורופיל נמדד במכשיר ספקטרופוטומטר (USA, Amersham Biosciences) Ultraspec 2100 PRO על פי הבליעה האופטית בשני אורכי גל של  $a=646\text{nm}$  ו-  $b=663\text{nm}$  וחושב לפי הנוסחה:  $a+b=17.76A^{646}+7.34A^{636}$  (A = בליעה) (Porra et al., 1989).

עבור מדידת ריכוז החלבון המסיס נלקחה שארית המיצוי וסורכזה למשך 15 דקות במהירות 13000 rpm ב-  $4^{\circ}\text{C}$  בצנטריפוגה (Germany, Heraeus) Biofuge fresco להפרדת המקטע המימי ללא חלקיקי תאים. מדידת ריכוז החלבון נעשתה באמצעות אנליזת ברדפורד שבוצעה עם ערכה (USA, Bio-Rad) Protein assay לפי הוראות היצרן ונמדדה על פי הבליעה האופטית באורך גל 595nm (Porra et al., 1989).

## אנליזות חלבונים: Western וג'ל פעילות נוקליאזות

לביצוע אנליזות Western וג'ל פעילות נעשה שימוש בדגימות חלבונים מעלים או ממקטעי עוקצי הפרחים. מעלים נאספו 9 דסקיות בקוטר 7 מ"מ ממספר עלים שונים והדסקיות נכתשו ב-  $150 \mu\text{l}$  בופר מיצוי. מקטעי עוקצי הפרחים (שכללו רקמות ניתוק או רקמות ביקורת) אוחדו ממספר פרחים והדוגמאות נשקלו ונכתשו בנפח כפול של בופר מיצוי. לאנליזת Western, חלבונים בכמות של  $5 \mu\text{g}$  עד  $10 \mu\text{g}$  הופרדו בג'ל 15% SDS-PAGE לאחר שעורבבו עם sample buffer (150 mM Tris-HCl pH 6.8, 30% glycerol, 0.05% Bromo-ph-blue). לאחר הפרדת החלבונים באלקטרופורזה בוצעה העברה שלהם מהג'ל לממבראנת ניטרוצלולוז עם המכשיר mini trans blot (USA, Bio-Rad). בהמשך תהליך ה-Western בוצעה חסימת אתרים אנטיגנים לא ספציפיים בחלבונים על הממבראנה באמצעות תמיסת בופר Tris-buffered saline (TBS) שהכילה 5% חלב ו- 0.1% Tween20 (blocking) למשך שעה. הנוגדן הראשוני anti-LX נמהל 1:2000 לתוך תמיסת ה-blocking והועבר עם הממבראנה לאינקובציה ללילה בטלטול ב-  $4^{\circ}\text{C}$ . הממבראנה נשטפה מספר פעמים במשך 30 דקות עם בופר TBS ו- 0.1% Tween20. הנוגדן השניוני goat anti-rabbit IgG:horseradish שקשור לאנזים פרוקסידאז (USA, Bio-Rad) נמהל 1:50000 בתמיסת blocking והושאר לאינקובציה של שעה בטמפרטורת החדר. לחשיפת סיגנל האור נעשה שימוש בקיט EZ-ECL Chemiluminescent (בית העמק).

לאנליזת פעילות נוקליאזות מוצו חלבונים בבופר מיצוי (ללא SDS) וחלבונים בכמות של  $20 \mu\text{g}$  עד  $40 \mu\text{g}$  הופרדו בג'ל 12.5% SDS-PAGE לאחר שעורבבו עם sample buffer (ללא DTT) ביחס של 1:3 והורתחו למשך 3 דקות (Laemmli, 1970). לג'ל הוספו חומצות נוקליאיות כסובסטרט לפעילות האנזימית כאשר מקור ה-DNA היה מתאי זרע של סלמון. לאחר סיום הרצת הג'ל באלקטרופורזה הוא הועבר לשיטות בבופר עם

תוספת isopropanol במטרה לסלק את ה- SDS ולאיןקובציה ללילה ב-  $37^{\circ}\text{C}$  בכדי לאפשר את הפעילות האנזימתית. זיהוי הפעילות האנזימתית התבצע באמצעות צביעת הג'ל עם toluidine blue (שנקשר ל- DNA) למשך שעה ולאחריו שטיפות חוזרות ונשנות של הצבע עם מים מזוקקים, אשר חשפו אזורים בהירים על-גבי הג'ל בהם התרחש עיכול של הסובסטרט על-ידי הנוקליאזות (Yen and Green, 1991).

## הפקת DNA

הפקת DNA גנומי בוצעה מרקמות עלים צעירים. דסקית רקמה בקוטר 1 ס"מ נכתשה ב-  $400\ \mu\text{l}$  בופר מיצוי (25 mM EDTA, 250 mM NaCl, 0.5% SDS, 200 mM Tris-HCl pH 7.5). המיצוי סורכז בצנטריפוגה במהירות 13000 rpm למשך 5 דקות ונפח עליון של  $300\ \mu\text{l}$  מהמיצוי הועבר למבחנה חדשה בתוספת  $300\ \mu\text{l}$  של 2-propanol קר. לאחר ערבוב בוצע סרכוז נוסף למשך 5 דקות לצורך השקעת ה-DNA ולאחר מכן סולק הנוזל בעדינות. הפלט של ה-DNA בתחתית המבחנה נשטף באתנול קר 70% והפלט הומס ב-  $100\ \mu\text{l}$  מים מזוקקים פעמיים (Weigel and Glazebrook, 2002).

## הפקת RNA וסינתזת גדיל cDNA ראשון

רקמות ניתוק ורקמות ביקורת של פרחים נטחנו לאבקה בחנקן נוזלי בעזרת עלי ומכתש. RNA הופק בעזרת הערכה RNeasy (Qiagen) לפי הוראות היצרן. ריכוז ה-RNA נמדד בעזרת המכשיר ND-1000 Spectrophotometer (USA, NanoDrop). סינתזת גדיל ראשון של cDNA בוצעה בעזרת הערכה RevertAid (Fermentas, Canada) תוך שימוש ב-  $1\ \mu\text{g}$  של RNA ובאמצעות פריימר oligo(dT) המסופק בקיט. תוצרי הריאקציה שימשו לאחר מכן לריאקציית PCR לאנליזה כמותית.

## אנליזות PCR

במהלך העבודה נעשה שימוש באנליזות PCR הן למעקב אחר הגנוטיפ וקיום הטרנסגנים בקווים השונים (בצמחים הטרנסגנים ל- *LX* והטרנסגנים ל- *SfIAP*) והן כאנליזה לכימות רמת ביטוי הגן *le-pirin*. האחרון בוצע באמצעות אנליזה כמותית semi quantitative RT-PCR analysis. ריאקציית PCR בנפח סופי של  $20\ \mu\text{l}$  כללה 50 ng DNA גנומי, 25 pmol פריימרים מכל סוג,  $10\ \mu\text{l}$  תערובת (Bio-Lab) Ready-Mix (Taq DNA) Polymeras, dNTPs, Tris-HCl (pH 8.8),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$  והשלמת הנפח עם מים (DDW). הריאקציות בוצעו תוך שימוש במכשיר PCR Mastercycler person1 (Germany, Eppendorf) לפי התוכניות המפורטות בטבלה בהמשך. לצורך ביצוע האנליזה הכמותית קוצר מספר מחזורי ההגברה וזאת על פי ניסויים מקדימים שבוצעו במעבדה לצורך כיוול התנאים המיטביים עבור אנליזת PCR כמותית.

פירוט תוכניות ה-PCR ששימשו בעבודה:

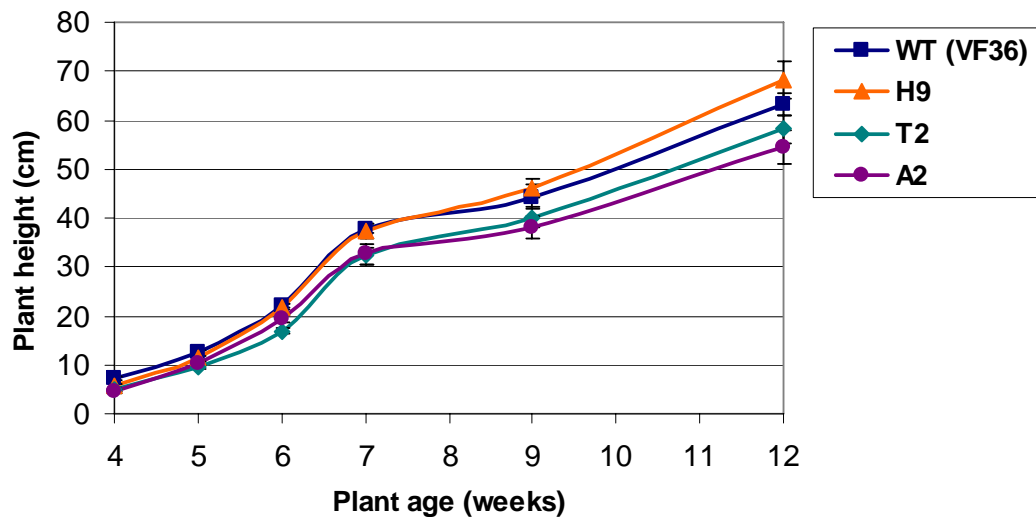
שלב מס'	טמפרטורה	זמן	הערות
1	94°C	2 דקות	
2	94°C	30 שניות	
3	65°C	30 שניות	
4	72°C	2 דקות	חוזר לשלב 2, 10 פעמים כאשר בכל סיבוב מופחתת הטמפרטורה ב- 1°C בהדרגה (החל מזו שמוזכרת בשלב 3). ועוד 25 פעמים בטמפ' 55°C או 15 פעמים לאנליזה הכמותית.
5	72°C	7 דקות	
6	4°C	Hold	

פריימרים ששימשו בעבודה זו:

שם הגן/ טרנסגן	Forward Primer 5' - 3'	Reverse Primer 5' - 3'
טרנסגן ל-LX	GGACGTAACATAAGGGACTGAC	CTGTTGAACAAAGTAGAAGAAATC
טרנסגן ל-SfIAP	GACAACCACGACACCTTCGGCTTCA	CGCACGGCACGAAGCACACGTTAC
Actin	GATGCATATGTTGGTGATGAAGC	GTGGTGAACATGTAACCTCTCTC
le-pirin	GTTAGAAGAAGCATTGGAAGGCCTG	GTTAATCGGTTGCCCTCTATCAG

### 3. תוצאות

במסגרת עבודה זו בוצע אפיון של צמחי עגבנייה טרנסגנים בהם עוכב ביטוי הגן לריבונוקליאז  $LX$ , באמצעות טכנולוגיה של החדרת עותק אנטי-סנס לגנום הצמחים. כל הניסויים בוצעו על שלושה קווי עגבנייה טרנסגנים בלתי תלויים (A2, T2, H9). במהלך מחזורי הגידול הרבים שביצענו לא הבחנו בשינוי במהלך הגידול התקין של הצמחים הטרנסגנים לעומת צמחי זן הבר בשום שלב משלבי הגידול. על כן נראה שהמניפולציה הגנטית לא הייתה בעלת השפעה ניכרת על התפתחות הצמחים בתנאי גידול רגילים. דוגמא לכך ניתן לראות ממעקב במהלך הגידול אחר גובה הצמחים הטרנסגנים לעומת צמחי זן הבר (איור 1).



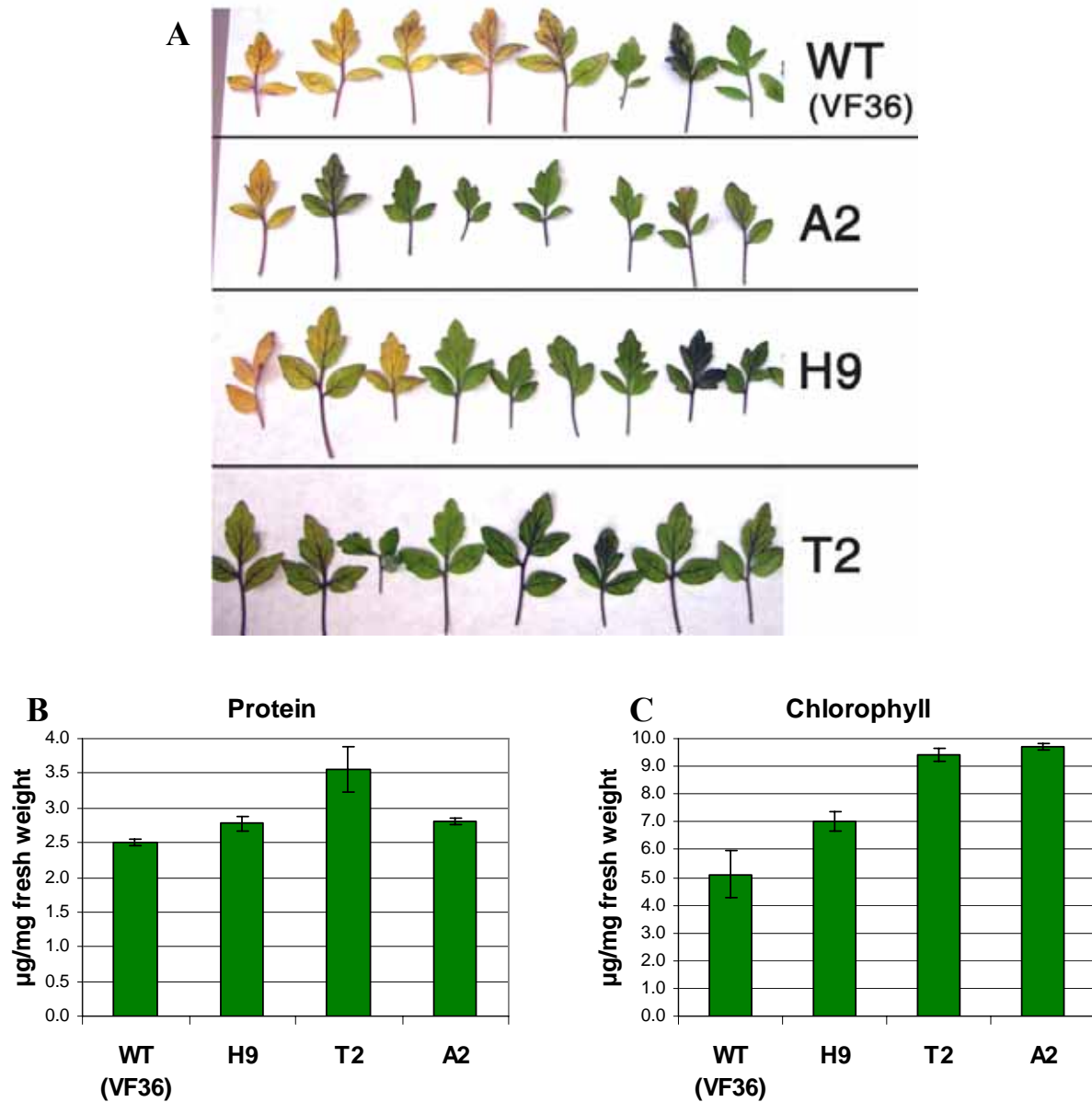
**איור 1: השפעת עיכוב בביטוי הגן לריבונוקליאז  $LX$  על גובה צמחים.** גובה הצמחים של זן הבר (VF36) ושלושת הקווים הטרנסגנים (A2, T2, H9) השווה במשך חודשיים של גדילה. גובה ממוצע של 8 צמחים מכל קו מוצג עם  $\pm$  שגיאת תקן.

גובה הצמחים הטרנסגנים נראה נורמאלי בהשוואה לצמחי זן הבר (איור 1).

#### 3.1 אפיון מעורבות $LX$ בתהליך הזדקנות עלים

כפי שתואר במבוא, בניסויים קודמים שבוצעו, נמצאה השפעה של עיכוב ביטוי הגן  $LX$  על תהליך ההזדקנות, כשהוא עקב חשיפת הצמחים למחסור בזרחן (Lers et al., 2006). בהמשך רצינו לבחון את ההשפעה של עיכוב ביטוי  $LX$  על תהליך ההזדקנות המושרה עקב הגבלה מסוימת לכלל הנוטריונטים ולא עקב מחסור קיצוני בזרחן בלבד. בכדי לאפשר בקרה של הדישון גודלו צמחי העגבנייה בחממה בעציצים המכילים מצע פרלייט. במהלך תקופת הגידול הצמחים הוגבלו לנוטריונטים על-ידי השקיה בתמיסת דשן אשר נמהלה פי חמישה במים מזוקקים כפי שמתואר בחומרים ושיטות. בתנאי גידול אלה מוחש תהליך ההזדקנות והבדלים בהתקדמות תהליך ההזדקנות בין זן הבר לבין הצמחים הטרנסגנים ניכרים באופן ויזואלי. כשהצמחים הגיעו לגיל 7 שבועות, כ-60% מצמחי זן הבר שנכללו בניסוי היו בעלי עלים ראשונים צהובים ואילו בצמחים הטרנסגנים, בהם ביטוי  $LX$  מעוכב, באותו הזמן רק החלה להתקבל הצהבה בעלים הראשונים. רק ב-12%, 30%-1 ו-0% מכלל הצמחים בקווים A2,

H9 ו-T2 בהתאמה, היו בעלי עלה צהוב בעמדה ראשונה. בשלב שבו נצפתה התחלה של סימני הצהבה והזדקנות בעלים של הצמחים הטרונסגנים, נאסף עלה מעמדה ראשונה בכל צמח (9 צמחים מכל קו) לצורך צילום ולאנליזות של רמת חלבון מסיס כללי ותכולת כלל הכלורופיל (איור 2). תכולת החלבון והכלורופיל בעלים שנקבעה במדידות אלו שימשה כמדד לצורך הערכה של שלב ההזדקנות.



**איור 2: השפעת עיכוב בביטוי הגן לריבונוקליאז *LX* על הזדקנות העלים.**  
 צמחי זן הבר (VF36) ושלושת הקווים הטרונסגנים (A2, T2, H9) גודלו בעציצים עם מצע פרלייט תוך השקיה בתמיסת דשן מהולה 1:5. בגיל 7 שבועות נאספו העלים הראשונים מכל הצמחים והם צולמו (A). לקביעת מדדי הזדקנות נלקחו דגימות רקמה מהעלים ובוצעה מדידה של רמת החלבון המסיס (B) ומדידה של תכולת כלל הכלורופיל (C). כל עמודה מייצגת ממוצע של 3 מדידות ± שגיאת תקן.

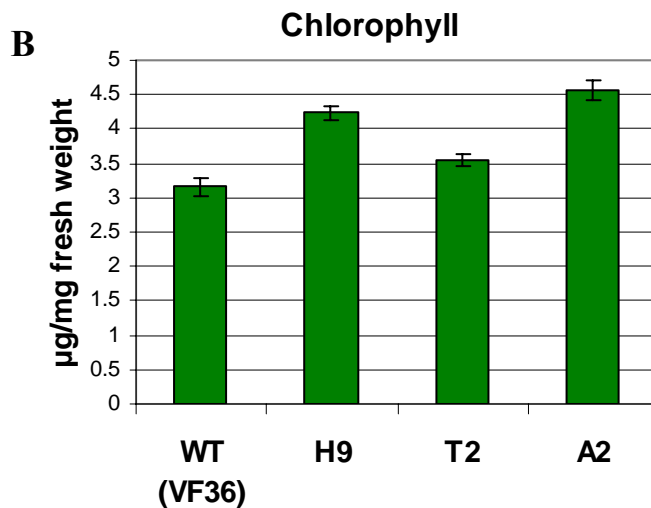
ניתן לראות כי תכולת החלבון המסיס, כמו גם תכולת הכלורופיל, גבוהה יותר בצמחים הטרנסגנים לעומת צמחי זן הבר. מדידות אלה תואמות את התצפית הויזואלית של מידת הצהבת הרקמה, המראה כי בעוד מרבית העלים של צמחי זן הבר נמצאים כבר בשלבים מתקדמים של תהליך הזדקנות, בחלק גדול מהעלים של הצמחים הטרנסגנים העלים עדיין ירוקים או בשלבים מוקדמים של תהליך ההזדקנות (איור 2).

ההשפעה של עיכוב ביטוי *LX* על תהליך ההזדקנות נצפתה במהלך גידול הצמחים בתנאים שונים ובעיקר בתנאי עקה מסוגים שונים. דוגמא נוספת לכך ניתן לראות באיור 3 בו מצולמים עלים מעמדה ראשונה של צמחים שגדלו באדמה בעציצים קטנים, כלומר נפח השורשים שלהם הוגבל והם הושקו במי ברז ללא כל דיזון, מה שהגביר את תנאי העקה בה היו מצויים. הצמחים היו בגיל 7 שבועות כאשר נאספו העלים וצולמו.



**איור 3: השפעת עיכוב בביטוי הגן לריבונוקליאז *LX* על הזדקנות העלים.**  
צמחי זן הבר (VF36) ושלושת הקווים הטרנסגנים (A2, T2, H9) גודלו בעציצים קטנים (400 סמ"ק) עם אדמה והשקיה במי ברז. העלים הראשונים נאספו מצמחים בני 7 שבועות וצולמו.

בניסוי נוסף נבחנו תנאי עקה קיצוניים עוד יותר של הגבלת נפח שורשים על-ידי גידול הצמחים במגשי חישתיל (15 סמ"ק) באדמה עם השקיה במי ברז בלבד. בתנאים הללו נפח השורשים מוגבל מאוד ויש האצה משמעותית של תהליך ההזדקנות. בתנאים אלו בגיל 26 יום ברוב צמחי זן הבר כבר התקבלה הזדקנות בולטת של הפסיגים והעלים, בעוד בצמחים הטרנסגניים ההזדקנות עוכבה (איור 4A). לצורך הערכת דרגת ההזדקנות של הפסיגים נלקחו דוגמאות רקמה למיצוי ומדידת תכולת הכלורופיל (איור 4B).



**איור 4: השפעת עיכוב בביטוי הגן לריבונוקליאז *LX* על הזדקנות פסיגים.** צמחי זן הבר (VF36) ושלושת הקווים הטרנסגנים (A2, T2, H9) גודלו באדמה במגשי חישתיל תוך השקיה במי ברז. בגיל 26 יום צולמו הפסיגים (A) ובוצעה מדידה של תכולת הכלורופיל (B). כל עמודה מייצגת ממוצע של 8 מדידות  $\pm$  שגיאת תקו.

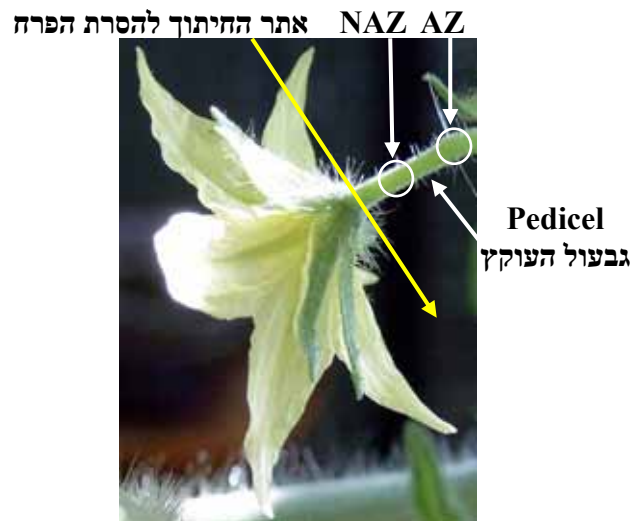
מתוצאות ניסויים אלו אנו למדים כי הקינטיקה של הזדקנות העלים, המואצת בתנאי עקה שונים, הינה איטית יותר בצמחים שבהם עוכב ביטוי *LX* בהשוואה לקינטיקה של הזדקנות העלים בצמחי זן הבר. ניתן להבחין בתופעה זו בבירור באופן ויזואלי וההבדלים ניתנים לכימות באמצעות מדידת תכולת כלורופיל ותכולת חלבון מסיס בעלים. תצפית זו של עיכוב הזדקנות בצמחים הטרנסגנים חזרה על עצמה במהלך כל הניסויים שבוצעו, חלקם בתנאי גידול שונים, בתקופת המחקר. אולם כאשר תנאי הגידול היו טובים ותהליך ההזדקנות התרחש באופן הדרגתי לא ניתן היה להבחין בהבדל, כנראה בעקבות כך שעיכוב הביטוי אינו מלא בצמחים הטרנסגניים ומתרחשת עליה מסוימת בביטוי העותק האנדוגני של *LX* אשר אינו מגביל את התקדמות תהליך ההזדקנות בתנאי גידול רגילים. הניסויים המתוארים מראים כי הזדקנות הצמחים הטרנסגנים מעוכבת באופן בולט בתנאי עקה של הגבלת נוטריינטים חלקית



ובעקב הנובעת מהגבלת נפח שורשים וזאת בדומה למתרחש כשהזדקנות מואצת על-ידי הרעבה מוחלטת של הצמחים למקור זרחן בלבד כפי שהודגם בעבר.

### 3.2. אפיון מעורבות LX בתהליכי ניתוק פרחים

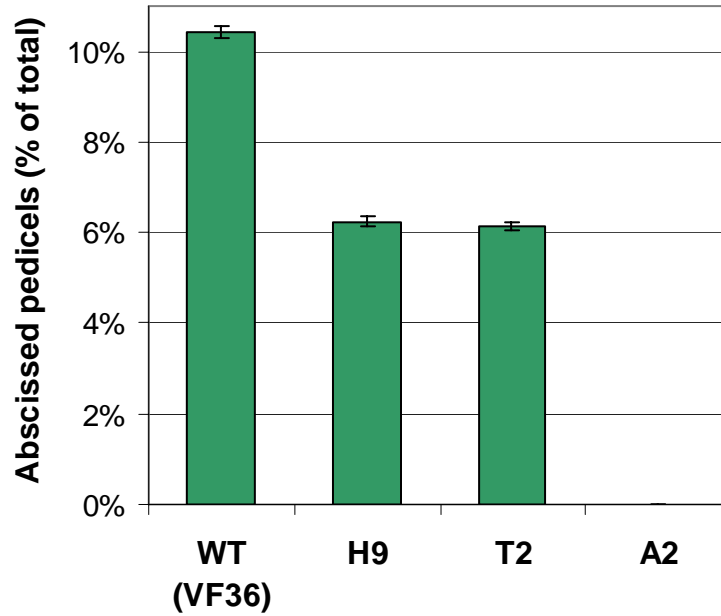
במחקר קודם שנערך במעבדה לבחינת ההשפעה של עיכוב ביטוי LX התברר, כי מלבד האטת תהליך הזדקנות עליהם, מתרחשת דחייה משמעותית של תהליך ניתוק עלי העגבנייה, גם כשזה מושרה בעלים צעירים (Lers et al., 2006). בעבודה זו בוצעו מספר ניסויים כדי לבחון האם קיימת השפעה דומה גם על תהליך הניתוק בפרחים. פרח העגבנייה המזדקן נושר באופן טבעי כאשר הוא מסיים את השלב הרפרודוקטיבי שלו ולא התרחשה הפריה. על-מנת להשרות באופן מלאכותי את תהליך הנשירה בוצעה הסרה של הפרח על ידי חיתוך העוקץ באזור הסמוך לפרח (כפי שמודגם באיור 5). על פי ניסויים מוקדמים בצמחי זן הבר (VF36) הנשירה מתרחשת בטווח של 6 עד 24 שעות ממועד הסרת הפרח, וזאת בהתאם לתנאי הסביבה (כגון טמפרטורה ולחות). בוצעה השוואה של קינטיקת תהליך נשירת גבעול העוקץ לאחר הסרת הפרח בין צמחי זן הבר לבין הצמחים הטורנסגנים, על-מנת לבחון האם עיכוב בביטוי LX השפיע על תהליך הניתוק בפרחי העגבנייה.



**איור 5: מבנה פרח העגבנייה ואופן ביצוע החיתוך להסרת הפרח להשראת תהליך הניתוק.**  
חיתוך הפרח בוצע בנקודת החיבור של גבעול העוקץ (Pedicel) לבסיס הפרח, כפי שמסומן בחץ הצהוב. היפרדות הפרח מגוף הצמח מתרחשת ברקמת הניתוק (Abscission Zone, AZ) בעקבות ההשראה המלאכותית של תהליך הניתוק. ביקורת לרקמת הניתוק נלקחת מאזור סמוך שאינו חלק מרקמת הניתוק (Non Abscission Zone, NAZ).

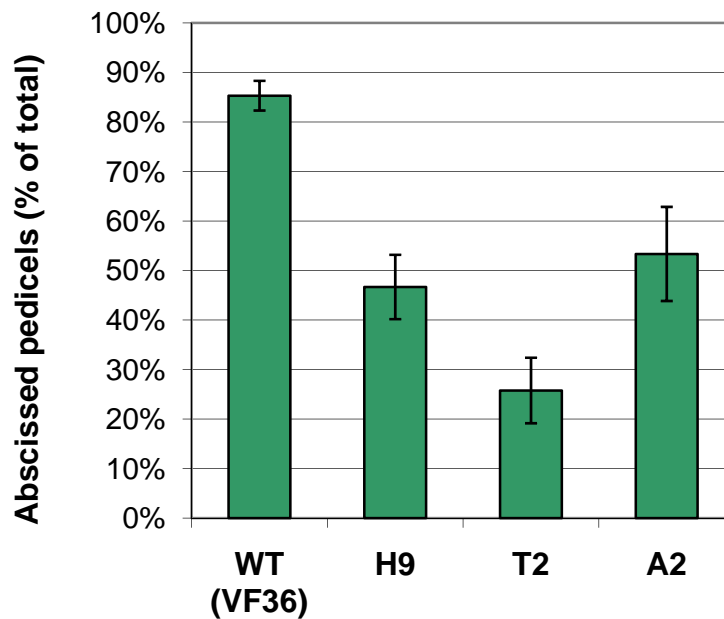
צמחי זן הבר ושלושת הקווים הטורנסגנים גודלו בחממה, תוך מתן דישון מלא להתפתחות טובה של הצמחים, לצורך קבלת מספר גדול של פרחים הדרוש לביצוע ניסויים אלו. ביום ביצוע הניסוי הוסרו כל הפרחים הפתוחים להשראת תהליך הניתוק וסומנו גבעולי העוקץ הנותרים. 24 שעות לפני אותו מועד הוסרו כל הפרחים הפתוחים, כולל גבעולי העוקץ שלהם, כדי לוודא שהפרחים הנבחנים הם רק אלו שנפתחו ביממה האחרונה. הסרה מקדימה זו

בוצעה בכדי לוודא שכל הפרחים הנכללים בניסוי הם צעירים ובשלב התפתחותי דומה. לאחר 5 שעות ממועד ההסרה נספרו גבעולי העוקץ שנשרו ואת התוצאות שבוטאו כאחוז מכלל הפרחים שנכללו בניסוי ניתן לראות באיור 6. אומנם בנקודת זמן זו אחוז גבעולי העוקץ שנשרו הוא נמוך, אך תוצאות דומות חזרו על עצמן בניסויים נוספים ובלתי תלויים.



**איור 6: השפעת עיכוב ביטוי הגן לריבונוקליאז *LX* על תהליך הניתוק בפרחים.**  
 צמחי זן הבר (VF36) ושלושת הקווים הטרנסגנים (A2, T2, H9) גודלו באדמה עם דישון אופטימלי. הניסוי בוצע בצמחים בני 12 שבועות. הוסרו 32, 49, 16, 48 פרחים לצורך השראת נשירה מהקווים A2, T2, VF36, H9, ולתאמה, ולאחר 5 שעות נספרו גבעולי העוקץ שנשרו. התוצאות מובאות כאחוז גבעולי העוקץ שנשרו מכלל הפרחים שהוסרו בכל אחד מהקווים  $\pm$  שגיאת תקן.

על-מנת לבחון את ההשפעה של עיכוב ביטוי *LX* על תהליך הניתוק בנקודת זמן מתקדמת יותר לאחר ההשראה לתהליך הניתוק בפרחים, בוצע ניסוי בתבנית דומה לזו שמתוארת למעלה ובו גודלו צמחי זן הבר ושלושת הקווים הטרנסגנים. ביום ביצוע הניסוי הוסרו כל הפרחים הפתוחים וסומנו גבעולי העוקץ הנותרים, לאחר 24 שעות ממועד ההסרה נספרו גבעולי העוקץ שנשרו (איור 7).

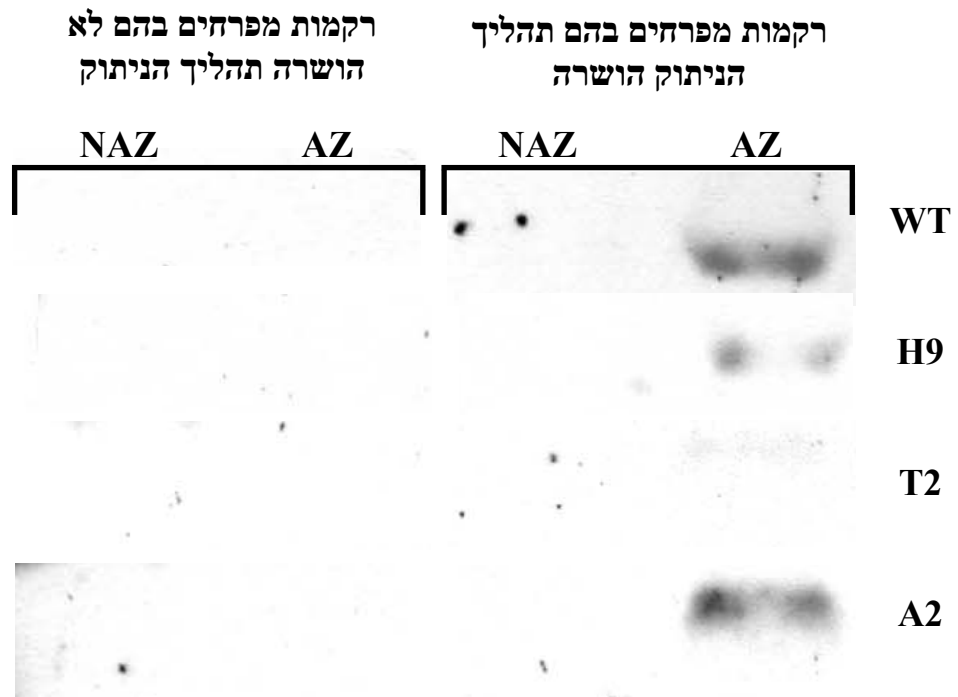


**איור 7: השפעת עיכוב ביטוי הגן לריבונוקליאז *LX* על תהליך הניתוק בפרחים.** צמחי זן הבר (VF36) ושלושת הקווים הטרנסגנים (A2, T2, H9) גודלו באדמה עם דישון אופטימלי. הניסוי בוצע בצמחים בני 11 שבועות. הוסרו 34, 30, 66, 60 פרחים לצורך השראת נשירה מהקווים VF36, H9, T2, A2, בהתאמה ולאחר 24 שעות נספרו גבעולי העוקץ שנשרו. התוצאות מובאות כאחוז גבעולי העוקץ שנשרו מכלל הפרחים שהוסרו בכל אחד מהקווים  $\pm$  שגיאת תקן.

מהתוצאות ניתן לראות כי כבר לאחר 5 שעות ממועד השראת תהליך הניתוק נמדד עיכוב מסוים של התהליך בצמחים הטרנסגנים. 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 (איור 6). ההבדלים היו עוד יותר ניכרים בניסויים בהם המדידה נעשתה 24 שעות לאחר הסרת הפרח. 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 7). 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.

### 3.2.1 ביטוי החלבון ריבונוקליאז *LX* ברקמות ניתוק של פרחים

התוצאות שהובאו לעיל מרמזות כי ל- *LX* יש תפקיד בהתקדמות תהליך ניתוק פרחים. בדקנו האם חלבון ה- *LX* מתבטא ברקמת הניתוק. ביום הניסוי בוצעה הסרה של מחצית מהפרחים שהיו על גבי כל צמח, המחצית השנייה של הפרחים לא הוסרה, ושימשה כקבוצת ביקורת. לאחר 4.5 שעות ממועד הסרת הפרחים נאספו שתי דוגמאות מכל פרח, אחת הכוללות את רקמת הניתוק והשנייה רקמת ביקורת. רקמת הביקורת היא מקטע מגבעול עוקץ הפרח אשר נמצא בסמיכות לרקמת הניתוק אבל לא כולל אותה (איור 5, NAZ). כלל החלבונים מוצו מדוגמאות הרקמה ושימשו לביצוע אנליזת Western לאחר הפרדתם בג'ל פוליאקרילאמיד (איור 8).

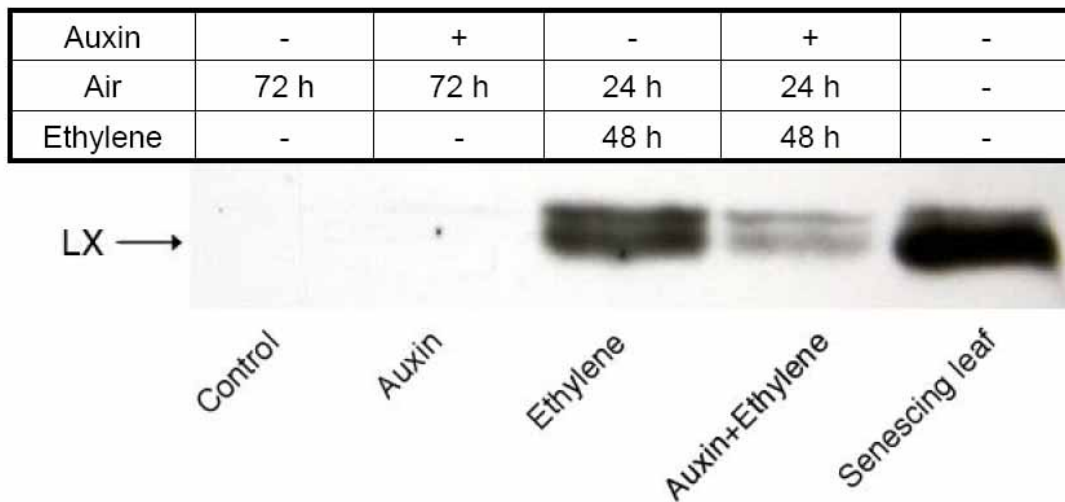


**איור 8:** רמת ביטוי החלבון ריבונוקליאז LX ברקמות ניתוק של פרחים 4.5 שעות לאחר השראת תהליך הניתוק. רמת החלבון ריבונוקליאז LX נמדדה על-ידי אנליזת Western בצמחי זן הבר (VF36) ובשלושת הקווים הטרנסגנים (A2, T2, H9). לצורך האנליזה הופקו חלבונים מדוגמאות עוקץ הפרחים הכוללות את רקמת הניתוק (AZ) ומאזור סמוך בעוקץ שאינו כולל את רקמת הניתוק (NAZ) כביקורת.

תוצאות אנליזת ה-Western מראות שרמת החלבון LX עולה באופן ספציפי ברקמת הניתוק של הפרח כבר 4.5 שעות לאחר ההשראה לנשירה, בעוד שברקמת הביקורת לא ניתן להבחין בו. רמת LX ברקמת הניתוק של פרחי הקו הטרנסגני A2 הייתה דומה לזו שנצפתה בפרחים מזן הבר, בעוד שבקו H9 ובמיוחד ב-T2 רמת החלבון הייתה נמוכה יותר. בפרחי הביקורת בהם לא בוצעה השראה לניתוק, לא נראתה עליה ברמת החלבון LX לא ברקמת הניתוק ולא ברקמת הביקורת (איור 8).

### 3.2.2. 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 לתפקידים המוצע של ההורמונים אוקסין ואתילן בתהליך הניתוק, נבדקה השפעת הורמונים 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 (200  $\mu$ M) 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 9).



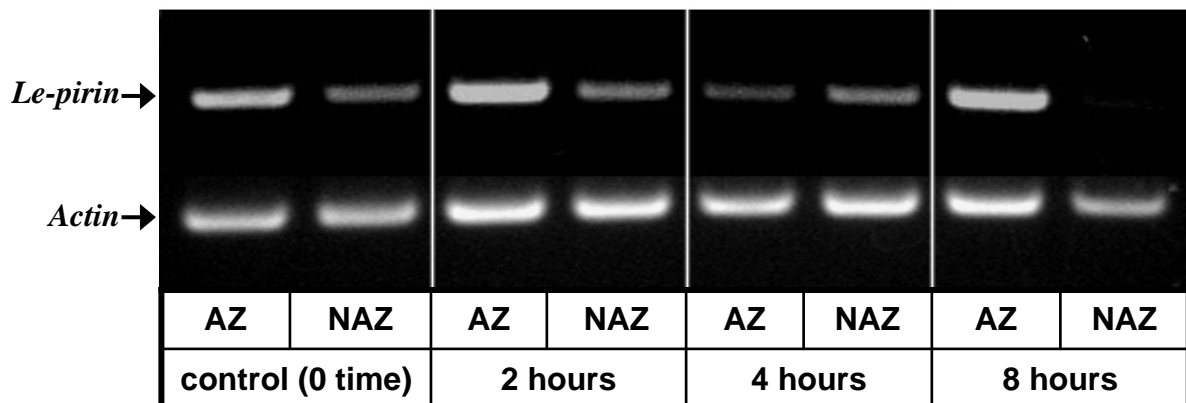
**איור 9: רמת ביטוי החלבון ריבונוקליאז LX בעלה בתגובה לטיפול בהורמונים אוקסין ואתילן.** עלי עגבנייה צעירים ומנותקים מזן הבר (VF36) נחשפו לטיפול אוקסין (Auxin), אתילן (Ethylene), טיפול משולב של אוקסין ואתילן (Auxin + Ethylene) וטיפול ביקורת של אוויר בלבד (Control) כפי שתואר. לאחר הטיפולים הופקו חלבונים מהעלים השונים (10  $\mu$ g) והם שימשו לאנליזת Western למדידת LX. כביקורת לזיהוי החלבון LX שימשה דגימת חלבון מעלה זקן (Senescing leaf).

מהתוצאות ניתן ללמוד אודות בקרת הביטוי של LX בתגובה למתן ההורמונים אוקסין ואתילן. 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 (Lers et al., 1998). 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 9). תגובה זו של החלבון LX לטיפול בהורמונים תואמת את ההיפותזה שהחלבון מעורב בתהליך הנשירה, על פי המודל המקובל לגבי תפקידי אוקסין ואתילן בתהליך הנשירה.

### 3.3. בחינת ההיפותזה לפיה מנגנוני מוות מתוכנת מעורבים בתהליך ניתוק איברים

#### 3.3.1. ביטוי הגן *Le-pirin* ברקמת הניתוק כסמן לתהליכי מוות מתוכנת

במחקר זה ובמחקר קודם (Lers et al., 2006) הראינו כי צמחים טרנסגנים המעוכבים בביטוי הגן *LX* מציגים פנוטיפ של עיכוב בנשירת עלים ופרחים. עוד הראינו כי קיים מתאם חיובי בין רמת החלבון *LX* ברקמות ניתוק של פרחים לבין מהירות התקדמות תהליך הנשירה, וכי תבנית ביטוי בתגובה להורמונים אוקסין ואתילן שקובעים מתי תרחש נשירה, מתאימה לכך שהוא מעורב בתהליך זה. תוצאות אלה מצביעות על כך ש-*LX* מעורב בתהליך הניתוק, אולם תפקידו בתהליך אינו ברור. כיוון שמעורבות *LX* בתהליכי מוות מתוכנת הוצע בספרות (Lehmann et al., 2001), השערנו הייתה שבתהליך הניתוק מתרחש תהליך של מוות מתוכנת שבו משתתף *LX*, וייתכן שקיים תהליך זה חשוב לצורך התקדמות או השלמת תהליך הניתוק. במידה ואכן תהליך מוות מתוכנת מתרחש בתאי רקמת הניתוק, צפוי שגנים אחרים הידועים ממחקרים קודמים כמעורבים במוות מתוכנת יעלו בביטויים ברקמה זו. לצורך בחינת השערה זו נבחר הגן *Le-pirin* מעגבנייה, המקודד לחלבון הומולוג לפקטור השיעתוק ההומאני *PIRIN* שמתבטא בתהליכי אפופטוזיס. ביטוי הגן *Le-pirin* מושרה בתגובה לטיפול בחומרים משרי מוות מתוכנת בתרבית תאים של עגבנייה (Orzaez et al., 2001). רמת ביטוי *Le-pirin* נמדדה ברקמות ניתוק על-ידי כימות השינוי ברמת התעתיק שלו באמצעות אנליזת PCR. תהליך הנשירה הושרה בפרחי צמחי זן בר (VF36) על-ידי הסרת הפרח. דוגמאות נלקחו מרקמות ניתוק ומרקמות ביקורת עם תחילת הניסוי (ביקורת) ולאחר 2, 4, ו-8 שעות ממועד השראת הנשירה (איור 10). בכל נקודת זמן נאספו דוגמאות מ-13 פרחים. מהדוגמאות שנאספו ואוחדו הופק RNA ששימש לסינתזת cDNA אשר היווה סובסטרט באנליזה הכמותית של ביטוי *Le-pirin*. אנליזת ה-PCR בוצעה בתוכנית של הגברה חצי כמותית (Semi Quantitative PCR) תוך שימוש בפריימרים ספציפיים לגן *Le-pirin*, וכביקורת בוצעה אנליזה דומה לגן *Actin* שביטוי אינו צפוי להשתנות (איור 10).

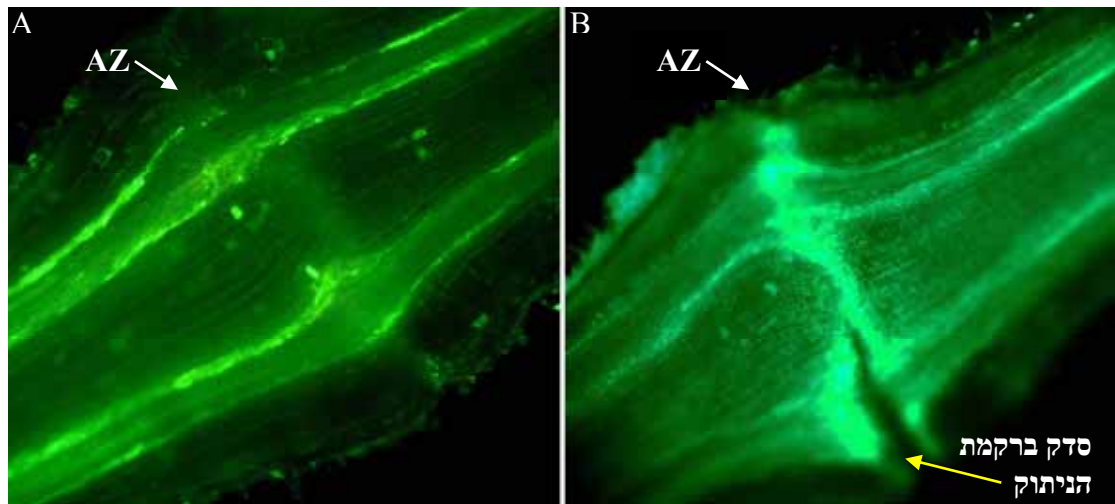


איור 10: מדידת רמת ביטוי הגן *Le-pirin* ברקמות ניתוק של פרחי זן הבר. בוצעה אנליזת PCR כמותית למדידת רמת הביטוי של הגן *Le-pirin* ברקמות ניתוק (AZ) וברקמות ביקורת (NAZ) של פרחים בזמן 0 (Control) ולאחר 2, 4 ו-8 שעות ממועד השראה לנשירה. מדידת רמת ביטוי הגן ל-*Actin* בוצעה מאותן הפקות RNA.

תוצאות הניסוי מראות שהגן *Le-pirin* מתבטא ברמה גבוהה יותר ברקמות ניתוק של פרחי עגבנייה, לעומת רקמות ביקורת. עוד לפני ההשראה המלאכותית לניתוק נצפתה רמת ביטוי גבוהה יותר ברקמות הניתוק לעומת רקמות הביקורת, ייתכן כי ביטוי הגן ברקמות הביקורת הוא תוצאה של מהלך ההתפתחות הטבעית של הרקמה. כבר לאחר שעתיים ממועד ההשראה לנשירה נמדדה עליה ברמת ביטוי הגן ל- *Le-pirin* ברקמת הניתוק. לאחר 4 שעות מההשראה לנשירה מספר תעתיקי *Le-pirin* ירד בצורה דרמטית ושוב עלה לרמה גבוהה לאחר 8 שעות (איור 10). תבנית ביטוי דומה של הגן *Le-pirin* נצפתה בניסויים מקבילים באמצעות אנליזת Microarray שבה נבחנו פרחי עגבנייה במהלך תהליך הניתוק. התוצאות שהתקבלו הראו עליה בביטוי *Le-pirin* בתחילת תהליך הניתוק, לאחריו ירידה ועליה חוזרת לקראת סיום התהליך (Meir et al, personal communication). העליה בביטוי *Le-pirin* במהלך תהליך הניתוק תומכת במעורבות של מוות מתוכנת בעת תהליך הניתוק.

### 3.3.2. נוכחות reactive oxygen species ברקמות ניתוק של פרחים ועלים

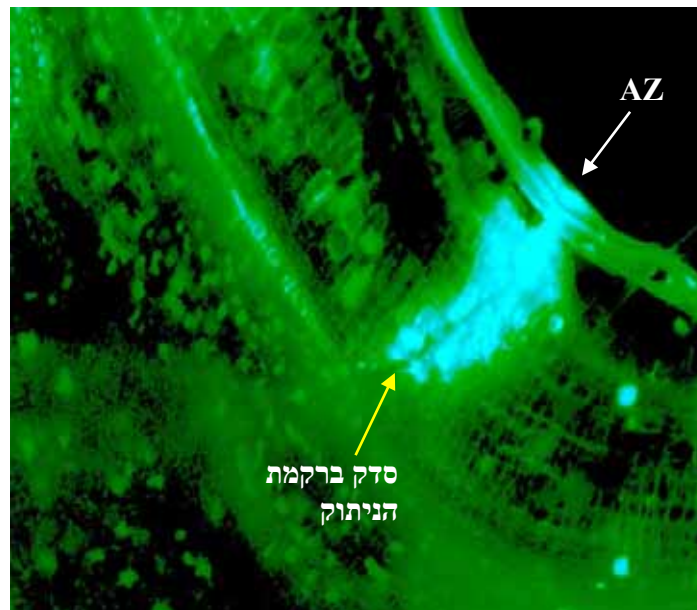
נערכו ניסויים נוספים על-מנת להמשיך ולבחון את השערתנו, לפיה ברקמות ניתוק בזמן ביצוע תהליך הניתוק, מתרחש תהליך של מוות מתוכנת. יצירת והצטברות של ROS ברקמות אשר בהן מתקיימים תהליכי מוות מתוכנת דווחה בעבר בצמחים (Hoeberichts and Woltering, 2003). על כן בחרנו לבדוק האם מתרחשת הצטברות של ROS ברקמות ניתוק בעת הניתוק. לשם כך בוצעה צביעה באמצעות הצבען DCF אשר הופך לתוצר פלורסצנטי בנוכחות ROS. תהליך הניתוק הושרה בפרחים של צמחי זן הבר (VF36) על-ידי הסרה של הפרח. כאשר נצפה תהליך ניתוק בגבעולי העוקץ בחלק מהפרחים שנכללו בניסוי, נבדקה נוכחות ROS באזור רקמת הניתוק של יתר הגבעולים בהם עדיין לא הושלם התהליך. גבעולי העוקץ נחצו לאורכם באזור רקמת הניתוק ונצבעו ב- DCF. כביקורת שימשו גבעולי עוקץ מפרחים בהם לא בוצעה השראה לתהליך (איור 11). צביעה דומה בוצעה ברקמות ניתוק של עלים אשר בהם נראה שתהליך הניתוק נמצא בשלבים מתקדמים שלו על פי דרגת הזדקנות העלה והשינויים במבנה אזור רקמת הניתוק (איור 12). זהירה חזקה (צבעים ירוק עד כחול) מעידה על נוכחות רמה גבוהה של ROS.



ביקורת

השראה לנשירה

**איור 11: צביעת DCF לנוכחות ROS ברקמות ניתוק של פרחי זן הבר.** רקמת ניתוק מפרח ביקורת שלא עבר השראה לנשירה (A) ורקמת ניתוק מפרח שעבר השראה לנשירה ותהליך הניתוק בו החל כפי שמודגם על-ידי הסדק שנוצר ומסומן בחץ הצהוב (B).



**איור 12: צביעת DCF לנוכחות ROS ברקמת ניתוק של עלה.** רקמת ניתוק של עלה בשלבים מתקדמים של תהליך הנשירה נצבעה לנוכחות ROS. אזור תחילת היווצרות הסדק כתוצאה מתהליך הניתוק מסומן בחץ הצהוב.

תוצאות אלו מראות שניתן לזהות הצטברות של ROS ברקמות ניתוק של פרחים ושל עלים ושהצטברות זאת מתרחשת בשלב מאוחר יחסית בתהליך הניתוק. במהלך הניסויים רוב הדגימות שבהן הושרה תהליך הניתוק ושנצבעו לקיום ROS הראו תמונה דומה לזו של רקמת הביקורת והציגו צביעה ברקמות ההובלה בלבד. נראה שרק כאשר תהליך הניתוק היה בשלב ספציפי מאוד, וכנראה קצר יחסית, הצלחנו לראות את הצביעות ברקמת הניתוק (איורים 11 ו-12).

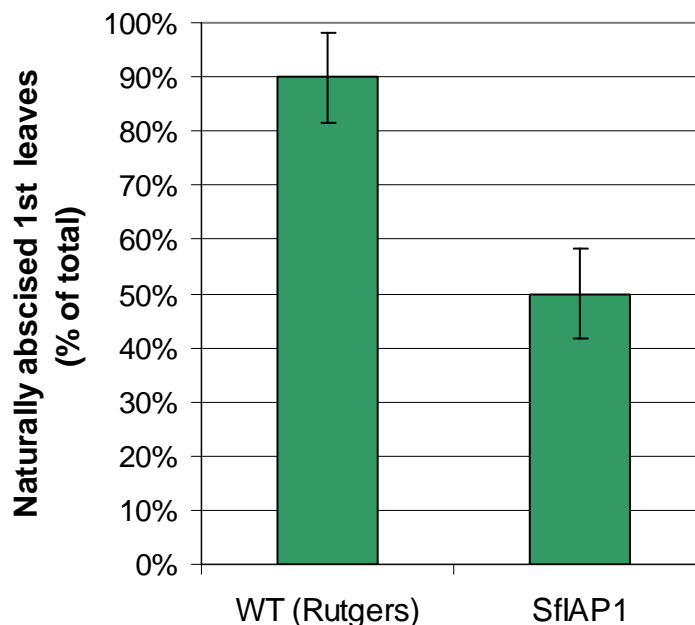


### 3.3.3. השפעת הגן למעכב אפופטוטי על קינטיקה של נשירת עלים ופרחים

כדי להמשיך לבחון את ההשערה לפיה מוות מתוכנת מתרחש ברקמות ניתוק, בחנו את השפעת ביטוי ההטרולוגי של גן אנטיאפופטוטי (Inhibitor of Apoptosis Protein, IAP) בצמחים טרנסגנים על תהליך הנשירה. 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 (Dickman et al., 2001). לצורך המחקר שלנו קיבלנו באדיבות מעבדת ד"ר 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 (Huang et al., 2000). מטרת הניסויים שערכנו הייתה לבחון האם מתרחש כל שינוי בקינטיקה של תהליך הניתוק בצמחים הטרנסגנים שמבטאים את החלבון SfIAP לעומת צמחי זן הבר.

#### 3.3.3.1. נשירת עלים בצמחים שמבטאים גן אנטיאפופטוטי

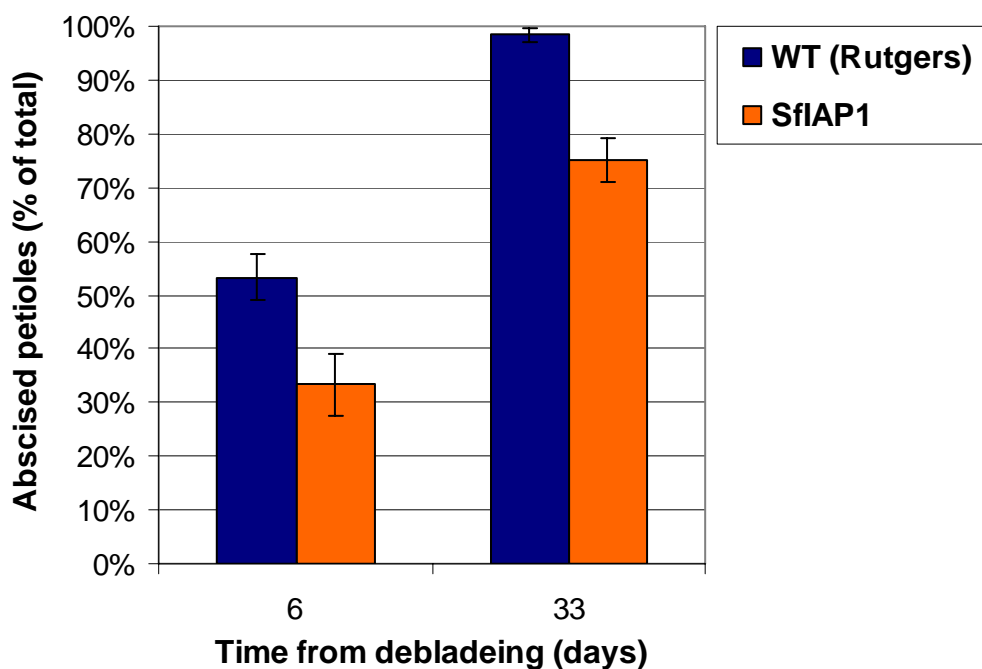
על-מנת לבחון את הקינטיקה של נשירת עלים, גודלו צמחי זן בר (Rutgers) וצמחי הקו הטרנסגני (SfIAP1) במצע אדמה מוכנה והשקיה במי ברז בלבד. תנאים אלו כאמור מזרזים את תהליך ההזדקנות והנשירה שבאה לאחר מכן. במהלך 12 שבועות הגידול הראשונים של הצמחים, בוצעה תצפית שעקבה אחר התהליך הטבעי של נשירת עלים. תוצאות השוואת תהליך ניתוק העלה הראשון של 10 צמחי זן הבר ו-10 צמחים טרנסגנים מובא (איור 13).



איור 13: השוואת מידת הנשירה של עלים בצמחים טרנסגנים המבטאים גן אנטיאפופטוטי לעומת צמחי זן הבר.

צמחי זן הבר (Rutgers) והקו הטרנסגני (SfIAP1) גודלו במשך 12 שבועות בתנאי הגבלה לנוטריינטים. מספר הצמחים מהם נשר באופן טבעי העלה הראשון מיוצגים כאחוז מסה"כ הצמחים (10 עבור כל קו)  $\pm$  שגיאת תקן.

תוצאות איור 13 מראות עיכוב משמעותי של כ- 50% בנשירת העלים הטבעית בצמחים שמבטאים את הגן *SfIAP* לעומת צמחי זן הבר. בהמשך נבחנה באותם צמחים ההשפעה של נוכחות הטרנסגן על תהליך הניתוק, וזאת לאחר השראה מלאכותית של התהליך בכל 6 עמדות העלים הראשונות (שעדיין לא נשרו) בכל אחד מהצמחים. ההשראה לנשירת העלים בוצעה באמצעות הסרה של הטרפים (Deblading) באמצעות חיתוך, פעולה הדומה במהותה לפעולת ההסרה של פרחים לצורך השראה של נשירת העוקץ. לאחר ביצוע ההשראה הנשירה נערך מעקב אחר מספר פטוטרות העלים שנשרו, כך שהתוצאות מתארות את נשירת כלל הפטוטרות בצמחים, ללא הפרדה לעמדות השונות בו הן היו על הצמח (איור 14). כיוון שכל עלה שנמצא בעמדה שונה על-גבי הגבעול נמצא בדרגת התפתחות שונה, הכללת כל העלים בקבוצה אחת גורמת לכך שמדידה זו היא גסה יחסית, אך עדיין בעלת משמעות.

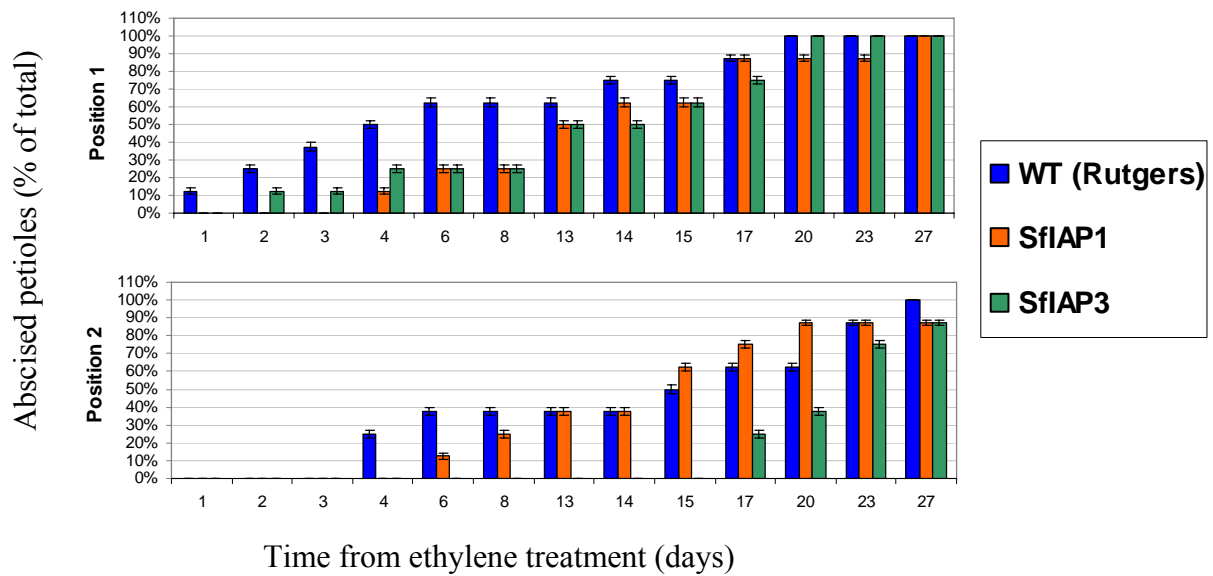


**איור 14: השוואת מידת הנשירה של עלים בצמחים טרנסגנים המבטאים גן אנטיאפופטוטי לעומת צמחי זן הבר.**

נשירת פטוטרות עלים מצמחי זן הבר (Rutgers) וצמחי הקו הטרנסגני (*SfIAP1*), 6 ו-33 ימים ממועד השראת תהליך הנשירה. הסרת הטרפים בוצעה ב- 6 עמדות העלים הראשונות על-גבי הצמחים (10 צמחים עבור כל קו). מספר הפטוטרות שנשרו מיוצגים כאחוז מסה"כ הפטוטרות. התוצאות מוצגות עם  $\pm$  שגיאת תקן.

שישה ימים לאחר השראת הניתוק נשרו מעל 50% מהפטוטרות בזן הבר בעוד שבצמחים הטרנסגנים נשרו כ- 35%. לאחר 33 יום רוב הפטוטרות בצמחי זן הבר נשרו, בעוד שבצמחים הטרנסגנים רק כ- 75% מהפטוטרות נשרו (איור 14).

על מנת להמשיך לעקוב אחר הבדלים בין צמחי זן הבר לצמחים הטרנסגנים, 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 אפינסי אופייני של פטוטרות העלים בתגובה לאתילן, הוצאו הצמחים והוחזרו לחממה. נערכה תצפית למעקב אחר קצב נשירת עלים מהעמדות השונות על גבי הצמח (איור 15). בניסוי זה נכללו 2 קווי עגבנייה טרנסגנים בלתי תלויים SfiAP1 ו-SfiAP3 (לאחר השלמת העבודה לייצוב הקו SfiAP3 כהומוזיגוט שארכה מספר חודשים).



**איור 15: השוואת מידת הנשירה של עלים בצמחים טרנסגנים המבטאים גן אנטיאפופטוטי לעומת צמחי זן הבר.**

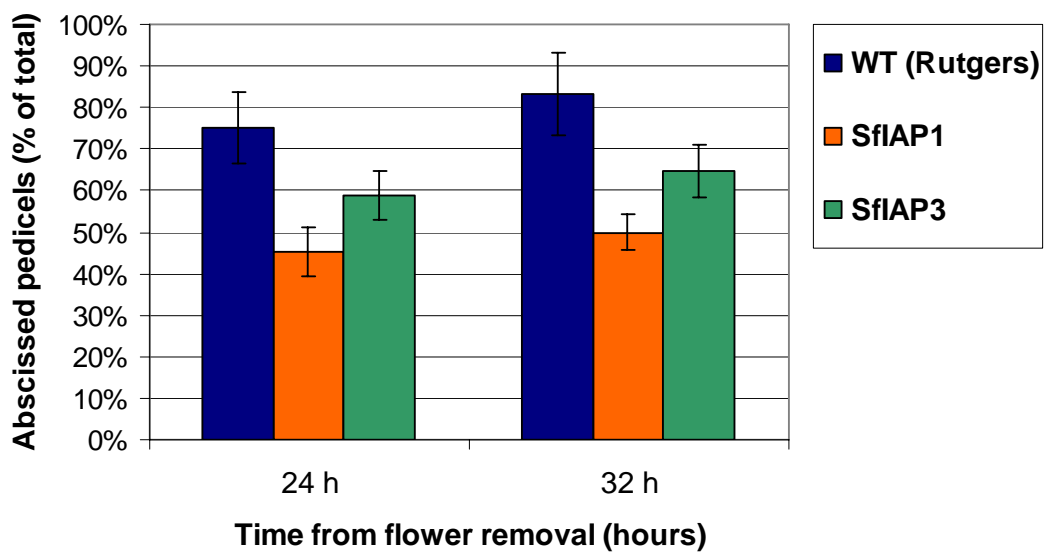
נשירת פטוטרות עלים מצמחי זן הבר (Rutgers) ומצמחי הקווים הטרנסגנים (SfiAP3, SfiAP1) לאחר השראה לנשירה, שבוצעה על-ידי הסרת טרפים וטיפול עוקב באתילן חיצוני. הגרפים מתארים נשירה מעמדת עלים ראשונה (גרף עליון) ושנייה (גרף תחתון) על גבי הגבעול. הניסוי בוצע על 8 צמחים מכל קו. התוצאות מוצגות עם  $\pm$  שגיאת תקן.

טיפול צמחים בעזרת אתילן חיצוני אכן הביא לזירוז תהליך נשירת פטוטרות העלים, ונשירה זו עוכבה בצמחים הטרנסגנים שמבטאים גן אנטיאפופטוטי יחסית לצמחי זן הבר. לדוגמה בעמדת עלים ראשונה, ביום 6 לאחר הטיפול, נשרו 62.5% מהפטוטרות 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 15). תוצאות דומות, שהדגימו פער גדול בין מועד תחילת הנשירה בצמחי זן הבר לבין הצמחים הטרנסגנים, נצפו גם בעמדות עלים שלוש וארבע (data unpublished). 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.

### 3.3.3.2. נשירת פרחים בצמחים שמבטאים גן אנטיאפופטוטי

ניסויים דומים לאלו שתוארו לעיל בוצעו בכדי ללמוד על השפעת נוכחות הגן האנטיאפופטוטי על נשירת פרחים בנוסף להשפעה שנצפתה בעלים. צמחי זן הבר והקווים הטרינסגנים גודלו בחממה בעציצים, בתנאי השקיה ודישון אופטימאליים. בגיל 10 שבועות בוצעה השראה לנשירה על-ידי הסרת פרחים שהיו בשלב התפתחותי דומה. לאחר 24 ו-32 שעות מהשראת תהליך הניתוק נספרו גבעולי העוקץ שנשרו ואחוז הפרחים בהם הושלם תהליך הניתוק חושב עבור כל קו (איור 16).



**איור 16: השוואת מידת הנשירה של פרחים בצמחים טרינסגנים המבטאים גן אנטיאפופטוטי לעומת צמחי זן הבר.**

צמחי זן הבר (Rutgers) והקווים הטרינסגנים (SflAP3, SflAP1) גודלו בחממה. בגיל 10 שבועות הוסרו, 12, 17, 22, פרחים מהקווים WT, SflAP3, SflAP1, בהתאמה, ולאחר 24 ו-32 שעות נספרו גבעולי העוקץ שנשרו. אחוז גבעולי העוקץ שנשרו מכלל הפרחים שבהם הושרה התהליך על-ידי הסרת הפרח מוצג עבור כל אחד מהקווים  $\pm$  שגיאת תקן.

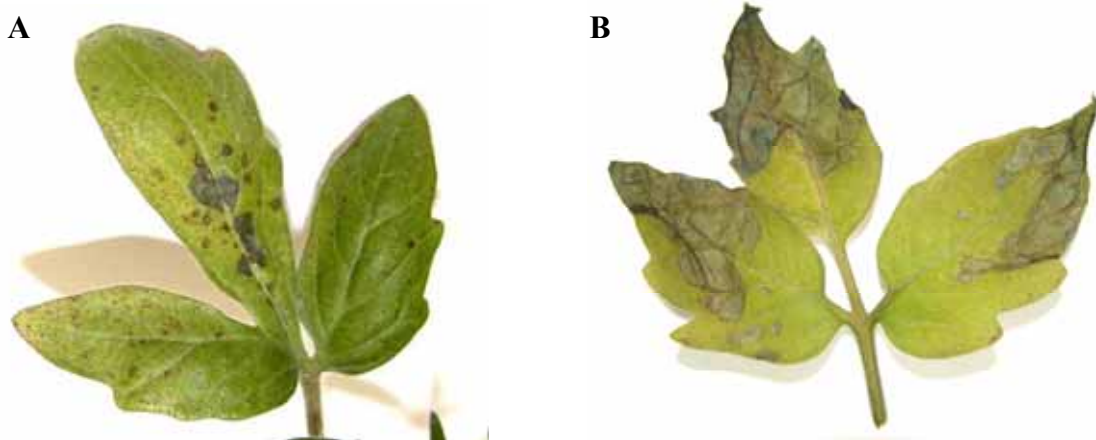
בנוסף לעיכוב בנשירה של עלים, ניתן לראות כי נשירת פרחים גם היא מעוכבת בצמחים הטרינסגנים שמבטאים גן אנטיאפופטוטי בהשוואה לצמחי זן הבר. בעוד ש-75% מפרחי זן הבר נשרו לאחר 24 שעות, רק 45.5% נשרו מפרחי הקו SflAP1 ובקו SflAP3 נשרו 58% מהפרחים. יחסים דומים בשיעור הנשירה בין הקווים נשמר גם בנקודת זמן של 32 שעות ממועד השראת התהליך (איור 16).

### 3.4. מעורבות הגן לריבונוקליאז *LX* בתהליכי מוות המופעלים בתנאי הרעבה לזרחן

ממחקרים קודמים ידוע שביטוי הגן *LX* כמו ריבונוקליאזות נוספות, עולה במהלך חשיפת צמחים (Kock et al., 2006) או תאים בתרבית להרעבה לזרחן (Loffler et al., 1992; Lehmann et al., 2001). 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.

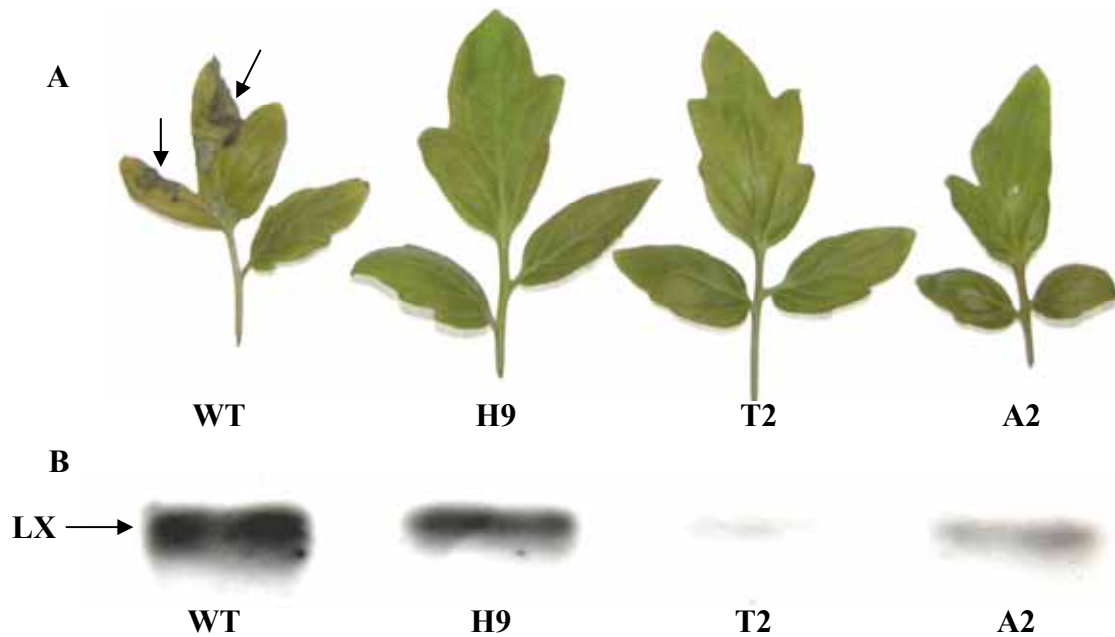
#### 3.4.1. התפתחות נקרוזות בהרעבה לזרחן

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, פטוטרות העלים אופיינו בגדילה אפינסטית, העלים היו בצבע ירוק כהה והציגו הצטברות גבוהה של פיגמנטים אנתוציאנינים לעומת צמחי הביקורת. הבדל נוסף אותו זיהינו לאחר כ-10 ימים של גידול בתמיסה חסרת הזרחן היה תופעה של מוות תאים בצורת נקרוזות שחורות. הנקרוזות שהתחילו בנקודות ממוקדות על-גבי העלה, המשיכו להתפתח כך שחלקים גדולים של העלה מתו, עד שהוא נשר (איור 17). עלים בוגרים פיתחו את תופעת מות התאים מוקדם יותר מעלים צעירים. תופעה זו לא נצפתה כלל בצמחי הביקורת שגדלו בתמיסת המזון המלאה.



איור 17: 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)

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, הופתענו לראות כי הצמחים המעוכבים בביטוי *LX*, מפתחים את הנקרוזות בשלב מאוחר יותר באופן מובהק לעומת צמחי זן הבר. התופעה מומחשת באיור 18A בה מצולמים עלים מייצגים מאותה עמדה על הצמח מצמח זן הבר (VF36) ושלושת הקווים הטרנסגנים (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 18B).

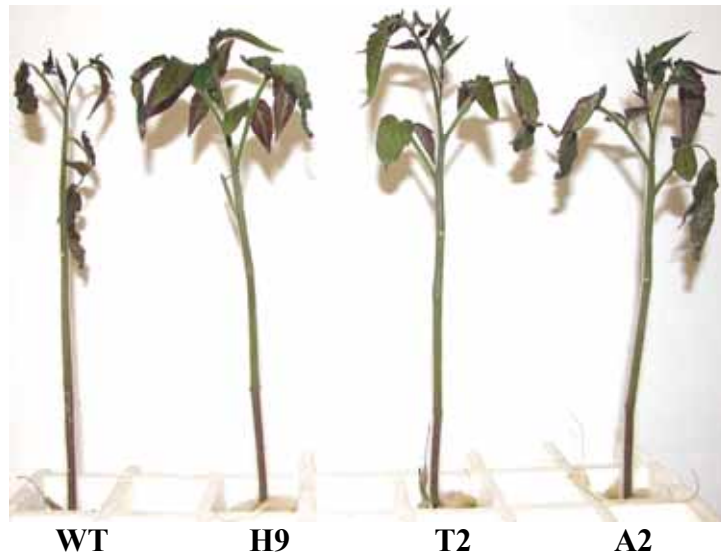


**איור 18: התפתחות נקרוזות בתנאי הרעבה לזרחן בצמחים המעוכבים בביטוי ריבונוקליאז *LX* לעומת צמחי זן הבר ורמת ביטוי החלבון *LX* בקווים השונים.**  
 נבטים בגיל 25 יום של צמחי זן הבר (VF36) ושלושת הקווים הטרנסגנים (A2, T2, H9) שגדלו במצע מלא, הועברו לגידול הידרופוני במצע חסר זרחן. לאחר 14 יום צולמו עלים מייצגים מכל קו, העלים הם מעמדה ראשונה והחצים מצביעים על אזורי נקרוזה (A). אנליזת Western של חלבון מעמדה ראשונה של צמחים 8 ימים לאחר העברה לתמיסה הידרופונית חסרת זרחן ולפני התפתחות נקרוזות.  $5\mu\text{g}$  חלבון הוטען על גבי הג'ל (B).

באיור 18A ניתן לראות כי בעוד שצמחי זן הבר מפתחים כתמים נקרוטיים בולטים לעין בעקבות המחסור בזרחן, עדיין לא ניתן להבחין כלל בסימני נקרוזה בצמחים הטרנסגנים שבהם הופעתם נדחתה. בצמחים הטרנסגנים סימני נקרוזה הופיעו לאחר המשך גידול של כשבוע ימים. תוצאות אנליזת ה-Western מצביעות על כך שאכן רמת החלבון *LX* כצפוי נמוכה יותר בשלושת הקווים הטרנסגנים לעומת זן הבר, כאשר בקווים T2 ו-A2 יש הפחתה משמעותית מאוד ברמת *LX*. תוצאות אלה מראות קשר חיובי בין רמת ביטוי *LX* לבין רמת היווצרות נקרוזות

בעלים שגדלים ללא זרחן (איור 18B). החלבון LX לא זוהה כלל בעלים שגדלו בנוכחות זרחן בתמיסת הגידול (unpublished data).

כאשר המשכנו לעקוב אחר גידול הצמחים בתנאי ההרעבה לזרחן, ראינו כי הצמחים הטרנסגנים מציגים עלווה רבה יותר מאשר צמחי זן הבר, כפי שניתן לראות באיור 19, בו מצולמים צמחונים מייצגים שגדלו 30 יום ללא זרחן בתמיסה.



**איור 19: התפתחות צמחים בתנאי הרעבה לזרחן בצמחים המעוכבים בביטוי ריבונוקליאז LX לעומת צמחי זן הבר.**

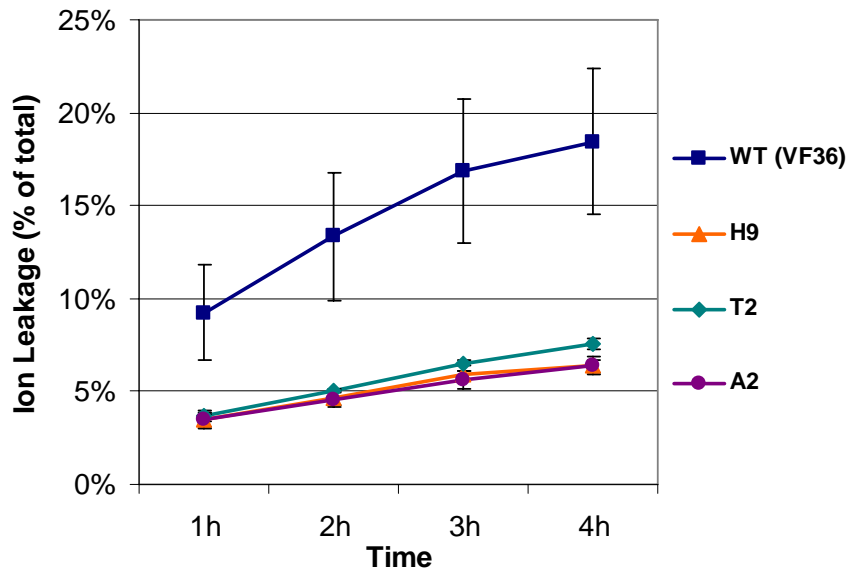
צמחי זן הבר (VF36) ושלושת הקווים הטרנסגנים (A2, T2, H9) הועברו לגידול הידרופוני בתמיסה חסרת זרחן. לאחר 30 יום צולמו צמחונים מייצגים מכל קו.

תופעת מוות התאים והתרחבות הנקרוזות משפיעה על מופע הצמחים בהמשך הגידול ללא זרחן ויתכן שהיא הגורמת לכך שבצמחים הטרנסגנים נראה ריבוי עלים לעומת צמחי זן הבר (איור 19). זאת ככל הנראה השפעה משנית שנובעת מהאטה בתמותה ובנשירה של העלים כתוצאה מהנקרוזות בצמחים הטרנסגנים לעומת זן הבר.

### **3.4.2. השפעת הרעבה לזרחן על זליגת יונים מהעלים**

בכדי לבחון האם ניתן 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 (Krzymowska et al., 2007). במחקרים שונים נעשה שימוש בקצב זליגת היונים כמדד להתקדמות תהליכי מוות (Watanabe and Lam, 2006). שינויים בקצב זליגת היונים נמדדו עבור צמחי זן הבר ושלושת הקווים הטרנסגנים. 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 20).

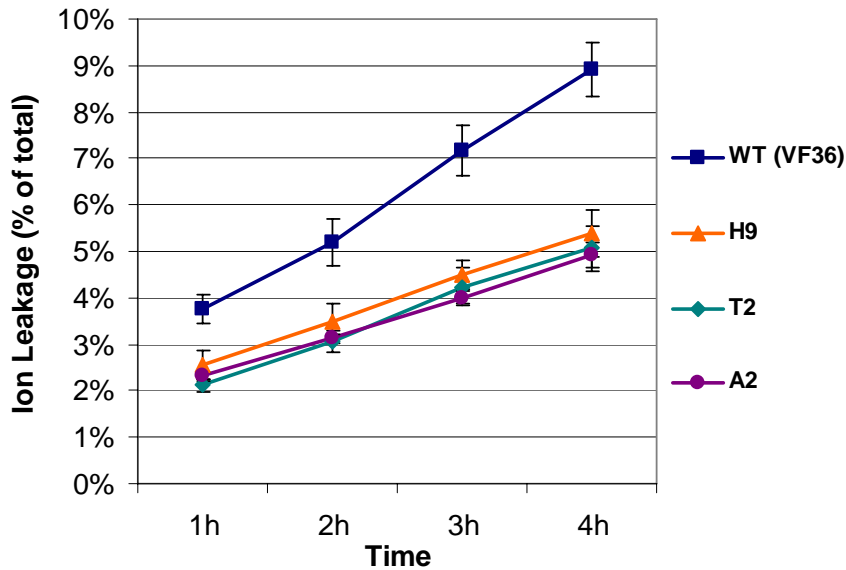


**איור 20:** זליגת יונים בצמחי זן הבר ובצמחים הטרנסגנים בהשפעת הרעבה לזרחן. צמחי זן הבר (VF36) ושלושת הקווים הטרנסגנים (A2, T2, H9) שגדלו במצע מלא, הועברו לגידול הידרופוני במצע חסר זרחן. לאחר 12 יום נאספו עלים מעמדה שנייה, שבחלקם נצפתה התחלת היווצרות נקרוזות, והם שימשו למדידת זליגת יונים. כל נקודה מייצגת ממוצע של 3 מדידות (מ-3 עלים שונים)  $\pm$  שגיאת תקן.

בתנאי גידול של מחסור חריף לזרחן קצב זליגת היונים בעלים של הצמחים הטרנסגנים 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 הטרנסגנים (איור 20).

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 21).





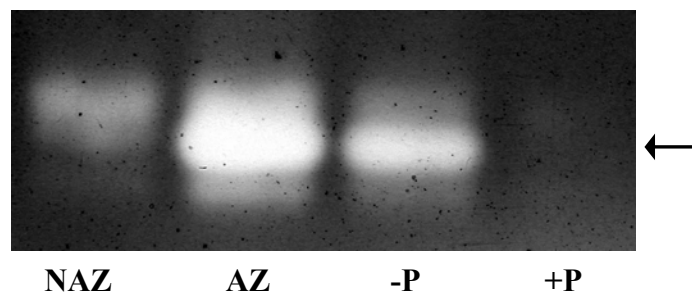
**איור 21:** זליגת יונים בצמחי זן הבר ובצמחים הטרונסגנים בהשפעת הרעבה לזרחן. צמחי זן הבר (VF36) ושלושת הקווים הטרונסגנים (A2, T2, H9) שגדלו במצע מלא, הועברו לגידול הידרופוני במצע חסר זרחן. לאחר 15 יום נאספו עלים מעמדה שנייה, שטרם נצפתה בהם התחלת היווצרות נקרוזות, והם שימשו למדידת זליגת יונים. כל נקודה מייצגת ממוצע של 5 מדידות (מ-5 עלים שונים)  $\pm$  שגיאת תקן.

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 בממבראנות התאים, אולי כתוצאה מתהליך מוות. חיזוק לכך מתקבל ממדידת ערכי זליגת יונים נמוכים יחסית בעלים שטרם נצפו בהם נקרוזות (איור 21) בהשוואה לערכי זליגת יונים גבוהים יחסית בעלים שמציגים נקרוזות (איור 20). גם בניסוי זה התקבלה רמת זליגת יונים נמוכה באופן מובהק בצמחים הטרונסגנים לעומת צמחי זן הבר, הערכים שנמדדו לאחר 4 שעות הם 5% לעומת 9% בהתאמה (איור 21).

### 3.4.3. אפיון תופעת היווצרות הנקרוזות

3.4.3.1. אנליזת פעילות נוקליאזות בעלי עגבנייה שגודלו בתנאי הרעבה לזרחן בעקבות זיהוי התפתחות הנקרוזות בעלי צמחים הגדלים בתנאי הרעבה לזרחן ועיכוב התפתחותן בצמחים הטרונסגנים בהם ביטוי *LX* עוכב, הועלתה ההשערה שנקרוזות 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 (Ito and Fukuda, 2002), 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 (Lers et al., 2001). 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 22).



**איור 22: אנליזת פעילות בג'ל של נוקליאזות המושרות בתגובה להרעבה בזרחן ובתהליך הניתוק לאחר השראת התהליך.**

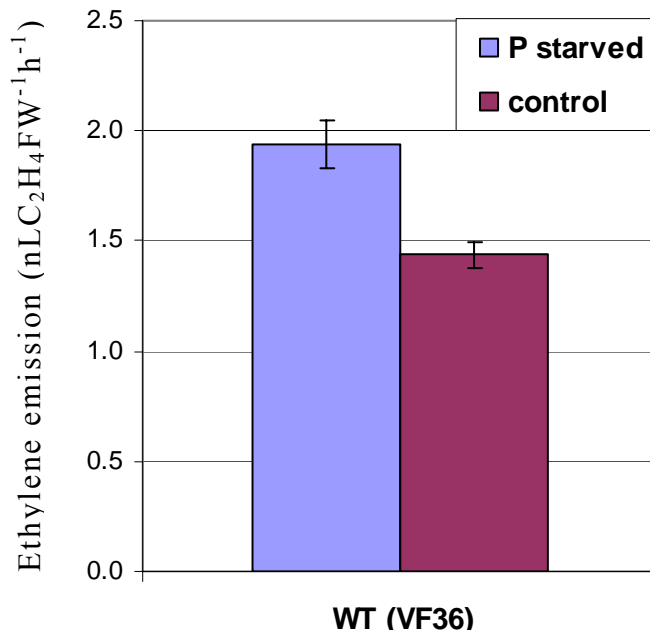
דוגמאות חלבון מוצו מרקמות עלים של צמחי זן הבר (VF36). רקמות עלים מצמחים שגדלו בצורה הידרופונית על מצע מלא (+ P) או מצע חסר זרחן (- P); רקמות ניתוק של פרחים בשלב סמוך לניתוק (AZ); רקמות ביקורת מעוקצי הפרחים (NAZ). על הג'ל הוטענו  $20 \mu\text{g}$  חלבון כללי. החץ מסמן את מיקום הנוקליאז שפעילותו עלתה.

בתנאי הרעבה לזרחן יש עליה בפעילות נוקליאז ספציפי (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. ייתכן שאנזים זה מעורב בתהליכי מוות המתרחשים הן ברקמת הניתוק עם התקדמות התהליך והן בעלים לאחר הרעבה לזרחן (איור 22).

### 3.4.3.2 השפעת ההורמון אתילן על היווצרות נקרוזות 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 (Bae et al., 2006). 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 בצנצנות זכוכית אטומות בעלות נפה 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 כפי שמתואר בפרק השיטות (איור 23).



**איור 23: 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  $\pm$  שגיאת תקן.

מאיור 23 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.

**3.4.3.3. השפעת מעכב פעילות האתילן 1-MCP על היווצרות הנקרוזות בתנאי מחסור בזרחן**  
ממחקר קודם ידוע שביטוי *LX* מושרה על-ידי אתילן (Lers et al., 1998), 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 חישת האתילן 1-Methylcyclopropene (1-MCP) הידוע כמעכב יעיל מאוד שחוסם את הקולטנים לאתילן (Blankenship and Dole, 2003). 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 מיעילותו 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	-	-

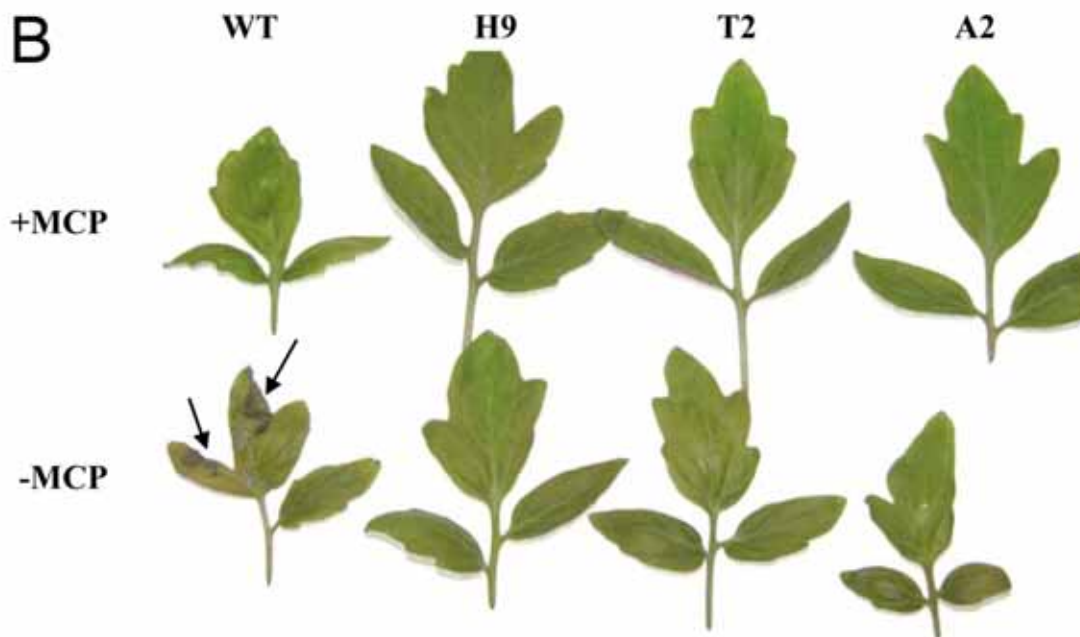
**טבלה 1: סיכום הטיפולים בניסוי השפעת מעכב פעילות האתילן 1-MCP על היווצרות הנקרוזות בתנאי מחסור בזרחן.**

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 24 מצולמים 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 25 מסוכמים מדדי קצב זליגת היונים של הטיפולים השונים.

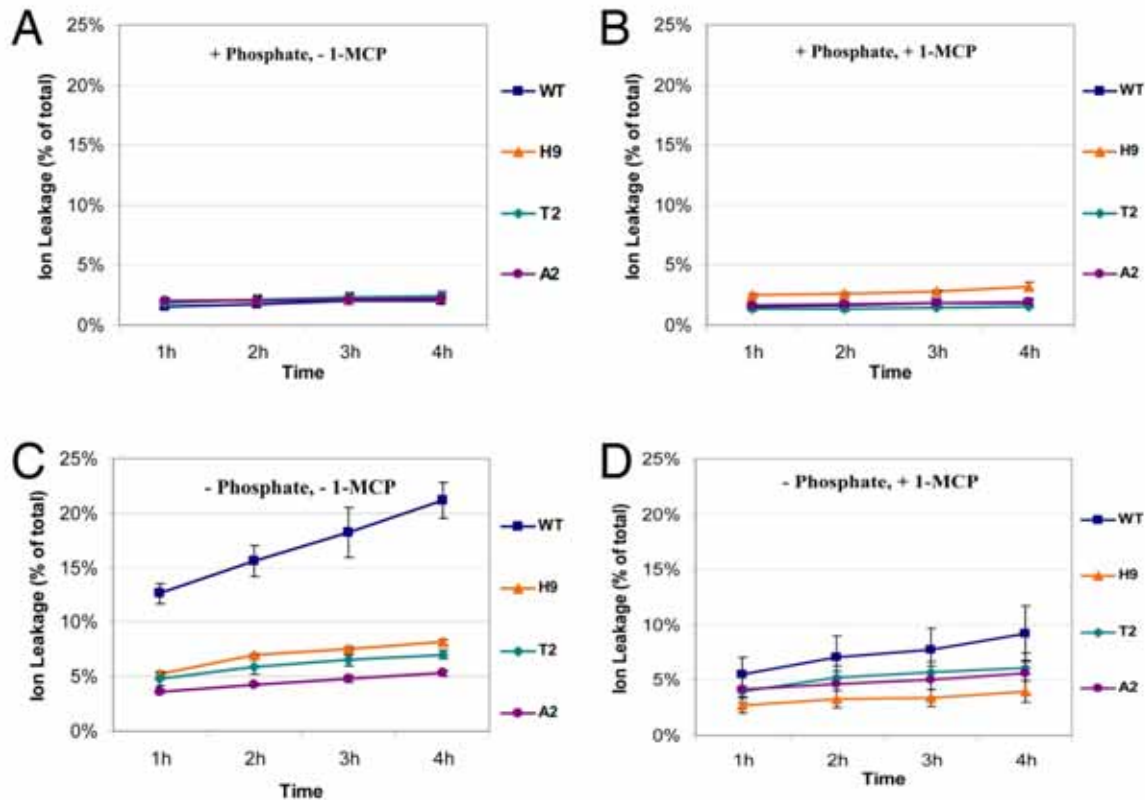
גידול בתמיסת מזון עם זרחן



גידול בתמיסת מזון ללא זרחן



**איור 24: השפעת יישום 1-MCP על התפתחות נקרוזות בצמחים שגדלו בתמיסות הידרופוניות.**  
 צמחי זן הבר (VF36) ושלושת הקווים הטרנסגנים (A2, T2, H9) גודלו במערכות הידרופוניות. 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 25: 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 במעב 1-MCP (איור 25, A, B). לעומת זאת בצמחונים שגדלו ללא זרחן נמדדה השפעה ניכרת של הטיפול במעב 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 מעב פעילות האתילן 1-MCP בצמחי זן הבר האט את קצב זליגת היונים שנגרם עקב חשיפת הצמחים למחסור בזרחן (איור 25, C, D). לעומת זאת בצמחים הטרנסגנים שגדלו ללא זרחן, זליגת היונים הייתה נמוכה ללא תלות בחשיפה למעב; בקווים A2 ו-T2 לא הייתה כלל השפעה לטיפול המעב, ואילו בקו H9 יישום ה- 1-MCP הוביל לעיכוב ברמת זליגת היונים (איור 25, C, D).

#### 4. דיון

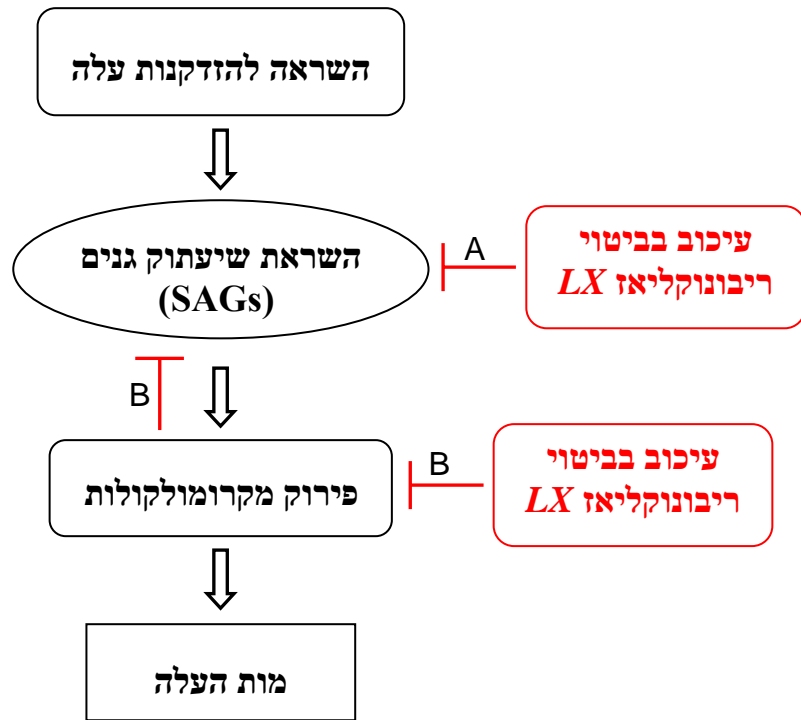
##### מעורבות ריבונוקליאז *LX* בתהליכי הזדקנות עלים

בעבודה זו אופיינו צמחי עגבנייה טרנסגנים בהם רמת ריבונוקליאז *LX* הייתה נמוכה יחסית לזן הבר עקב עיכוב בביטוי הגן.

על פי מחקרים שונים שבוצעו בעבר אשר הדגימו עליה בפעילות ריבונוקליאזות או השראת ביטוי גנים המקודדים להם במהלך הזדקנות העלים, הועלתה ההשערה כי תפקיד ריבונוקליאזות אלו בהזדקנות הוא פירוק לא ספציפי של מולקולות ה-RNA שמאפשר מיחזור תוצרי הפירוק (בעיקר זרחן) לרקמות מבלע בצמח (Bariola and Green, 1997). במחקר שנערך במסגרת עבודה זו נבחנה השפעת עיכוב ביטוי *LX* על תהליך ההזדקנות בעגבנייה כשתהליך זה זורז על ידי גידול בתנאים מגבילים, אולם פחות קיצוניים יחסית לניסויים שבוצעו בעבר (Lers et al., 2006). ראינו כי תהליך ההזדקנות נדחה בצמחים הטרנסגנים בתנאי גידול של הגבלת דישון והגבלת נפח שורשים. התנאים המגבילים לא היו חריפים ביותר (איורים 2, 3 ו-4). תוצאות אלה מבססות את הקשר בין פעילות *LX* ובין התקדמות תהליך ההזדקנות, ומראות שקשר זה מתקיים לא רק בתנאי גידול קיצוניים המשרים את האצת ההזדקנות אלא גם בתנאים פחות מגבילים, שעדיין מאיצים את תהליך ההזדקנות יחסית לזה המתרחש בתנאי גידול מיטביים.

בראשיתו של המחקר לא ציפינו כי עיכוב בביטוי של *LX* ישפיע על השראת התקדמות תהליך הזדקנות עלים, כיוון שמאנליזות ביטוי נמצא כי הוא עולה בעיקר בשלבים המאוחרים של התהליך. ניתן להעלות שתי אפשרויות היפותטיות לדרך פעולתו של *LX* בהזדקנות עלים, המסוכמות באיור 26, אשר יכולות להסביר את השפעת עיכוב ביטוי *LX* על התקדמות תהליך ההזדקנות. אפשרות אחת היא שקיים היזון חוזר או תאום בין התקדמות התהליך הקטבולי ושחרור תוצרי הפירוק של המקרומוולקולות בתהליך ההזדקנות לבין המערכת שמבקרת את התקדמות התהליך. במידה ועיכובו של *LX* גורם להפחתה ברמת הזרחן המיוצא מהעלה עקב ההאטה בפירוק ה-RNA יתכן והדבר מתורגם להאטה בהתקדמות תהליך ההזדקנות על ידי המערכת המבקרת. אפשרות נוספת היא של-*LX* יש תפקיד ספציפי יותר במנגנון בקרה שלילי, שלאחר השעתוק, המעורב בבקרת ביטוי גנים שמעכבים את תהליך ההזדקנות. עד כמה שידוע, הריבונוקליאז *LX* הוא חסר ספציפיות מיוחדת לרצפים מסוימים בפעילותו לפירוק RNA, אולם פעילותו נבדקה עד היום רק כאנזים מנוקה בתנאי in-vitro. יתכן שבפעילותו בתא הוא ממוקם בקומפלקס יחד עם חלבונים אחרים דבר המעניק לו את הספציפיות הדרושה. לאחרונה דווח על מעורבות ריבונוקליאזות בבקרת תהליכים ספציפיים בצמחים באמצעות מעורבותם בפירוק טרנסקריפטים של גנים המשתתפים בתהליך. הגן לריבונוקליאז *XRN4* מארבידופסיס זוהה כמרכיב חיוני בתהליך הבקרה של התגובה לאתילן. נמצא ש-*XRN4* מהווה חלק מהמערכת המבקרת את יציבות הטרנסקריפט של הגנים *EBF1/2* המקדדים לחלבון מטיפוס F-Box protein. חלבון זה מעורב בבקרת יציבות פקטור השעתוק *EIN3* החיוני לביטוי גנים הנתונים לבקרה על ידי אתילן (Potuschak et al., 2006). בדיווח נוסף הריבונוקליאז *CER7* הוצע כבעל תפקיד בבקרת גנים המשתתפים בביוסינטזת מרכיבי שעווה של הקוטיקולה בארבידופסיס (Hooker et al., 2007).

**איור 26:** מודל סכמתי של תהליך הזדקנות עלה ושתי זרכים היפותטיות למעורבות LX בתהליך. לאחר שמתרחשת השראה להזדקנות העלה כתוצאה מגורמים שונים ישנה השראה לשיעתוק גנים שמשותפים בתהליך (SAGs). בהמשך ישנו פירוק מאסיבי של מקרומולקולות ומות העלה. LX עשוי להיות מעורב במנגנון הבקרה של התהליך על ידי השתתפות בקומפלקס חלבוני שמעניק לו ספציפיות לפירוק גני מטרה (A). או שתוצרי הפירוק כתוצאה מפעילותו משפיעים בדרך של היזון חוזר על אלמנטים בתהליך (B).



התוצאות שלנו, שמראות שעלים בוגרים (פסיגים ועלים מעמדה ראשונה) מהם הזרחן צריך להיות ממוחזר לעלים הצעירים יותר, הציגו עיכוב בהזדקנות בצמחים הטורנסגנים לעומת צמחי זן הבר, יכולות לתמוך בכך שעיכוב בביטוי LX פוגע במיחזור הזרחן בצמח. ייתכן כי ירידה בביטוי LX מביאה לפגיעה ביכולת מיחזור הזרחן, וכתוצאה מכך מצטברת כמות גדולה יחסית של מקורות זרחן בעלים הבוגרים ונוכחותם בדרך כלשהיא מעכבת את הזדקנותם של העלים. הסבר זה, בדומה לזה שהוצג למעלה, מניח שקיים היזון חוזר בין תהליך פירוק החומצות הנוקלאיות לצורך מיחזור הזרחן לבין המערכת המבקרת את התקדמות תהליך ההזדקנות. תמיכה נוספת לכך מצמחים שמעוכבים בביטוי ריבונוקליאזות עשויים להיות פגועים במיחזור זרחן באה משתי עבודות קודמות שנערכו בעגבנייה (Lers et al., 2006) ובארבידופסיס (Bariola et al., 1999) שמציגות הצטברות אנתוציאנינים בעלים הצעירים של הצמחים הטורנסגנים, צבירה זו מאפיינת צמחים הגדלים בתנאי עקת זרחן. יחד עם זאת עדות ישירה לתפקיד ריבונוקליאזות במיחזור זרחן טרם הוצגה.

### מעורבות ריבונוקליאז LX בתהליך ניתוק פרחים

בעבודה הנוכחית הראנו, כי בנוסף לעיכוב בנשירת עלים (Lers et al., 2006), מתקבל עיכוב בנשירת פרחים בצמחים המעוכבים בביטוי LX (איורים 6 ו-7). מכאן אנו מניחים כי ל-LX יש תפקיד בנשירת איברים, הן עלים והן פרחים. הנחה זו נתמכת בתבנית ביטוי LX אשר אובחן כעולה באופן ספציפי ברקמות ניתוק של עלים (Lers et al., 2006) ושל פרחים (איור 8) אחרי השראה לנשירה. בנוסף, רמתו נמוכה ברקמות ניתוק פרחים בצמחים הטורנסגנים, באופן שמתאים לעיכוב הנצפה בנשירת הפרחים (איור 8). תוצאות אלה תומכות במעורבות LX בתהליך ניתוק איברים בעגבנייה. תצפית קודמת הראתה עליה בביטוי ההומולוג ל-LX מטבק, ברקמות ניתוק של



עלי טבק בשלבי הזדקנות מתקדמים (Lers et al., 2006). מכך ניתן להעלות את האפשרות שריבונוקליאזות מהוות מרכיב בסיסי במכניזם של תהליך ניתוק איברים בצמחים ממינים שונים.

ההגברה אותה זיהינו ברמת החלבון ל- LX (איור 8), נתמכת על ידי תוצאות אנליזת Microarray (Meir et al., personal communication). באנליזת ה-Microarray, נבחנה תבנית ביטוי גנים מרקמת ניתוק של פרחי עגבנייה, לאחר השראת הניתוק. נמצא כי ביטוי הגן ל- LX היה ספציפי לרקמת הניתוק, והחל להתגבר כבר שעתיים לאחר ההשראה לנשירה והמשיך לעלות בכל נקודות הזמן שנבחנו (4, 8, ו-14 שעות) ממועד הסרת הפרח.

העיכוב בקינטיקה של הנשירה בצמחים הטרנסגנים לעומת צמחי זן הבר ניכר כבר שעות ספורות לאחר הסרת הפרח (איור 6). ככל שמשיך הזמן התאריך ממועד הסרת הפרח ותהליך הניתוק התקדם, היטשטשו ההבדלים בין הצמחים הטרנסגנים לבין הצמחים מזן הבר. ככל הנראה הסיבה לכך היא שעייכוב ביטוי הגן LX אינו מלא אלא רק חלקי בצמחים הטרנסגנים, ועם הזמן מתרחשת עליה ברמת החלבון LX האנדוגני שנובעת מהגברת רגישות הרקמה לאתילן ועליה בביטוי הגן ל- LX, עליה שמאפשרת את המשך התקדמות התהליך.

בתנאי ההשראה לנשירה המתוארים, כיוון שתהליך הניתוק מתרחש בצורה מהירה, מתקבלת נשירה של העוקץ בעודו ירוק וכשטרם נצפו כל סימני הזדקנות ברקמה. מצב דומה מתרחש כאשר נשירת העלים מזורזת על-ידי חשיפת צמחים לאתילן חיצוני ומתרחשת לפני שהעלים הנושרים מזדקנים (Lers et al., 2006). על כן נראה שעייכוב תהליך הניתוק הן בפרחים והן בעלים נובעים ממעורבות LX בתהליך הניתוק עצמו, ולא כתוצאה משנית מההשפעה של עייכוב ביטוי להאטת תהליך ההזדקנות.

השראת ביטוי LX בעלה עגבנייה צעיר בתגובה למתן אתילן הודגמה בעבר ומתרחשת עוד לפני שנראים כל סימני הזדקנות (Lers et al., 1998; Lers et al., 2006). ממצא זה מראה שהגן נתון לבקרת אתילן אף לפני התרחשות תהליך ההזדקנות של העלה. בניסויים שערכנו נמצא שכאשר טיפול באוקסין לעלה הצעיר מקדים את החשיפה לאתילן מתקבל עייכוב בביטוי LX לעומת הטיפול עם אתילן בלבד בעוד שטיפול באוקסין בלבד אינו משפיע על ביטוי (איור 9). ממצאים אלו מתאימים למעורבות של LX בתהליך הניתוק כיוון שתבנית ביטוי זו תואמת את המודל המוסכם היום אשר לפיו אוקסין מעכב נשירה על ידי כך שגורם לחוסר רגישות הרקמה לאות האתילן, והאחרון מזרז את תהליך הניתוק על ידי הפעלת גנים המעורבים בתהליך.

אנו מניחים כי עליה ברגישות רקמת הניתוק לאתילן גורמת לעליה בביטוי גנים שמעורבים בתהליך הנשירה, כש-LX הוא אחד מאותם גנים, אך מחקר נוסף דרוש בכדי למקם את השלב הספציפי בו הוא משתתף בתהליך. מעניין יהיה לבחון האם בצמחים בהם יש ביטוי ביתר ל-LX יש השפעה על תהליך. צמחים טרנסגניים אלו כבר קיימים בידינו ובמחקר המשכי יאופיינו.

מעורבות ריבונוקליאז בתהליך הניתוק הינו ממצא חדש, השאלה הנגזרת מכך היא באיזה מנגנון ריבונוקליאזות יכולות להיות מעורבות בתהליכי ניתוק? כיוון שהוצע בעבר תפקיד לריבונוקליאזות במנגנוני מוות מתוכנת בצמח, היפותזת המחקר שהועלתה היא שבמהלך תהליך הניתוק מתרחש תהליך מוות מתוכנת וכי לריבונוקליאזות, כדוגמת LX תפקיד בתהליך מוות זה. כלומר שקיום תהליך המוות חשוב להתקדמות תהליך הניתוק ושלריבונוקליאזות תפקיד חיוני בתהליך מוות זה.

האם מנגנוני מוות מתוכנת מעורבים בתהליך ניתוק איברים?

בניסויים קודמים במעבדה בוצעה צביעת רקמות ניתוק עם הצבען Evans blue, שצובע תאים שהממבראות שלהם איבדו את יכולת הבררנות ולכן ניתן לסווגם כתאים מתים. צביעה ספציפית לרקמת ניתוק עלים התקבלה בשלב סמוך לניתוק. מכאן נראה שאמנם ברקמת הניתוק מתרחשת תמותת תאים.

בעבודה הנוכחית מצאנו כי הגן *Le-pirin*, אשר שימש לנו כסמן להתרחשות תהליך מוות מתוכנת, מתבטא ברקמות ניתוק פרחים לקראת נשירתם (איור 10). החלבון PIRIN, שרצף חומצות האמינו שלו שמור בין אורגניזמים שונים כולל פרוקריוטים, יונקים וצמחים, דווח לראשונה כחלבון ממקור הומאני הממוקם בגרעין ושנקשר לפקטור שעתוק ממשפחת NFI/CTF (Wendler et al., 1997). משפחה זו מעורבת ברפליקציה של גנים ויראליים ושעתוק של גנים תאיים המעורבים במגוון תהליכים ביונקים כגון תהליכים הורמונאליים והתפתחותיים כדוגמת גדילת תאים לא מבוקרת (Gronostajski, 2000). בהמשך הוא תואר כמרכיב בקומפלקס חלבוני, ביחד עם החלבון Bcl-3 שהוא oncoprotein המבקר תהליכי התרבות תאים ואפופטוזיס (Dechend et al., 1999). מכאן הוצע כי PIRIN משתתף בתהליכי אפופטוזיס ביונקים. בצמחים נמצא שביטוי הגן *Le-pirin* מושרה בתגובה לטיפול בחומרים משרי מוות מתוכנת בתרבית תאים של עגבנייה (Orzaez et al., 2001). בארבידופסיס נמצא כי החלבון AtPirin1 עובר אינטראקציה עם תת היחידה  $\alpha$  של חלבון G (GPA1) ומבקר תהליכים של נביטת זרעים והתפתחות זרעים מוקדמת (Lapik and Kaufman, 2003), אשר מאופיינים כתהליכי מוות מתוכנת.

תבנית ביטוי *Le-pirin* אושרה על ידי אנליזת ה-Microarray שבוצעה מאוחר יותר (Meir et al, personal communication). באנליזה זו, כמו גם בתוצאות המובאות בעבודה זו, נמצאה עליה מהירה בביטוי *Le-pirin* זמן קצר לאחר השראת הנשירה, ועליה נוספת בשלב המאוחר יותר של התהליך. ממצאים אלו יכולים להצביע על תפקיד החלבון המקודד כפקטור שעתוק, שמשותף הן בבקרת השלבים המוקדמים של תהליך הניתוק, והן בבקרת התהליכים המאוחרים יותר של תהליך הניתוק. ביטוי *Le-pirin* אינו ספציפי לרקמת הניתוק ונראה כי הגן מתבטא, אם כי ברמה נמוכה, ברקמות אחרות של העוקץ. יתכן שברקמות אלו הוא מתבטא בתאים המתמיינים לתאי העצה בהם מתקיימים תהליכי מוות מתוכנת.

יש לציין כי רקמת הניתוק מאופיינת במספר מצומצם ובודד של שכבות תאים, ואילו חיתוך הרקמה הידני שמבוצע לאיסוף הרקמה לאנליזות השונות הינו גס יחסית וגורם לכך שהרקמה שאנו מכנים רקמת ניתוק מכילה בעצם כמות גדולה של תאים נוספים הנמצאים בסמוך לרקמת הניתוק ואינם מהווים חלק ממנה. מגבלה טכנית זו עלולה ליצור מצב של מיהול הרקמה הנבדקת (רקמת הניתוק) והמעטה מהכמות היחסית של תעתיקי הגן *Le-pirin* ברקמת הניתוק. עוד יש להוסיף כי רקמת הניתוק (לעומת רקמת הגבעול) הינה בעלת פעילות גבוהה של ביטוי גנים (כיוון שזו רקמה פעילה ביותר), על-כן סביר להניח כי ריכוז דומה של RNA מייצג תאים רבים יותר של גבעול מאשר תאים של רקמת ניתוק, נתון זה גם הוא עלול להמעיט מכמותו היחסית של *Le-pirin* בתאים של רקמת הניתוק.

היווצרות צירוני חמצן ריאקטיביים המכונים ROS מהווה מרכיב חשוב בהתרחשות תהליכי מוות מתוכנת בצמחים (Van Breusegem and Dat, 2006). ממחקרים שונים שנערכו בשנים האחרונות נראה שיש להם תפקיד הן בתהליך העברת האות המעורב בבקרת תהליכי מוות מתוכנת והן בשלב של התרחשות המוות באמצעות

הריאקטיביות שלהן. בניסויים אותם ביצענו, אבחנו עליה בנוכחות ROS ברקמות ניתוק בשלב מאוחר וכנראה למשך זמן יחסית קצר בתהליך ניתוק עלים ופרחים (איורים 11 ו-12). העובדה שלא בכל הצביעות הצלחנו לראות רמה גבוהה של הצטברות ROS, כנראה נובעת מחלון זמן קצר בו הם קיימים במהלך תהליך הניתוק. מחקר קודם מציע כי ל-ROS תפקיד בהוצאה לפועל של מוות תאים מתוכנת שמתרחש בשכבת האלורון (aleurone) של זרעי שעורה (Fath et al., 2001). המודל שהוצג הוא שג'יברלין מעודד תהליך מוות מתוכנת ברקמה זו, ובמהלך המוות מתרחשת פעילות קטאבולית נמרצת, המאופיינת בשחרור מולקולות ריאקטיביות (כדוגמת  $H_2O_2$ ). בשלב הראשוני של התהליך עדיין פעילים אנזימים, כגון קטלאז ופרוקסידאז, שתורמים לנטרול המולקולות הריאקטיביות הללו והתאים מצליחים לשרוד את העקה. בשלב מתקדם של תהליך המוות מתקבלת ירידה בפעילות האנזימים הללו ורמת ה-ROS עולה מאוד בתאים, דבר שגורם לפראוקסידציה של הממברנות ובהמשך להרס שלהן (Fath et al., 2001). במחקר אחר שנערך בטבק ובו בחנו ביטוי פרוקסידאזות ברקמות ניתוק של פרחים לאחר השריית ניתוק באמצעות טיפול באתילן, הראו עליה בפעילות פרוקסידאזות שמגיעה לשיא לאחר 4 שעות מהתחלת טיפול האתילן ולאחריה מתרחשת נפילה דרמטית ברמת פעילותן. ירידה זו התרחשה במקביל להיחלשות דופן התאים שמביאה לנשירה (Henry et al., 1974). משילוב הנתונים שמוצגים לעיל אפשר להעלות את האפשרות כי ירידה בפעילות אנזימים מטבולים של ROS (כמו פרוקסידאזות) ברקמות ניתוק ובשלב מבוקר גנטית, היא זו שגורמת להצטברות המהירה של ROS. העלייה המהירה בהצטברות ROS מביאה להוצאה לפועל של תהליך הניתוק שמלווה במוות של תאים. בנוסף לנוכחות ROS ברקמות ניתוק ניתן לזהותם גם ברקמות ההובלה, כפי שתואר (Srivastava et al., 2007).

גישה נוספת לבחינת ההיפותזה שנבדקה במסגרת עבודה זו הייתה לבחון את השפעת נוכחות גן למעכב אפופטוטי בצמחים טרנסגניים על הקינטיקה של תהליך ניתוק עלים ופרחים. הנחתנו הייתה כי במידה ותהליך מוות מתוכנת דמוי אפופטוזיס מתקיים ברקמות ניתוק, אזי נוכחות תוצר גן שמעכב את תהליך המוות, יעכב גם את תהליך הניתוק. במחקרים קודמים שנועדו לבחון השפעת חלבונים שידועים כמעורבים בתהליכי אפופטוזיס בבעלי-חיים על תהליכים בצמחים, יצרו צמחים טרנסגניים בהם בוטאו חלבוני בקרה שמשרים או מעכבים את תהליך האפופטוזיס במערכות לא צמחיות. נמצא כי בצמחים טרנסגניים אלו מתקבלת השפעה דומה של אותם החלבונים על תהליך המוות בצמחים (Dickman et al., 2001; Lincoln et al., 2002; del Pozo and Lam, 2003; Watanabe and Lam, 2006). לדוגמא מחקר שבחן צמחי טבק טרנסגניים המבטאים את החלבונים האנטיאפופטוטיים Bcl-2 ו-Bcl-x1 מהאדם, CED-9 מנמטודה ו-Op-IAP מבקלוורוס, מצא כי הצמחים הציגו עמידות כנגד מספר פתוגנים נקרוטרופיים (שמתפתחים על רקמה מתה). כלומר בצמחים הללו התקבל עיכוב בתהליכי מוות מתוכנת ועיכוב זה מנע את התבססות הפתוגנים (Dickman et al., 2001). בדומה בצמחים טרנסגניים בהם ביטאו את הגן  $p35$  אשר מוכר כמעכב טווח רחב של קספאזות, הראו שצמחים אלו עמידים בפני רעלן משרה מוות מתוכנת ובפני הדבקה על-ידי פתוגנים משרי מוות (Lincoln et al., 2002). בנוסף בצמחים טרנסגניים שהוכנו ברקע של קו עמיד בפני וירוס ה-TMV, התקבל עיכוב בתגובת הרגישות ביתר, שמתרחשת כתהליך מוות מתוכנת וחיונית לעמידות הצמח, ועל כן הצמחים הפכו להיות רגישים לוורוס, אשר עקב כך הצליח להתפשט בצמח (del Pozo and Lam, 2003). ממצאים אלו תומכים בכך שקיימות נקודות משותפות במאורעות המתרחשים בתהליך המוות המתוכנת בצמחים ותהליך האפופטוזיס במערכות אחרות. אולם ברוב המקרים בעת

ביצוע אנליזות ביואינפורמטיות לא נמצאו חלבונים צמחיים בעלי דמיון מבני מובהק לחלבוני בקרה המשתתפים בתהליכים אפופטוטיים במערכות אנימאליות (Watanabe and Lam, 2006).

כיוון שההיפותזה שהועלתה מציעה שבמהלך תהליך הניתוק מתרחש מוות מתוכנת, הדרוש להצלחת ביצוע הנשירה, מעניין היה לבחון האם תהליכי ניתוק עלים ופרחים מושפעים בצמחי עגבנייה שמבטאים גן למעכב אפופטוטי. הצמחים אותם בחנו ביטאו את החלבון האנטי-אפופטוטי SfiAP אשר נמצא כמעכב באופן ספציפי את החלבון caspase-9 בתאים הומאניים (Huang et al., 2000). בצמחי העגבנייה הטרנסגנים שביטאו את הגן האנטי-אפופטוטי נמדדה דחייה בתהליכי ניתוק עלים ופרחים בהשוואה לצמחי זן הבר (איורים 13-16). ממצאים אלו תומכים בהיפותזה לגבי מעורבות תהליך מוות מתוכנת בתהליכי הניתוק ומרמז על כך שקיימים אלמנטים בעלי דמיון בין תהליך הניתוק בצמחי עגבנייה לבין תהליכי אפופטוזיס. בעת ביצוע הניסוי נראה היה שהעיכוב בנשירה בולט יותר בשלבים הסמוכים להשראת ניתוק וככל שמתרחקים מאותו מועד הפער בין הצמחים הטרנסגנים לבין צמחי זן הבר מצטמצם. סביר להניח כי הדבר נובע מכך שהעיכוב של הניתוק אינו מלא ולכן ככל שעובר הזמן הנשירה מתרחשת בכל אופן. במחקר המשך מעניין יהיה לבחון את תהליך הניתוק בצמחים טרנסגנים בהם יש ביטוי של הגן  $p35$  אשר מוכר כמעכב טווח רחב יותר של קספאזות, ועל כן ייתכן כי צמחים אלו (אשר נמצאים ברשותנו) יציגו פנוטיפ חזק יותר של עיכוב בניתוק. בנוסף לכך כדאי יהיה לבצע ניסויים על מנת לנסות ולזהות פעילות דמוית קספאזות ברקמות ניתוק לאחר השראתו.

### מעורבות הריבונוקליאז LX בהיווצרות נקרוזות ותמותת תאים בתנאי הרעבה לזרחן

ההשערה לגבי מעורבותו של LX בתהליך מיחזור זרחן בתנאי מחסור לאלמנט זה, מתבססת על התצפיות הקודמות שבהן נמצאה השראה ניכרת של ביטוי LX בתנאי מחסור לזרחן. הנחנו שגידול בתנאים של זמינות זרחן נמוכה יגרמו לכך שהתפתחותו של הצמח תהיה תלויה במידה רבה בקיום מערכת פעילה אשר תאפשר מיחזור זרחן ממקור פנימי כגון חומצות נוקלאיות. גידול בתנאי הרעבה לזרחן יכול לחשוף הבדלים בהתפתחות של צמחי זן הבר והצמחים הטרנסגנים, הבדלים שנובעים מהעיכוב בביטוי LX ועקב כך גורמים למגבלה ביכולת לפרק מולקולות RNA לצורך מיחזור.

התופעה של היווצרות נקודות נקרוטיות על עלי עגבנייה בתנאי גידול הידרופוניים שכללו הרעבה למקור זרחן (איור 17), מוזכרת בספרות באופן נדיר יחסית כסימן למחסור חריף בזרחן. ציון של התופעה הנ"ל מצאנו בשתי עבודות בלבד בהם גידלו צמחים בתנאי גידול הידרופוניים עם הרעבה חמורה לזרחן, בדומה לתנאי הגידול שאנו ביצענו. עבודות אלה כללו את מיני הצמחים סויה, עגבנייה (מזן MoneyMaker), חומוס, חיטה ותורמוס. בשתי העבודות המחברים מתארים בקצרה ובאופן מילולי תופעה של הופעת נקודות נקרוטיות בעלים מבלי לפרט על השוני בין המינים השונים (Neumann and Romheld, 1999; Chiera et al., 2002). העובדה שתופעה דומה דווחה במינים שונים תומכת באפשרות שזו תופעה כללית. על פי הידוע לנו תופעת היווצרות הנקרוזות אינה מוכרת מגידולים חקלאיים או מניסויים בתנאי גידול בשדה, ואפילו לא מניסויי גידול בתנאים הידרופוניים בהם תמיסת ההרעבה לזרחן מכילה ריכוז נמוך מאוד של זרחן. יתכן והתפתחות הנקרוזות מתרחשת רק בתנאי גידול

קיצוניים בהם אין כל מקור זרחן ואינה מתרחשת במקרים בהם רמתו נמוכה ביותר בסביבת הגידול. בניסויים שערכנו תופעת התפתחות הנקרוזות ומות התאים חזרה על עצמה פעמים רבות ובקינטיקה דומה.

הדחייה הנכרת בהיווצרות הנקרוזות בקווים הטרנסגנים לעומת זן הבר, והמתאם החיובי בין רמת LX לבין עוצמת התפתחות הנקרוזות (איור 18), תומכת באפשרות שהריבונוקליאז LX מעורב בהתרחשות תהליך של מות תאים והתפתחות הנקרוזות בתגובה לתנאי הרעבה לזרחן. במחקר המשך מעניין יהיה לבחון האם צמחים שמבטאים ביתר את הגן ל- LX, ואשר קיימים כבר במעבדה, יציגו פנוטיפ של האצה בהיווצרות מות תאים בעת חשיפה להרעבה לזרחן לעומת צמחים מזן הבר.

עליה בפעילות פרוטאזות ונוקליאזות מאפיינת מגוון של תהליכי מוות בצמחים (Rogers, 2005). בעבודה זו זיהינו עליה בפעילות נוקליאז בתנאי מחסור לזרחן, ונראה כי נוקליאז זה זהה לנוקליאז אשר פעילותו עלתה ברקמות ניתוק פרחים בשלב סמוך לנשירה (איור 22). בניסוי נוסף מקביל שנערך במעבדה זוהתה פעילות פרוטאז שעלתה ברקמת עלי עגבנייה בעת גידול בתנאי מחסור לזרחן (Sonego et al., unpublished). העליה בפעילות נוקליאז ופרוטאז במהלך החשיפה למחסור חמור בזרחן, תומכת בהנחה שהתפתחות הנקרוזות בעלים מתרחשת בתהליך שהוא מוות מתוכנת. שתי התצפיות מהמחקר בצמחים המעוכבים בביטוי LX, הן לגבי האטת תהליך מות הרקמה (האטה בהיווצרות נקרוזות) והן לגבי דחייה בנשירה, מתאימות למעורבות המוצעת של LX בתהליכי מוות מתוכנת שאנו משערים שמתרחשים גם בעת עקת זרחן וגם בעת הנשירה.

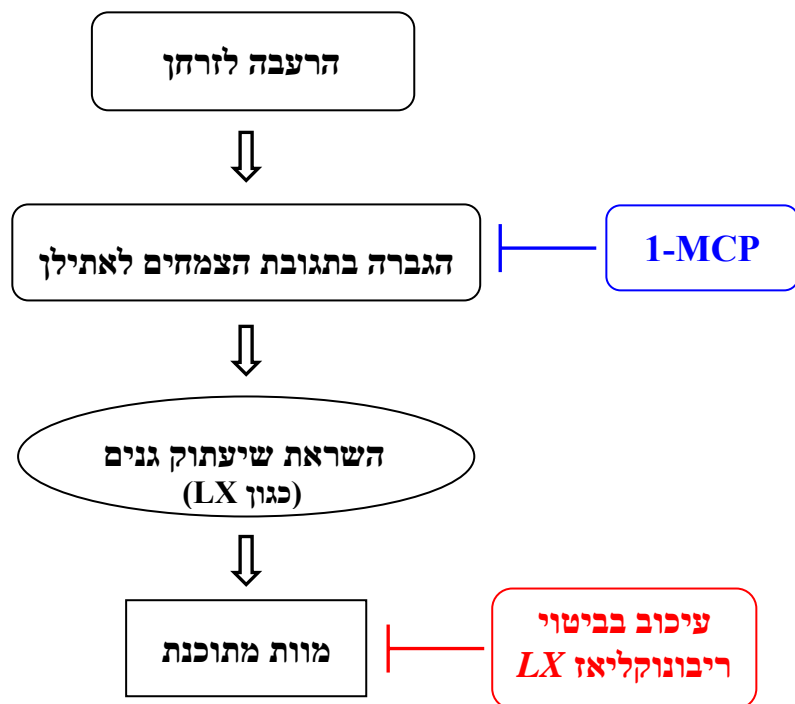
תוצאות מדידות רמת פליטת אתילן מצמחי זן הבר שגדלו ללא זרחן, הראו הגברה בפליטת האתילן (איור 23). למרות שעליה זו היא מובהקת, היא לא גדולה מאוד. יתכן שההבדל ברמת האתילן הנמדד לא היה גדול כיוון שלצורך המדידה נלקחו צמחים שלמים (ולא עלים בלבד) על מנת להימנע מפגיעת הרקמה. כלומר במדידה נכללו רקמות שאולי בהן כלל אין יצור אתילן כגון גבעולים או שורשים ולכן יש צורך לחזור על ניסויים אלו תוך שימוש רק בעלים השלמים של הצמחים לצורך המדידה. בנוסף יתכן שבתוך הרקמה העלייה הייתה יותר משמעותית אך לא התבטאה ברמת האתילן ששוחרר לאווירה שממנה נלקחו הדוגמאות לאנליזה. מחקרים קודמים תומכים בכך שבתנאי מחסור לזרחן מתקבלת הגברה הן בייצור האתילן והן ברגישות הרקמה לאתילן (He et al., 1992; Borch et al., 1999). כאשר עיכבנו את חישת האתילן בצמחים שגדלו בתנאי מחסור לזרחן, על ידי שימוש במעכב האתילן 1-MCP, עוכב מות התאים ויצירת הנקרוזות נדחתה בצמחי זן הבר (איורים 24 ו-25). ממצאים אלו תומכים במעורבותו של הורמון האתילן בתהליך התפתחות מות התאים שמתרחש בעת חשיפת צמחי עגבנייה להרעבה לזרחן. רמת החלבון LX הייתה נמוכה ביותר בעלים מהקווים השונים שטופלו ב-1-MCP, תוצאה שתומכת בבקרת ביטוי LX על ידי אתילן ומחזקת את תפקידו במות התאים (unpublished data).

עצירה של גדילת עלים מהווה סימן מחסור שכיח בצמחים שנחשפים לתנאי עקת זרחן (Chiera et al., 2002; Kavanova et al., 2006). מעניין יהיה להתייחס לתופעה זו בניסויים עתידיים ולבחון את ההשפעה האפשרית של עיכוב בביטוי LX על בקרת גדילת העלה בעת החשיפה לתנאי מחסור בזרחן. למרות שלא בוצעו מדידות מדויקות לכימות גודל העלים, ניתן להתרשם כי העלים הבוגרים של צמחי זן הבר שגדלו ללא זרחן הם קטנים יותר מהעלים של הצמחים הטרנסגנים שגדלו באותם תנאים (איור 24 B). זאת לעומת צמחים שגדלו עם זרחן ובהם לא נראה הבדל בין גודל העלים של הצמחים הטרנסגנים וצמחי זן הבר (איור 24 A). תמיכה לכך מצאנו במדידה של כמות היונים הכללית בעלים (לאחר אוטוקלאב של הרקמה) לפיה עלי זן הבר הכילו פחות יונים לעומת הצמחים

הטרנסגנים (unpublished data). כלומר ייתכן כי בתנאי מחסור לזרחן, עלי המקור (עלים בוגרים) של הצמחים הטרנסגנים אינם מגיבים בעיכוב גדילה כפי שמגיבים עלי המקור בצמחי זן הבר. כיוון שדווח שקיימים יחסי גומלין בין משק הזרחן ומיחזורו בעלים לבין קצב הגדילה (Chiera et al., 2002; Kavanova et al., 2006), יתכן שרמה נמוכה של LX, במידה וגורמת לעיכוב במיחזור הזרחן, מובילה לביטול האפקט של עיכוב גדילת העלים בצמחים הטרנסגניים הגדלים בתנאי הרעבה לזרחן.

מודל המציג התרחשות אפשרית של המאורעות המובילים להתפתחות הנקרוזות בעת הרעבה לזרחן ומעורבותו האפשרית של הריבונוקליאז LX מוצג באיור 27. לפי מודל זה חשיפה של צמחי עגבנייה לתנאי מחסור קיצוניים לזרחן גורמת להגברה בייצורו האנדוגני של אתילן ולהגברה בתגובה לאתילן. הורמון זה גורם בהמשך להשראת ביטוי גנים ועליה בפעילות חלבונים בעלי תפקיד בתהליכי מוות בצמח (כמו LX). עיכוב בחישה לאתילן על ידי שימוש במעכב 1-MCP מביא לעיכוב במוות המתוכנת.

**איור 27:** מודל סכמתי לתיאור תהליך מוות מתוכנת בעלים כתוצאה מעקת זרחן. חשיפת צמחים לגידול הידרופוני בתמיסה ללא תוספת זרחן, גורמת להגברה בייצור וברגישות הרקמה לאתילן. אתילן גורם להשראת שעתוק גנים ועליה בפעילות חלבונים בעלי תפקיד בתהליכי מוות מתוכנת בצמח (כגון נוקליאז ו-LX) אשר מביאים לתמותת התאים. אתילן מהווה גורם משמעותי בהתקדמות התהליך כיוון שטיפול במעכב חישת האתילן-1-MCP גורם לעיכוב בתהליך המוות. LX מעורב בדרך כלשהי בתהליך המוות וכשהוא מעוכב התהליך נדחה.



תנאי ההרעבה לזרחן אותם יישמנו לאורך הניסויים הם תנאים קיצוניים במיוחד לצמחי העגבנייה. עובדה זו גרמה לתגובה מערכתית מהירה וקיצונית בצמחים המטופלים. ייתכן כי תנאי הרעבה מתונים יותר יאפשרו לאבחן תהליכים נוספים בהם מעורב LX.

אחת השאלות העולות בהקשר לפעילות הריבונוקליאז היא מידורו בתא שכן ניתן לשער שהוא ממוקם במבנים ייעודיים על מנת למנוע פגיעה ב-RNA החיוני לתפקוד התא. הוצע כי LX מעורב בתהליכי מוות מתוכנת על ידי כך שמהווה מרכיב במבנים דמויי גופיפי ה-ricinosomes (Lehmann et al., 2001). ה-ricinosomes מוכרים כגופיפים המשתנצים מה-ER כאשר התא מקבל אות להפעלת תהליך מוות מתוכנת בעת נביטה והזדקנות. הם מכילים אנזימים פרוטאוליטיים ובזמן שמתרחש הרס של ממברנות התא יש שחרור של אותם אנזימים אשר

מובילים לפירוק הסופי של מרכיבי התאים (Gietl and Schmid, 2001). ההיפותזה לפיה LX משתתף במבנים דמויי ricinosomes מתבססת על מיקומו בתא בממבראנת ה-ER, ועל הדמיון ברצף HDEF בקצה הקרבוקסילי שלו, שזוהה לזה של פרוטאז אשר מצוי בגופיפים אלו (Lehmann et al., 2001).

ממצאי עבודה זו תומכים בכך שריבונוקליאז LX מעורב בתהליכי מוות מתוכנת בצמחי עגבנייה שכוללים הזדקנות עלים, נשירת פרחים והתפתחות נקרוזות בתנאים של גידול במחסור חמור לזרחן, וזאת כיוון שעיכוב ביטוי בצמחים הטרנסגנים גרם לדחייה בתהליכים הללו בצמחים. אנו מביאים עדויות שתומכות במעורבות תהליכי מוות מתוכנת ברקמות ניתוק. עדיין דרוש מחקר לצורך זיהוי סמנים נוספים שיעידו על התרחשות מוות מתוכנת ברקמות ניתוק ובתנאי מחסור לזרחן, וכן דרוש לימוד נוסף להבנת תפקידו המדויק של LX בתהליכים אלו.

## 5. רשימת ספרות

- Abel S, Blume B, Glund K** (1990) Evidence for RNA-Oligonucleotides in Plant Vacuoles Isolated from Cultured Tomato Cells. *Plant Physiol* **94**: 1163-1171
- Abel S, Ticconi CA, Delatorre CA** (2002) Phosphate sensing in higher plants. *Physiol Plant* **115**: 1-8
- Aoyagi S, Sugiyama M, Fukuda H** (1998) BEN1 and ZEN1 cDNAs encoding S1-type DNases that are associated with programmed cell death in plants. *FEBS Lett* **429**: 134-138
- Bae H, Kim MS, Sicher RC, Bae HJ, Bailey BA** (2006) 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* **141**: 1056-1067
- Bariola PA, Green PJ** (1997) Plant ribonuclease. *In* JF Riodan, GD Alessio, eds, *Ribonuclease: Structure and Function* Academic Press, Orlando, pp 163-190
- Bariola PA, Howard CJ, Taylor CB, Verburg MT, Jaglan VD, Green PJ** (1994) The *Arabidopsis* ribonuclease gene RNS1 is tightly controlled in response to phosphate limitation. *Plant J* **6**: 673-685
- Bariola PA, MacIntosh GC, Green PJ** (1999) Regulation of S-like ribonuclease levels in *Arabidopsis*. Antisense inhibition of RNS1 or RNS2 elevates anthocyanin accumulation. *Plant Physiol* **119**: 331-342
- Blankenship SM, Dole JM** (2003) 1-methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biology and Technology* **28**: 1-25
- Borch K, Bouma TJ, Lynch JP, Brown KM** (1999) Ethylene: a regulator of root architectural responses to soil phosphorus availability. *Plant Cell and Environment* **22**: 425-431
- Bosse D, Kock M** (1998) Influence of phosphate starvation on phosphohydrolases during development of tomato seedlings. *Plant Cell and Environment* **21**: 325-332
- Buchanan-Wollaston V, Earl S, Harrison E, Mathas E, Navabpour S, Page T, Pink D** (2003) The molecular analysis of leaf senescence - a genomics approach. *Plant Biotechnol J* **1**: 3-22
- Chiera J, Thomas J, Rufty T** (2002) Leaf initiation and development in soybean under phosphorus stress. *J Exp Bot* **53**: 473-481
- Chiou TJ, Aung K, Lin SI, Wu CC, Chiang SF, Su CL** (2006) Regulation of phosphate homeostasis by MicroRNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 412-421

- Danon A, Rotari VI, Gordon A, Mailhac N, Gallois P** (2004) Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in Arabidopsis, which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and Defender against Apoptotic Death. *J Biol Chem* **279**: 779-787
- Dechend R, Hirano F, Lehmann K, Heissmeyer V, Ansieau S, Wulczyn FG, Scheidereit C, Leutz A** (1999) The Bcl-3 oncoprotein acts as a bridging factor between NF-kappaB/Rel and nuclear co-regulators. *Oncogene* **18**: 3316-3323
- del Pozo O, Lam E** (2003) Expression of the baculovirus p35 protein in tobacco affects cell death progression and compromises N gene-mediated disease resistance response to Tobacco mosaic virus. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 485-494
- Deshpande RA, Shankar V** (2002) Ribonucleases from T2 family. *Crit Rev Microbiol* **28**: 79-122
- Dickman MB, Park YK, Oltersdorf T, Li W, Clemente T, French R** (2001) Abrogation of disease development in plants expressing animal antiapoptotic genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6957-6962
- Dodds PN, Clarke AE, Newbiggin E** (1996) Molecular characterisation of an S-like RNase of *Nicotiana glauca* that is induced by phosphate starvation. *Plant Mol Biol* **31**: 227-238
- Durrant WE, Dong X** (2004) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* **42**: 185-209
- Fath A, Bethke P, Lonsdale J, Meza-Romero R, Jones R** (2000) Programmed cell death in cereal aleurone. *Plant Mol Biol* **44**: 255-266
- Fath A, Bethke PC, Jones RL** (2001) Enzymes that scavenge reactive oxygen species are down-regulated prior to gibberellic acid-induced programmed cell death in barley aleurone. *Plant Physiol* **126**: 156-166
- Fukuda H** (2000) Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Mol Biol* **44**: 245-253
- Galiana E, Bonnet P, Conrod S, Keller H, Panabieres F, Ponchet M, Poupet A, Ricci P** (1997) RNase activity prevents the growth of a fungal pathogen in tobacco leaves and increases upon induction of systemic acquired resistance with elicitor. *Plant Physiol* **115**: 1557-1567
- Gepstein S, Sabeji G, Carp MJ, Hajouj T, Nesher MF, Yariv I, Dor C, Bassani M** (2003) Large-scale identification of leaf senescence-associated genes. *Plant J* **36**: 629-642
- Gietl C, Schmid M** (2001) Ricinosomes: an organelle for developmentally regulated programmed cell death in senescing plant tissues. *Naturwissenschaften* **88**: 49-58
- Gonzalez-Bosch C, del Campillo E, Bennett AB** (1997) Immunodetection and characterization of tomato endo-beta-1,4-glucanase Cell protein in flower abscission zones. *Plant Physiol* **114**: 1541-1546
- Gonzalez-Carranza ZH, Whitelaw CA, Swarup R, Roberts JA** (2002) Temporal and spatial expression of a polygalacturonase during leaf and flower abscission in oilseed rape and Arabidopsis. *Plant Physiol* **128**: 534-543
- Greenberg JT, Yao N** (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol* **6**: 201-211
- Gronostajski RM** (2000) Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. *Gene* **249**: 31-45
- Guo Y, Gan S** (2005) Leaf senescence: signals, execution, and regulation. *Curr Top Dev Biol* **71**: 83-112
- He CJ, Morgan PW, Drew MC** (1992) Enhanced Sensitivity to Ethylene in Nitrogen- or Phosphate-Starved Roots of *Zea mays* L. during Aerenchyma Formation. *Plant Physiol* **98**: 137-142



- He Y, Gan S** (2002) A gene encoding an acyl hydrolase is involved in leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 805-815
- Henry EW, Valdovin.Jg, Jensen TE** (1974) Peroxidases in Tobacco Abcission Zone Tissue .2. Time Course Studies of Peroxidase-Activity during Ethylene-Induced Abcission. *Plant Physiol* **54**: 192-196
- Hensel LL, Grbic V, Baumgarten DA, Bleecker AB** (1993) Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **5**: 553-564
- Hoerberichts FA, Woltering EJ** (2003) Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *Bioessays* **25**: 47-57
- Hooker TS, Lam P, Zheng H, Kunst L** (2007) A core subunit of the RNA-processing/degrading exosome specifically influences cuticular wax biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 904-913
- Huang Q, Deveraux QL, Maeda S, Salvesen GS, Stennicke HR, Hammock BD, Reed JC** (2000) 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* **97**: 1427-1432
- Huang S, Lee HS, Karunanandaa B, Kao TH** (1994) Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *Plant Cell* **6**: 1021-1028
- Hugot K, Ponchet M, Marais A, Ricci P, Galiana E** (2002) A tobacco S-like RNase inhibits hyphal elongation of plant pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* **15**: 243-250
- Irie M** (1999) Structure-function relationships of acid ribonucleases: lysosomal, vacuolar, and periplasmic enzymes. *Pharmacol Ther* **81**: 77-89
- Ito J, Fukuda H** (2002) ZEN1 is a key enzyme in the degradation of nuclear DNA during programmed cell death of tracheary elements. *Plant Cell* **14**: 3201-3211
- Jarvis MC, Briggs SPH, Knox JP** (2003) Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant, Cell and Environment* **26**: 977-989
- Kaletta K, Kunze I, Kunze G, Kock M** (1998) The peptide HDEF as a new retention signal is necessary and sufficient to direct proteins to the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* **434**: 377-381
- Kavanova M, Lattanzi FA, Grimoldi AA, Schnyder H** (2006) Phosphorus deficiency decreases cell division and elongation in grass leaves. *Plant Physiol* **141**: 766-775
- Khvorova A, Kwak YG, Tamkun M, Majerfeld I, Yarus M** (1999) RNAs that bind and change the permeability of phospholipid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 10649-10654
- Kock M, Gross N, Stenzel I, Hause G** (2004) Phloem-specific expression of the wound-inducible ribonuclease LE from tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus). *Planta* **219**: 233-242
- Kock M, Stenzel I, Zimmer A** (2006) Tissue-specific expression of tomato Ribonuclease LX during phosphate starvation-induced root growth. *J Exp Bot* **57**: 3717-3726
- Krzyszowska M, Konopka-Postupolska D, Sobczak M, Macioszek V, Ellis BE, Hennig J** (2007) Infection of tobacco with different *Pseudomonas syringae* pathovars leads to distinct morphotypes of programmed cell death. *Plant J* **50**: 253-264
- Kurata N, Kariu T, Kawano S, Kimura M** (2002) Molecular cloning of cDNAs encoding ribonuclease-related proteins in *Nicotiana glutinosa* leaves, as induced in response to wounding or to TMV-infection. *Biosci Biotechnol Biochem* **66**: 391-397
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

- Lapik YR, Kaufman LS** (2003) The Arabidopsis cupin domain protein AtPirin1 interacts with the G protein alpha-subunit GPA1 and regulates seed germination and early seedling development. *Plant Cell* **15**: 1578-1590
- LeBrasseur ND, MacIntosh GC, Perez-Amador MA, Saitoh M, Green PJ** (2002) Local and systemic wound-induction of RNase and nuclease activities in Arabidopsis: RNS1 as a marker for a JA-independent systemic signaling pathway. *Plant J* **29**: 393-403
- Lee HS, Huang S, Kao T** (1994) S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature* **367**: 560-563
- Lehmann K, Hause B, Altmann D, Kock M** (2001) Tomato ribonuclease LX with the functional endoplasmic reticulum retention motif HDEF is expressed during programmed cell death processes, including xylem differentiation, germination, and senescence. *Plant Physiol* **127**: 436-449
- Lers A** (2007) Senescence processes in plants. In S Gan, eds, *Environmental regulation of leaf senescence*. Blackwell, Oxford, pp 108-144
- Lers A, Khalchitski A, Lomaniec E, Burd S, Green PJ** (1998) Senescence-induced RNases in tomato. *Plant Mol Biol* **36**: 439-449
- Lers A, Lomaniec E, Burd S, Khalchitski A** (2001) The characterization of LeNUC1, a nuclease associated with leaf senescence of tomato. *Physiol Plant* **112**: 176-182
- Lers A, Sonogo L, Green PJ, Burd S** (2006) Suppression of LX ribonuclease in tomato results in a delay of leaf senescence and abscission. *Plant Physiol* **142**: 710-721
- Liang L, Lai Z, Ma W, Zhang Y, Xue Y** (2002) AhSL28, a senescence- and phosphate starvation-induced S-like RNase gene in *Antirrhinum*. *Biochim Biophys Acta* **1579**: 64-71
- Lim PO, Kim HJ, Nam HG** (2007) Leaf senescence. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 115-136
- Lim PO, Nam HG** (2005) The molecular and genetic control of leaf senescence and longevity in Arabidopsis. *Curr Top Dev Biol* **67**: 49-83
- Lincoln JE, Richael C, Overduin B, Smith K, Bostock R, Gilchrist DG** (2002) Expression of the antiapoptotic baculovirus p35 gene in tomato blocks programmed cell death and provides broad-spectrum resistance to disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15217-15221
- Loffler A, Abel S, Jost W, Beintema JJ, Glund K** (1992) Phosphate-regulated induction of intracellular ribonucleases in cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. *Plant Physiol* **98**: 1472-1478
- Lomaniec E, Aharon Z, Aharoni N, Lers A** (2003) Effect of the ethylene action inhibitor 1-methylcyclopropene on parsley leaf senescence and ethylene biosynthesis. *Postharvest Biol. Technol* **30**: 67-74
- MacIntosh GC, Bariola PA, Newbiggin E, Green PJ** (2001) Characterization of Rny1, the *Saccharomyces cerevisiae* member of the T2 RNase family of RNases: unexpected functions for ancient enzymes? *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 1018-1023
- Mimura T** (1995) Homeostasis and transport of inorganic phosphate in plants. *Plant and Cell Physiol* **36**: 1-7
- Mittler R, Lam E** (1995) Identification, characterization, and purification of a tobacco endonuclease activity induced upon hypersensitive response cell death. *Plant Cell* **7**: 1951-1962
- Mittler R, Lam E** (1997) Characterization of nuclease activities and DNA fragmentation induced upon hypersensitive response cell death and mechanical stress. *Plant Mol Biol* **34**: 209-221
- Moseley JL, Chang CW, Grossman AR** (2006) Genome-based approaches to understanding phosphorus deprivation responses and PSR1 control in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* **5**: 26-44

- Neumann G, Romheld V** (1999) Root excretion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. *Plant and Soil* **211**: 121-130
- Nurnberger T, Abel S, Jost W, Glund K** (1990) Induction of an Extracellular Ribonuclease in Cultured Tomato Cells upon Phosphate Starvation. *Plant Physiol* **92**: 970-976
- Okabe T, Yoshimoto I, Hitoshi M, Ogawa T, Ohyama T** (2005) An S-like ribonuclease gene is used to generate a trap-leaf enzyme in the carnivorous plant *Drosera adelae*. *FEBS Lett* **579**: 5729-5733
- Orzaez D, de Jong AJ, Woltering EJ** (2001) A tomato homologue of the human protein PIRIN is induced during programmed cell death. *Plant Mol Biol* **46**: 459-468
- Osborne DJ** (1989) Abscission. *Critical Reviews in Plant Sciences* **8**: 103-129
- Pic E, de La Serve BT, Tardieu F, Turc O** (2002) Leaf senescence induced by mild water deficit follows the same sequence of macroscopic, biochemical, and molecular events as monocarpic senescence in pea. *Plant Physiol* **128**: 236-246
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE** (1989) Determinations of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta Int J Biochem Biophys* **975**: 384-394
- Potuschak T, Vansiri A, Binder BM, Lechner E, Vierstra RD, Genschik P** (2006) The exoribonuclease XRN4 is a component of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 3047-3057
- Quirino BF, Noh YS, Himelblau E, Amasino RM** (2000) Molecular aspects of leaf senescence. *Trends Plant Sci* **5**: 278-282
- Roberts JA, Elliott KA, Gonzalez-Carranza ZH** (2002) Abscission, dehiscence, and other cell separation processes. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 131-158
- Rogers HJ** (2005) Cell death and organ development in plants. *Curr Top Dev Biol* **71**: 225-261
- Roiz L, Smirnoff P, Bar-Eli M, Schwartz B, Shoseyov O** (2006) ACTIBIND, an actin-binding fungal T2-RNase with antiangiogenic and anticarcinogenic characteristics. *Cancer* **106**: 2295-2308
- Rosenvasser S, Mayak S, Friedman H** (2006) Increase in reactive oxygen species (ROS) and in senescence-associated gene transcript (SAG) levels during dark-induced senescence of *Pelargonium* cuttings, and the effect of gibberellic acid. *Plant Science* **170**: 873-879
- Rubio V, Linhares F, Solano R, Martin AC, Iglesias J, Leyva A, Paz-Ares J** (2001) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev* **15**: 2122-2133
- Sanmartin M, Jaroszewski L, Raikhel NV, Rojo E** (2005) Caspases. Regulating death since the origin of life. *Plant Physiol* **137**: 841-847
- Sexton R, Roberts JA** (1982) Cell Biology of Abscission. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **33**: 133-162
- Smirnoff P, Roiz L, Angelkovitch B, Schwartz B, Shoseyov O** (2006) A recombinant human RNASET2 glycoprotein with antitumorigenic and antiangiogenic characteristics: expression, purification, and characterization. *Cancer* **107**: 2760-2769
- Srivastava V, Schinkel H, Witzell J, Hertzberg M, Torp M, Srivastava MK, Karpinska B, Melzer M, Wingsle G** (2007) Downregulation of high-isoelectric-point extracellular superoxide dismutase mediates alterations in the metabolism of reactive oxygen species and developmental disturbances in hybrid aspen. *Plant J* **49**: 135-148
- Sahasini AN, Sirdeshmukh R** (2006) Transfer RNA cleavages by onconase reveal unusual cleavage sites. *J Biol Chem* **281**: 12201-12209

- Taylor CB, Bariola PA, DelCardayre SB, Raines RT, Green PJ** (1993) RNS2: a senescence-associated RNase of Arabidopsis that diverged from the S-RNases before speciation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 5118-5122
- Taylor JE, Whitelaw CA** (2001) Signals in abscission. *New Phytol* **151**: 323-339
- Thomas H, Ougham HJ, Wagstaff C, Stead AD** (2003) Defining senescence and death. *J Exp Bot* **54**: 1127-1132
- Thompson JE, Froese CD, Madey E, Smith MD, Hong Y** (1998) Lipid metabolism during plant senescence. *Prog Lipid Res* **37**: 119-141
- Van Breusegem F, Dat JF** (2006) Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol* **141**: 384-390
- Van Doorn WG, Woltering EJ** (2004) Senescence and programmed cell death: substance or semantics? *J Exp Bot* **55**: 2147-2153
- Van Doorn WG, Woltering EJ** (2005) Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends Plant Sci* **10**: 117-122
- Vianello A, Zancani M, Peresson C, Petrusa E, Casolo V, Krajnakova J, Patui S, Braidot E, Macri F** (2007) Plant mitochondrial pathway leading to programmed cell death. *Physiologia Plantarum* **129**: 242-252
- Watanabe N, Lam E** (2006) Arabidopsis Bax inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic types of cell death. *Plant J* **45**: 884-894
- Weigel D, Glazebrook J** (2002) purifying DNA from arabidopsis. *In Arabidopsis A laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press, pp 168-170
- Wendler WM, Kremmer E, Forster R, Winnacker EL** (1997) Identification of pirin, a novel highly conserved nuclear protein. *J Biol Chem* **272**: 8482-8489
- Wingler A, Purdy S, MacLean JA, Pourtau N** (2006) The role of sugars in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence. *J Exp Bot* **57**: 391-399
- Woo HR, Chung KM, Park JH, Oh SA, Ahn T, Hong SH, Jang SK, Nam HG** (2001) ORE9, an F-box protein that regulates leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**: 1779-1790
- Wykoff DD, Grossman AR, Weeks DP, Usuda H, Shimogawara K** (1999) Psr1, a nuclear localized protein that regulates phosphorus metabolism in Chlamydomonas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 15336-15341
- Ye ZH, Droste DL** (1996) Isolation and characterization of cDNAs encoding xylogenesis-associated and wounding-induced ribonucleases in *Zinnia elegans*. *Plant Mol Biol* **30**: 697-709
- Yen Y, Green PJ** (1991) Identification and Properties of the Major Ribonucleases of Arabidopsis-Thaliana. *Plant Physiology* **97**: 1487-1493
- Young TE, Gallie DR** (2000) Programmed cell death during endosperm development. *Plant Mol Biol* **44**: 283-301

## **Abstract**

Ribonucleases (RNases) are RNA-degrading enzymes which involve different aspects of the RNA molecules metabolism. Members of the T2/S-like RNases group, which are conserved in their protein sequence and are distributed broadly among organisms, are degrading the RNA substrate without sequence specificity. Although they are broadly distributed and their RNA substrate is of high importance, the biological function of the T2/S-like RNases is only poorly understood. RNases from T2/S-like group were suggested to be involved in phosphate (Pi) metabolism, leaf senescence and plant programmed cell death (PCD) processes. The main goal of this work was to learn about RNases function in plants by the characterization of transgenic tomato plants, which were inhibited in the T2/S-like RNase *LX* expression, by anti-sense technology.

An earlier research revealed that tomato plants inhibited in RNase *LX* expression were delayed in leaf senescence and in leaf abscission, compared to wild type plants. This current work further established the involvement of *LX* in senescence and demonstrated that in addition to its role in leaves abscission, it is involved in flowers abscission. This finding was based on the distinct delay in flowers abscission in the transgenic plants, compared to wild type plants. The *LX* protein level found to be elevated by ethylene and depressed by prior treatment with auxin. This control pattern fits with the accepted model by which auxin inhibited and ethylene accelerated abscission. The surprising role for RNase *LX* in abscission led us to propose the hypothesis stating that a PCD process occurs during the abscission process in the abscission zone cells. Indeed we have characterized some PCD markers in the abscission zone layer, like the specific induction of the *Le-pirin* gene and the accumulation of reactive oxygen species. In an additional research approach, transgenic plants expressing animal antiapoptotic gene were characterized. These plants exhibited a delay in leaves and flowers abscission compared to wild type plants.

Enhanced *LX* expression following Pi starvation, and its proposed role in Pi metabolism, leads us to examine the transgenic plants phenotype under Pi starvation. When plants were grown under severe phosphate deficiency, necrotic lesions were formed on the leaves, which expanded until the whole leaf died. This cell death was distinctly retarded in the transgenic plants inhibited in *LX* expression compared to wild type plants. We assume that cell death process was induced by Pi starvation, and that RNase *LX* activity is involved in this process. Indeed, markers for cell death like enhanced nuclease expression and enhanced ethylene sensitivity, were found to occur in plants growing under phosphate deficiency conditions.

Our findings support a role for RNase LX in plants PCD processes, including leaf senescence, flowers abscission and necrosis development under Pi deficiency conditions. The observation that inhibition of *LX* expression results with a delay in these processes, support the hypothesis that its activity is essential for their normal progression.