

יצירה ופירוק של קרוטנואידים בעלי כותרת של  
ורדים במהלך חיי האגרטל, ואפיון השפעת טיפול  
במתיל יסמונט על תהליכים אלה

חיבור לשם קבלת תואר דוקטור לפילוסופיה

מאת  
אלון גליק

הוגש לסנט האוניברסיטה העברית  
כסלו תש"ע, דצמבר 2009

**עבודה זו נעשתה בהדרכתם של:**

**ד"ר שמעון מאיר**

המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר הקטיף  
מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני

**ופרופ' אלכסנדר ויינשטיין**

המכון למדעי הצמח וגנטיקה בחקלאות ע"ש רוברט ה. סמית,  
הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית  
האוניברסיטה העברית בירושלים

# שלמי תודות

ברצוני להודות מעומק הלב

למנחים, ד"ר שמעון מאיר ופרופ' אלכסנדר ויינשטיין, ולד"ר סוניה פילוסוף-הדס, שהדריכו וכיוונו את עבודתי במקצועיות רבה, תמכו ועזרו לאורך כל הדרך.

לחברי צוות הפרחים במחלקה לאחסון, שושנה סלים, בטינה קוכאנק, אידה רוזנברגר, תמר צדקה, יעקב פרצלן ודני סתיו.

לחברי הסטודנטים, אבבה בקלה, ארנון דותן, ויטה הללי, אילנה שטיין וזויה צ'רנוב על העזרה, החברה והאוזן הקשבת במהלך עבודתי במעבדה.

לד"ר יעקב תדמור ואיילה מאיר ממרכז מחקר נווה יער במינהל המחקר החקלאי, לפרופ' יוסף הירשברג ודוד קצ'נובסקי מהמחלקה לגנטיקה, המכון למדעי החיים באוניברסיטה העברית בירושלים, ולד"ר יוליוס בן דוד מהפקולטה לחקלאות ברחובות - על העזרה באנליזות הכימיות;

לד"ר ורד הולדנגרבר ממינהל המחקר החקלאי על העזרה במיקרוסקופ האלקטרוניים;

לד"ר שאול בורד ממינהל המחקר החקלאי על העזרה בעבודה המולקולארית;

ולכל אנשי המחלקה לאחסון על העזרה והחברה הנעימה.

להוריי היקרים, פרופ' שמואל ומרגלית גליק

לטל, רעייתי

על התמיכה, העידוד והגיבוי לכל אורך הדרך

## תוכן העניינים

i	<b>א. תקציר</b>
1	<b>רשימת קיצורים</b>
3	<b>ב. מבוא</b>
3	<b>ב.1. הצגת נושא המחקר</b>
3	<b>ב.2. פיגמנטים בפרחים ובפירות</b>
3	<b>ב.3. קרוטנואידים בצמחים</b>
4	<b>ב.4. מסלול הביוסינתזה של קרוטנואידים</b>
4	<b>ב.5. בקרת הסינתזה של הקרוטנואידים</b>
6	<b>ב.6. מידור הקרוטנואידים ותפקיד חלבוני ה-fibrillin</b>
8	<b>ב.7. אופני פירוק הקרוטנואידים ואפיון תוצרי הפירוק</b>
11	<b>ב.8. פיגמנטים, שינויי צבע ופירוק קרוטנואידים בוורדים</b>
13	<b>ב.9. תגובת צמחים לחומצה יסמונית או מתיל יסמונט והשפעת ההורמון על הקרוטנואידים</b>
14	<b>ב.10. הנחת העבודה</b>
14	<b>ב.11. מטרות המחקר</b>
16	<b>ג. שיטות המחקר</b>
16	<b>ג.1. טיפולים בפרחים</b>
16	<b>ג.2. מדידות של עוצמת הצבע</b>
17	<b>ג.3. זיהוי סוג הפיגמנט בעלי הכותרת של וורדים</b>
18	<b>ג.4. מיצוי וקביעת ריכוז הקרוטנואידים</b>
18	<b>ג.5. הפרדת הקרוטנואידים וזיהויים</b>
19	<b>ג.6. אנליזת LC/MS</b>
19	<b>ג.7. שיטות עבודה מולקולאריות</b>
22	<b>ג.8. אנליזות חלבונים: הפקה, כימות והרצה, ואנליזת Western Blot לחלבון RhCHRC</b>
23	<b>ג.9. בדיקת הרכב הנדיפים בפרחים מזן 'פריסקו'</b>
23	<b>ג.10. אנליזת דוגמאות במיקרוסקופ אלקטרוניים</b>
25	<b>ד. תוצאות</b>
25	<b>ד.1. מופע עלי הכותרת בוורדים קטופים במהלך חיי האגרטל והשפעת הטיפול ב-MJ על המופע</b>
25	<b>ד.1.1. השתנות מופע הצבע בזנים 'פריסקו' ו'גולדן גייט' לאורך חיי האגרטל והשפעת הטיפולים ב-MJ</b>
25	<b>ד.1.2. זיהוי הפיגמנט האחראי לצבע הצהוב בזנים 'פריסקו' ו'גולדן גייט'</b>
25	<b>ד.1.3. השפעת הטיפול ב-MJ על מופע הצבע בזני ורדים נוספים במהלך חיי האגרטל</b>
26	<b>ד.1.4. השפעת הטיפול ב-MJ על שינויי הקוטר והמשקל של פרחי הזן 'פריסקו' במהלך חיי האגרטל</b>

31	ד.2. שינויים בתכולת הקרוטנואידים ובהרכבם בעלי הכותרת של ורדים מהזנים 'פריסקו' ו'גולדן גייט' בחיי האגרטל והשפעת הטיפול ב- MJ על שינויים אלו
31	ד.1.2. שינויים בתכולת הקרוטנואידים של ורדים מזן 'פריסקו' והשפעת הטיפול ב- MJ על שינויים אלו
36	ד.2.2. שינויים בהרכב הקרוטנואידים של ורדים מזן 'פריסקו' במהלך חיי האגרטל והשפעת הטיפול ב- MJ על שינויים אלו
41	ד.3.2. שינויים בתכולת הקרוטנואידים ובהרכבם בזן 'גולדן גייט' במהלך חיי האגרטל והשפעת MJ על שינויים אלה
43	ד.3. שינויים בביטוי גנים במסלול הביוסניתזה של קרוטנואידים בעלי הכותרת של פרחי ורדים מזן 'פריסקו' והשפעת הטיפול ב- MJ על ביטויים במהלך חיי האגרטל
43	ד.1.3. איתור ושיבוט מקטעים מגנים המקודדים לאנזימים במסלול הביוסניתזה של קרוטנואידים בוורדים
43	ד.2.3. שינויים בביטוי גנים במסלול הביוסניתזה של קרוטנואידים בעלי הכותרת של פרחי ורדים מזן 'פריסקו' והשפעת הטיפול ב- MJ על ביטויים במהלך חיי האגרטל
46	ד.4. שינויים במידור הקרוטנואידים בכרומופלסטידות שבעלי הכותרת במהלך חיי האגרטל והשפעת הטיפול ב- MJ על מידורם
46	ד.1.4. אנליזה של גנים מספריית הפחתה שביטויים הושפע מהטיפול ב- MJ
49	ד.2.4. השתנות דפוס הביטוי של הגן <i>RhCHRC</i> ורמת החלבון שלו בעלי כותרת של ורדים מזן 'פריסקו' במהלך חיי האגרטל והשפעת הטיפול ב- MJ על שינויים אלה
51	ד.3.4. שינויים במבנה הפנימי של הכרומופלסטידות בעלי כותרת של ורדים מזן 'פריסקו' והשפעת הטיפול ב- MJ על המבנה
55	ד.5. אפיון של תהליכי חמצון המעורבים בפירוק של קרוטנואידים בעלי הכותרת של ורדים מהזן 'פריסקו' ובחינת השפעת הטיפול ב- MJ על תהליכים אלה
55	ד.1.5. השפעת הדגרה באווירה מעוטת חמצן על פירוק הקרוטנואידים
56	ד.2.5. שיבוט מקטעים מהגנים <i>RhCCD1</i> ו- <i>RhCCD4</i> ומיקום החלבונים של גנים אלה בתא
58	ד.3.5. שינויים בביטוי הגנים <i>RhCCD1</i> ו- <i>RhCCD4</i> בזנים 'פריסקו' ו'גולדן גייט' במהלך חיי האגרטל והשפעת הטיפול ב- MJ על ביטויים
60	ד.4.5. אפיון 'peak 1' כתוצר הפירוק החמצוני של violaxanthin
63	ד.5.5. הרכב הנדיפים מעלי הכותרת של הזן 'פריסקו' במהלך פירוק הקרוטנואידים והשפעת הטיפול ב- MJ על הרכבם
65	ה. דיון ומסקנות
65	ה.1. שינויים בצבע ובתכולת הקרוטנואידים של פרחי 'פריסקו' במהלך חיי האגרטל
66	ה.2. הגברת הצבע ותכולת הקרוטנואידים בזן 'פריסקו' ובזני ורדים נוספים על ידי הטיפול ב- MJ

67	ה.3. שינויים בהרכב הקרוטנואידים בעלי הכותרת של פרחי ורדים במהלך חיי האגרטל והשפעת MJ על שינויים אלה
69	ה.4. השפעת הטיפול ב-MJ על גנים במסלול הביסניתזה של הקרוטנואידים בעלי הכותרת של פרחי הזן 'פריסקו' במהלך חיי האגרטל
69	ה.5. תפקיד החלבון RhCHRC במידור הקרוטנואידים בפרחי הזן 'פריסקו'
72	ה.6. השפעת הטיפול ב-MJ ונוכחות החלבון RhCHRC בעלי הכותרת על מנגנוני ההגנה מפני פתוגנים
72	ה.7. אפיון הגנים לאנזימי חמצון של הקרוטנואידים בעלי הכותרת
73	ה.7.1. הגן <i>RhCCD1</i>
73	ה.7.2. הגן <i>RhCCD4</i>
74	ה.8. זיהוי 'peak 1' כתוצר הפירוק של violaxanthin המזורז על ידי האנזים RhCCD4
75	ה.9. תהליך פירוק הקרוטנואידים – מודלים והוכחות
76	ה.10. סיכום
77	ו. ביבליוגרפיה
84	ז. נספח – רשימת פרסומים
84	ז.1. מאמרים
84	ז.2. תקצירים של הרצאות או פוסטרים בכנסים
I	תקציר באנגלית

## א. תקציר

ורדים מזנים צהובים שונים, כדוגמת 'פריסקו' וגולדן גייט', מתאפיינים בדהיית צבע עלי הכותרת במהלך חיי האגרטל. בעלי הכותרת של זנים אלו עוצמת הצבע הצהוב עלתה בתחילת פתיחת הפרחים באגרטל ובהמשך חיי האגרטל הפרחים הלכו ודהו. טיפול משולב של הטענה וריסוס בהורמון הצמחי מתיל יסמונט - methyl jasmonate (MJ), שמר על עוצמת צבע גבוהה במהלך חיי האגרטל בשני הזנים. בדיקה איכותית העלתה שהפיגמנטים העיקריים בשני זנים אלו הם קרוטנואידים, ושהטיפול ב-MJ הגביר את רמתם.

**הנחת העבודה** העיקרית הייתה שבעלי הכותרת של ורדים קטופים מתקיימים תהליכים של יצירת קרוטנואידים ופירוקם. שינויי הצבע שחלים במהלך חיי האגרטל נובעים משינוי היחס שבין תהליכי היצירה והפירוק של הקרוטנואידים, וכתוצאה מכך צבע הפרחים דוהה. בנוסף הנחנו, שייצור הקרוטנואידים בזן 'פריסקו' מבוקר ברמה המולקולארית, ופירוקם נובע מחמצון אנזימטי שלהם באמצעות אנזים פלסטידי, ומותנה בהריסת מידור הקרוטנואידים בתוך הכרומופלסטידות. הטיפול ב-MJ מגביר את עוצמת הצבע באמצעות השפעה הן על הגברת יצירת הקרוטנואידים וייצובם בעלי הכותרת והן על עיכוב פירוקם.

לבחינת הנחות העבודה הנ"ל נקבעו המטרות הבאות:

1. אפיון תכולת הקרוטנואידים והרכבם בעלי הכותרת של פרחי ורדים צהובים מזנים 'פריסקו' וגולדן

גייט' במהלך חיי האגרטל, והגדרת ההשפעה של הטיפול ב-MJ על התכולה והרכב.

2. בחינת ביטוי גנים המקודדים לאנזימים במסלול הביוסנתזה של קרוטנואידים בעלי הכותרת של

ורדים צהובים במהלך חיי האגרטל, ובחינת ההשפעה של MJ על הביטוי של גנים אלו.

3. איתור גנים נוספים הקשורים ליציבות ופירוק הקרוטנואידים אשר רמת ביטויים משתנה כתוצאה

מהטיפול ב-MJ, ובחינת הקשר בינם לבין העצמת הצבע.

4. בחינת ההנחה שדהיית הצבע בפרחי ורדים צהובים באגרטל נובעת מפירוק הקרוטנואידים כתוצאה

מתהליכי חמצון אנזימטיים בכרומופלסטידות, ובחינת השפעת הטיפול ב-MJ על תהליכים אלו.

בניסויים הראשונים נמצא, שבפרחי הביקורת מזן 'פריסקו' הקרוטנואידים הצטברו עד ליום 2 של

חיי האגרטל ולאחר מכן תכולתם פחתה, בעוד שבפרחים מטופלים ב-MJ הקרוטנואידים המשיכו להצטבר

עד ליום 4. בעזרת שימוש ב-norflurazon (NF) המעכב את סינתזת הקרוטנואידים, הפרדנו בין תהליכי

הייצור והפירוק בעלי הכותרת, והראינו שהטיפול ב-MJ הגביר את ייצור הקרוטנואידים וגם עיכב את

פירוקם בדורים השונים של הפרח. גם בפרחי הזן 'גולדן גייט' נמצא כי הטיפול ב-MJ הגביר את תכולת כלל

הקרוטנואידים.

בהמשך, מיצוי קרוטנואידים מעלי הכותרת של הזן 'פריסקו' הופרד במכשיר HPLC והרכבו זוהה.

הקרוטנואידים העיקריים בעלי הכותרת היו violaxanthin ו-neoxanthin, אשר הרכיבו כ-85% מתכולת

הקרוטנואידים. בנוסף אליהם, היה הרכב מגוון של קרוטנואידים אחרים בימים הראשונים לחיי האגרטל, אך

הוא הלך והצטמצם עם התקדמות חיי האגרטל, כאשר במקביל הלך והצטבר תוצר חדש לא מזוהה שהוגדר

כ-'peak 1'. הטיפול ב-MJ הגביר את התכולה הכללית של הקרוטנואידים, אך לא שינה מהותית את הכמות

היחסית של כל קרוטנואיד בהרכב. לעומת זאת, השפעת הטיפול ב-MJ על רמתו של 'peak 1' הייתה הפוכה,

והטיפול עיכב את הצטברות החומר בעלי הכותרת.

כדי לבחון את השינויים בייצור הקרוטנואידים במהלך חיי האגרטל, נבחנו דפוס הביטוי של גנים



שונים של מסלול הביוסנתזה של קרוטנואידים בעלי כותרת של פרחים מזן 'פריסקו', ונבחנה השפעת הטיפול ב-MJ על ביטויים. חלק מהגנים שובטו לצורך זה מעלי הכותרת של הזן 'פריסקו'. הגן שהושפע באופן המובהק ביותר מהטיפול ב-MJ הוא *ζ-Carotene desaturase* (*Zds*), שכן הטיפול האריך את משך ביטוי במהלך חיי האגרטל לעומת הביקורת. הטיפול ב-MJ הגביר גם את ביטוי הגן *Phytoene desaturase* (*Pds*) בעיקר בימים הראשונים של חיי האגרטל. השפעת הטיפול ב-MJ על ביטוי הגנים *Phytoene Synthase* (*Psy*) ו-*Lycopene β-cyclase* (*Lcy-b*) לא הייתה חד-משמעית, שכן הגברת הביטוי בתגובה ל-MJ ניכרה רק בחלק מהניסויים.

שתי ספריות הפחתה גנטיות של פרחים מטופלים ב-MJ ופרחי ביקורת נבנו מהזן 'פריסקו' כדי לאתר גנים נוספים הקשורים ליציבות ופירוק קרוטנואידים המתבטאים בפרחים בהשפעת הטיפול ב-MJ במהלך 24 ו-48 השעות הראשונות לחיי האגרטל. בשתי הספריות נמצאו 74 מקטעים שביטויים הוגברו בעקבות הטיפול ב-MJ, אך באנליזות Northern blot ל-28 מהמקטעים נמצאו הבדלים כמותיים בלבד ומינוריים יחסית למצופה. יחד עם זאת, אחד המקטעים שהוגברו בספריית ההפחתה נמצא הומולוגי לגן שמקודד לחלבון (CHRC) Chromoplast Protein C, המשתתף במידור הקרוטנואידים לפלסטוגלובולות שבתוך הכרומופלסטים. באנליזות של semi-quantitative RT-PCR נמצא, שהטיפול ב-MJ הגביר את רמת ביטוי הגן *CHRC* במהלך רוב חיי האגרטל של פרחי הזן 'פריסקו'. באנליזת Western נמצא, שהטיפול ב-MJ הגביר את רמת החלבון *CHRC* בפרחים אלו החל מיום 2. בנוסף לכך, בפרחי הביקורת חלה ירידה ברמת החלבון בין יום 4 ליום 5, ואילו בפרחים מטופלים ב-MJ רמת החלבון נשמרה גבוהה לאורך כל התקופה הנבדקת. לאור תוצאות האנליזה לחלבון *CHRC*, נבחן המבנה הפנימי של הכרומופלסטים בעלי הכותרת של פרחי הזן 'פריסקו' במהלך חיי האגרטל באמצעות אנליזה במיקרוסקופ אלקטרוני. התוצאות הראו שהחל מיום 2 ואילך, פרחים מטופלים ב-MJ הכילו מספר רב יותר של פלסטוגלובולות בכרומופלסטידות. בנוסף, בחתכים שנלקחו מהאזור הדהוי העליון בעלה הכותרת ביום 4 היו הכרומופלסטידות בשלבי פירוק, ואילו בחתכים שנלקחו מהאזור הצבעוני שבבסיס עלה הכותרת הכרומופלסטידות נותרו שלמות. תוצאות אלה מצביעות על הקשר בין תכולת קרוטנואידים גבוהה ועוצמת הצבע הצהוב לבין מספר הפלסטוגלובולות ושלמות הכרומופלסטידות.

הדגרת פרחים מזן 'פריסקו' באווירה של 2% חמצן למשך 9 ימים עיכבה בצורה משמעותית את פירוק הקרוטנואידים בתקופה זו, עדות לכך שתהליכי חמצון מעורבים בפירוקם. לכן החלטנו לבחון האם קיימים בפרחי ורדים גנים המקודדים לאנזימים ממשפחת ה-*carotenoid cleavage dioxygenase* (*CCD*), אשר מזרזים תגובות של חמצון קרוטנואידים בצמחים שונים.

שני גנים ממשפחת *CCD*, *RhCCD1* ו-*RhCCD4* שובטו מ-cDNA מעלי כותרת של פרחי 'פריסקו'. ניתוח ביואינפורמטי של הרצפים חזה, שרק החלבון *RhCCD4* מכיל פפטיד מוביל לפלסטידות, בעוד ש-*RhCCD1* אינו מכיל כלל פפטיד מוביל, ולכן הוא כנראה ממוקם בציטוזול.

ביטוי הגנים *RhCCD4* ו-*RhCCD1* נבדק באנליזת Northern בשני הזנים 'פריסקו' וגולדן גייט', הנבדלים זה מזה בקצב פירוק הקרוטנואידים ודהיית הצבע במהלך חיי האגרטל. תוצאות האנליזה הראו התאמה גבוהה בין ביטוי הגן *RhCCD4* לבין קצב פירוק הקרוטנואידים בשני הזנים. בזן 'פריסקו' החל מהיום השני, שבו מתחילה דהיית הצבע, עלתה רמת ביטוי הגן והוא נשאר ברמת ביטוי גבוהה עד ליום החמישי. בזן 'גולדן גייט' המאחר לדהות, *RhCCD4* נותר ברמת ביטוי בסיסית עד ליום 5 והעלייה ברמתו

התרחשה רק ביום 6. לעומת זאת, ביטוי הגן *RhCCD1* לא התאים לקצב פירוק הקרוטנואידים באף אחד מהזנים. הטיפול ב-MJ הפחית את רמת ביטוי הגן *RhCCD4* אך לא השפיע על רמת ביטוי הגן *RhCCD1*. תוצאות אלו מחזקות את ההשערה ש-*RhCCD4* אכן משתתף בפירוק הקרוטנואידים בכרומופלסטידות הגורם לדהיית עלי הכותרת, ושהטיפול ב-MJ עיכב את פירוק הקרוטנואידים באמצעות הפחתת ביטוי הגן. בעקבות הממצאים האלו עלתה ההשערה שהתוצר הלא מזוהה 'peak 1', שנמצא בהפרדת הקרוטנואידים ב-HPLC ואשר רמתו עלתה עם התקדמות חיי האגרטל, הוא תוצר ריאקציה פירוק של קרוטנואידים המזורזת באמצעות האנזים *RhCCD4*. לבחינת ההשערה בוצעה אנליזת LCMS למיצוי של קרוטנואידים מעלי כותרת של פרחי הזן 'פריסקו'. נמצא, ש- 'peak 1' הוא בעל מספר פחמנים ( $C_{27}$ ) ומשקל זהה ל-*sinensiaxanthin*, שזוהה בעבר בפרחי ורדים כתוצר הפירוק של הקרוטנואיד *violaxanthin*, ושהוא מכיל שתי קבוצות הידרוקסיל כצפוי ממבנה המולקולה. לאור הממצאים האלו מוצע, ש- 'peak 1' הוא תוצר פירוק של הקרוטנואיד *violaxanthin* בפרחי הזן 'פריסקו', שמתרחש בפלסטידות ומזורז בעזרת האנזים *RhCCD4*. התוצר הנוסף הצפוי מפירוק זה הוא מולקולה נדיפה בגודל של  $C_{13}$ . ציפינו למצוא שהמולקולה הזו מצטברת בכמות גבוהה יותר בפרחי ביקורת בהשוואה לפרחים שטופלו ב-MJ. אולם המולקולה לא אותרה באנליזות GCMS שנערכו לנדיפים שנאספו מהפרחים ולמיצוי מכתש של עלי הכותרת.

**סיכום ומסקנות:** מחקר זה שופך אור על המנגנונים התאיים האחראים לתהליך דהיית הצבע בפרחי ורדים קטופים המכילים פיגמנטים קרוטנואידים בעלי הכותרת. מוצע, שפירוק הקרוטנואידים בפרחים נובע משילוב של שני תהליכים קטבוליים שמתקיימים בעלי הכותרת במהלך חיי האגרטל. התהליך האחד הוא פירוק אנזימטי תוך-פלסטידי של הקרוטנואידים בעלי הכותרת: בפרחים מזן 'פריסקו' *violaxanthin*, שהוא הקרוטנואיד העיקרי התורם לצבע הצהוב בעלי הכותרת, ממודר בפלסטוגלובולות שבכרומופלסטים ומחומצן באמצעות האנזים *RhCCD4* לקבלת התוצר *sinensiaxanthin* בגודל של 27 פחמנים. תהליך זה מתרחש במשולב עם תהליך קטבולי נוסף של פירוק המבנים הפנימיים בכרומופלסטידות. הפירוק התבטא בהקטנת צפיפות החומר שבכרומופלסטידות, בירידה ברמת החלבון *RhCHRC* ובביטוי הגן במקודד לו, בירידה מקבילה במספר הפלסטוגלובולות ובצפיפותן, ובהמשך חיי האגרטל גם בהרס הממברנה של הכרומופלסט. גם הגן *RhCCD1* נמצא בעלי הכותרת, אולם אנו משערים שתרומתו לדהיית הצבע בעלי הכותרת משנית, עקב מיקומו הציטוזולי. טיפול משולב של הטענה וריסוס ב-MJ שניתן לאחר הקטיפה הגביר את עוצמת הצבע הצהוב בעלי הכותרת של פרחי הזן 'פריסקו' במהלך חיי האגרטל באמצעות שלושה מנגנונים שונים: ע"י הגברת ביטוי גנים המקודדים לאנזימי מפתח במסלול הביוסנתזה של הקרוטנואידים, ע"י ייצוב הפלסטוגלובולות בהן ממודרים הקרוטנואידים שבפלסטידות באמצעות הגברת הרמה התאית של החלבון המבני *RhCHRC*, וע"י הפחתת רמת ביטוי הגן *RhCCD4* המקודד לאנזים המזורז חמצון קרוטנואידים בפלסטידות.

המחקר הנוכחי מראה לראשונה השפעה מובהקת של MJ על מידור הקרוטנואידים בכרומופלסטידות בעלי כותרת של פרחים, וכן על הגברת רמת הביטוי של גנים במסלול הביוסנתזה של קרוטנואידים, לאחר שמרבית ההשפעות של MJ על פיגמנטים התייחסו לאנתוציאנינים. המחקר תורם מידע חדש לדיון המדעי המתקיים בשנים האחרונות באשר לאופן פעילותם של האנזימים *CCD1* הממוקם בציטוזול ו-*CCD4* הממוקם בפלסטידות, ומציג מסלול פירוק חמצוני של קרוטנואידים בעלי כותרת של פרחים, כולל זיהוי לראשונה של אחד מתוצרי הפירוק במסלול.

## רשימת קיצורים

ABA = abscisic acid

Au = arbitrary units

BLAST = basic local alignment search tool

BSA = bovine serum albumin

CCD = carotenoid cleavage dioxygenase

CHRC = chromoplast protein C

CTAB = cetyl trimethylammonium bromide

EDTA = ethylenediamine-tetraacetic acid

ESI = electrospray ionization

GCMS = gas chromatograph mass spectrophotometer

GGPP = geranylgeranyl diphosphate

JA = jasmonic acid

LCMS = liquid chromatograph mass spectrophotometer

Lcy-b = lycopene cyclase

MJ = methyl jasmonate

MOPS = 3-[N-morpholino]propanesulfonic acid

NCED = 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase

NF = norflurazon

nm = nanometer

PAP = plastid associated protein

Pds = phytoene desaturase

PGIP = polygalacturonase-inhibiting protein

Psy = phytoene synthase

PVP = polyvinyl pyrrolidone

PVPP = polyvinylpolypyrrolidone

RCI-2 = Rare Cold-Inducible 2

ROS = reactive oxygen species

Rt = retention time

RT-PCR = reverse transcriptase polymerase chain reaction

SDS = sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE = SDS polyacryamide gel electrophoresis

SSC = sodium chloride sodium citrate

ZCD = zeaxanthin cleavage dioxygenase

Zds =  $\xi$ -carotene desaturase

## ב. מבוא

### ב.1. הצגת נושא המחקר

זני ורדים שונים מתאפיינים בדהיית צבע בעלי הכותרת במהלך חיי האגרטל. בעלי הכותרת של זני הוורדים 'פריסקו' ו'גולדן גייט' עוצמת הצבע הצהוב עולה במהלך פתיחת הפרח באגרטל ובהמשך חיי האגרטל חלה דהייה הדרגתית. טיפול משולב של הטענה וריסוס בהורמון הצמחי מתיל יסמונט (MJ), שמר על עוצמת צבע גבוהה במהלך חיי האגרטל בשני הזנים (Meir et al., 1998). בדיקה איכותית העלתה שהפיגמנטים העיקריים בשני זנים אלו הם קרוטנואידים, והטיפול ב-MJ הגביר את רמתם (Glick et al., 2007). עבודה זו עוסקת באפיון כימי ומולקולארי של שינויי הצבע בעלי כותרת של ורדים מזן 'פריסקו' ו'גולדן גייט' בהקשר למסלול הביוסנתזה והפירוק של הקרוטנואידים במהלך חיי האגרטל, ושל השפעת הטיפול ב-MJ על שינויים אלו.

### ב.2. פיגמנטים בפרחים ופירות

צבעי הפרחים והפירות הם בעלי חשיבות אקולוגית רבה ביכולתם למשוך מאביקים ומפיצי זרעים. מבחינה חקלאית הפיגמנטים הם בעלי חשיבות כלכלית בשל ערכם האסטטי במשיכת צרכנים. לא בכדי צבעי פרחים ופירות היו בין התכונות הראשונות אשר שימשו בטיפוח.

הפיגמנטים המעניקים צבעוניות לפרחים משתייכים לשלוש קבוצות כימיות שונות – אנתוציאנינים (anthocyanins), קרוטנואידים (carotenoids) ובטלאינים (betalains). מולקולות המוצא של אנתוציאנינים כוללות את 4-coumaroyl-CoA ו-malonyl-CoA. האנתוציאנינים נוצרים מענף במסלול יצירת הפלבנואידים (flavonoids). הקרוטנואידים נגזרים מסדרת ריאקציות מאחות של טרפנים (terpens) כמפורט בהמשך, ואילו בטלאינים נגזרים ממולקולת המוצא טירוזין (Tanaka et al., 2008).

למרות המוצא הכימי השונה של הפיגמנטים הם חולקים כמה תכונות משותפות. אנתוציאנינים, המקנים קשת צבעים רחבה - מצהוב ועד כחול, ובטלאינים המקנים לפרחים קשת צבעים צרה יותר - מצהוב עד אדום, הם הידרופיליים ואגורים בחללית התא (ואקואולה), או בגופיפים ציטוזוליים. הקרוטנואידים, בדומה לבטלאינים, מקנים צבעי אדום עד צהוב, אך הם הידרופוביים ואגורים בפלסטידות. לעיתים ניתן למצוא באותם פרחים שילוב של קרוטנואידים ואנתוציאנינים והצבע מועשר עוד יותר. עד כה, לא נמצאו פרחים שמשלבים בתוכם אנתוציאנינים ובטלאינים. מסלולי יצירת האנתוציאנינים והקרוטנואידים פוענחו ופורסמו בסקירות רבות. לעומת זאת פיענוח מסלול יצירת הבטלאינים עודנו נמשך.

שינויי צבע חלים באופן טבעי בפרחים. התופעה נחקרה בפרחים המכילים פיגמנטים אנתוציאנינים ויוחסה לשינויי pH בחללית התא ולשינויים באופן מידורם בתוכה (Grotewold, 2006). העבודה הנוכחית עוסקת בשינויי צבע החלים בורדים צהובים קטופים המכילים בעלי הכותרת פיגמנטים קרוטנואידים. בהמשך הסקירה יפורטו מסלולי היצירה והמטבוליזם של הקרוטנואידים המשפיעים על שינויי הצבע בפרחים.

### ב.3. קרוטנואידים בצמחים

לקרוטנואידים בצמחים יש מגוון תפקידים הבאים לידי ביטוי ברקמות שונות ובזמנים שונים לאורך חיי

הצמח (Hirschberg, 2001): בכלורופלסט הם מרכיבים במערכת קליטת האור וכן משמשים להגנה מפני נזקי חמצון; הצבע שהם מקנים לפרחים ולפירות משמש למשיכת מאביקים ומפיצי זרעים; תוצרי הפירוק שלהם משמשים כמולקולות מוצא ליצירת מווסתי צמיחה הנעים בצמח, ובמסלול פירוק אחר הם מהווים מקור ליצירת חומרים נדיפים (Lewinsohn et al., 2005). נכון יהיה לומר כי הקרוטנואידים הם אחת מקבוצות המולקולות המגוונות ורבות הפנים ביותר בעולם הצמח.

#### 4.4. מסלול הביוסנתזה של קרוטנואידים

מסלול הביוסנתזה של הקרוטנואידים אופיין בפרחים, וידועים האנזימים המשתתפים במסלול ותוצריהם השונים (איור 1) (Hirschberg, 2001). הקרוטנואידים הם מולקולות בעלות 40 פחמנים ( $C_{40}$ ), הנוצרות בפרקציות השומניות של התא. תחילת ייצורם בסדרת ריאקציות מאחות של טרפנים. אבן הבניין ה"טרפנית" היא מולקולת isoprene בעלת 5 פחמנים - isopentenyl diphosphate. בשלבים המוקדמים של המסלול נוצרת מולקולה בגודל  $C_{20}$  המכונה geranylgeranyl diphosphate (GGPP). מולקולה זו מהווה נקודת מוצא במסלולים מטבוליים שונים: מסלול יצירת הג'ברלינים, יצירת מבנים תוך-פלסטידיים שונים כגון טוקופרול ו-Phytol אשר מרכיב את השרשרת הצדדית במולקולת הכלורופיל, ומסלול הביוסנתזה של קרוטנואידים, שאחד מהם מהווה חומר מוצא למסלול סינתזת ה-ABA (Lu and Li, 2008).

שלב מפתח מחייב ביצירת הקרוטנואידים הוא דחיסת שתי מולקולות GGPP ליצירת הקרוטנואיד הראשון, phytoene. שלב זה מזורז באמצעות האנזים phytoene synthase (Psy). phytoene, הקרוטנואיד הראשון במסלול, הוא לינארי וחסר צבע, והופך לליקופן לאחר איזומריזציה ושני שלבי דסטורציה, המעלים את מספר הקשרים הכפולים הצמודים במולקולה ומקנים לה את הצבע האדום. באמצעות Lycopene cyclases נוצרים מליקופן הקרוטנואידים הציקליים (cyclic carotenoids). זוהי נקודת פיצול אשר ממנה עשוי להיווצר lutein במסלול אחד או  $\beta$ -carotene בעל הצבע הצהוב-כתום, במסלול המקביל. בהמשך מסלול זה מתרחשת הידרוקסילציה של הטבעות בקצוות ליצירת הקרוטנואידים המכונים xanthophylls, להם גווני צהוב.

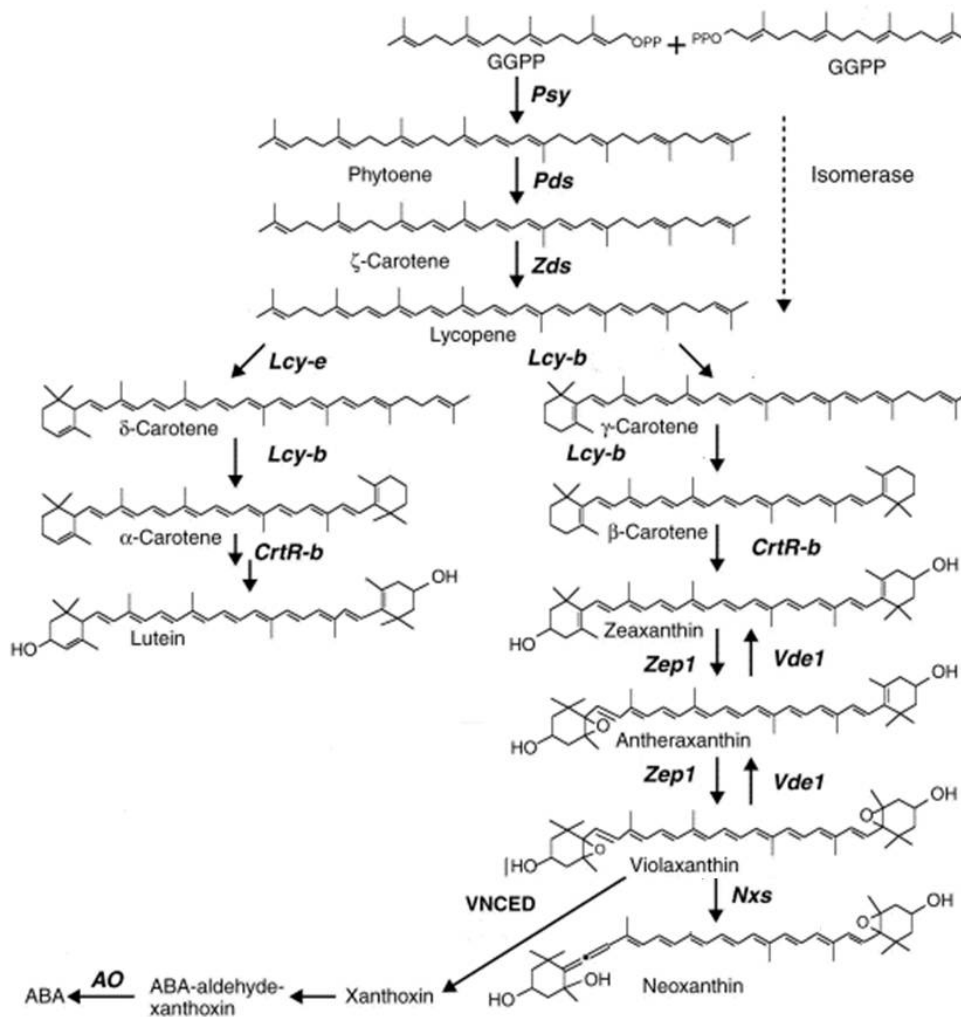
לאנזימים Phytoene desaturase (Pds),  $\xi$ -carotene desaturase (Zds) ו-Lycopene cyclase (Lcy) קיימים מעכבים שונים (Simkin et al., 2000). לדוגמה, החומר norflurazon (NF) מעכב את פעילות האנזים Pds ומשמש כקוטל עשבים.

#### 5.5. בקרת הסינתזה של הקרוטנואידים

באיברי הצמח הירוקים הקרוטנואידים נמצאים בכלורופלסטים ומהווים חלק מקומפלקס קליטת האור במערכת הפוטוסינתזה. בקומפלקסים אלו הרכב הקרוטנואידים וכמותם היחסית הם קבועים ומדודים (Lu and Li, 2008), והבקרה על ייצורם לצורך זה היא הדוקה ומותאמת עם שאר מרכיבי הקומפלקס (Jilani et al., 1996). בשונה מכך, בעלי כותרת צבעונית ובפירות, בהם הקרוטנואידים נמצאים בכרומופלסטים, מצטברת כמות רבה מאד של פיגמנט בזמן קצר. הקרוטנואידים האחראים ליצירת הצבע נוצרים ומצטברים בכרומופלסטים בתהליך מהיר, בעוצמה ובכמות רבה.

ממצאים רבים מעידים שעיקר הבקרה על ייצור הקרוטנואידים בכרומופלסטים הינה ברמת התעתוק:

בפירות ובפרחי עגבניה ופלפל הצטברות הקרוטנואידים השונים היא בהתאמה לעליה בביטוי גנים משלבים קודמים של מסלול הביוסנתזה וירידה בביטוי גנים המופיעים במורד הזרם מהם (Hirschberg, 2001); בתפוחי אדמה נמצא שפקעות צהובות הכילו רמה גבוהה יותר של הגן *Psy* מאשר פקעות לבנות (Taylor and Ramsay, 2005). בנוסף, ירידה ברמת האנזים zeaxanthin epoxidase לעלייה משמעותית ברמת הקרוטנואידים (Taylor and Ramsay, 2005).



**איור 1: מסלול הביוסנתזה של קרוטנואידים בפרחים והאנזימים העקריים.**

המסלול מעובד מתוך Hirschberg, 2001, וכולל גם את המסלול ליצירת חומצה אבציסית (ABA) מ-violaxanthin.

GGPP = geranylgeranyl diphosphate; Psy = phytoene synthase; Pds = phytoene desaturase; ZDS =  $\zeta$ -carotene desaturase; Lcy-b = lycopene  $\beta$ -cyclase; Lcy-e = lycopene  $\epsilon$ -cyclase; CrtR-b =  $\beta$ -ring hydroxylase; Zep1 = zeaxanthin epoxidase; Vde1 = violaxanthin deepoxidase; Nxs = neoxanthin synthase; VNCED = 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase; AO = aldehyde oxidase; ABA = abscisic acid.

מנגנון הבקרה על התעתוק לא פוענח במלואו. מתצפיות בצמחים השונים ברור, שעלייה ברמת ביטוי גנים לביסוינתזה באיברים כגון פירות ופרחים תלויה בשלב ההתפתחותי של הצמח, אולם האות להפעלת התעתוק עדיין לא הוגדר. בדיסקיות פלפל דווח שעלייה ברמת המחמצנים (ROS) השרתה תעתוק מוגבר של גנים שונים במסלול הביסוינתזה של הקרוטנואידים (Bouvier et al., 1998).

בקרה הורמונלית על ייצור קרוטנואידים נמצאה במספר צמחים: ג'ברלין השרה יצירת קרוטנואידים בפרחי מלפפון (Vainstein et al., 1994); אתילן העלה את רמת האנזים Psy בעגבנייה (Bartely and Scolnik, 1995); חומצה יסמונית ומתיל יסמונט העלו את הרמה של קרוטנואידים שונים בצמחים שונים, כמפורט להלן בסעיף 9. בגנומים של עגבנייה וארבידופסיס מופיעים הגנים המקודדים ל-Psy, ל-LCy ול- $\beta$ -carotene hydroxylase במספר עותקים. גנים אלו מתורגמים למשפחות חלבונים בעלי ביטוי שונה בפרחים ובפירות (Galpaz et al., 2006). תוצאה זו מרמזת על שלב בקרה נוסף על התעתוק. קיימות גם עדויות לכך שהבקרה על כמות הקרוטנואידים ברקמה אינה מתרחשת רק ברמת השיעתוק אלא גם ברמת ההצטברות או המידור (sequestration) של הקרוטנואידים (Li et al., 2001) כמפורט להלן.

## 6.6. מידור הקרוטנואידים ותפקיד חלבוני ה-fibrillin

קרוטנואידים הם הידרופוביים. לאחר יצירתם הם אגורים בפלסטידות. ברקמות ירוקות מטמיעות הקרוטנואידים נמצאים בכלורופלסטים ומשמשים כמרכיבים של המערכת הפוטוסינתטית וכאמצעי להתמודדות עם מחמצנים (Bartely and Scolnik, 1995). בפירות ופרחים תפקידם של הקרוטנואידים הוא לשמש כצבענים. הם מצטברים בכמויות גבוהות בפלסטידות ייעודיות המכונות כרומופלסטידות. מהלך הצטברות הצבע בהבשלת פירות ופריחת פרחים מלווה בפירוק הכלורופיל בכלורופלסטים והתמיינות הכלורופלסטים לכרומופלסטים אשר בהם מצטברת כמות רבה של קרוטנואידים (Vishnevetsky et al., 1999).

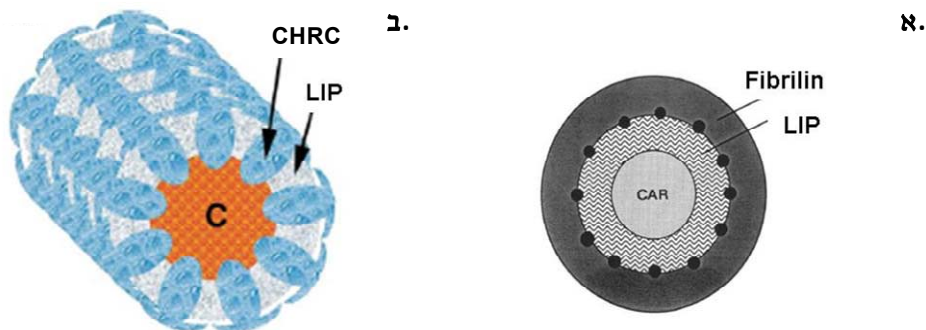
בתהליך ההתמיינות, במקביל להרס תילקואאידים בכלורופלסטים, נוצרים מבנים פנימיים המכילים בתוכם את הקרוטנואידים. מבנים אלו מופיעים בצמחים שונים בצורת בועיות (plastoglobules), מבנים מוארכים צינוריים (tubules), סיביים (fibrils) או צורות אחרות (Tilney-Basset, 1989). לעיתים ניתן למצוא מבנים פנימיים שונים באותה פלסטידה. בשלבים הראשונים בהבשלת פירות פלפל מופיעים פלסטוגלובולות בכרומופלסטידות. עם התקדמות ההבשלה הם מתארכים לצורת סיבים. מקובל להניח שמבנים אלו נועדו לאגור ולבודד (sequester) צברים של קרוטנואידים שמסונתזים בכמות רבה במהלך הפריחה או ההבשלה. בפרי פלפל נמצא ש-95% מהקרוטנואידים שבכרומופלסט נמצאים ב-fibrils (Deruere et al., 1994). מבנים תוך-פלסטידיים אלו נחקרו במערכות שונות ונמצאו פלסטוגלובולות גם בכלורופלסטים שברקמות ירוקות בנוסף לכרומופלסטים שבפירות ובפרחים.

אחד המרכיבים החשובים של הפלסטוגלובולות הוא חלבון מבני שאחראי לייצובם ולשמירת הקרוטנואידים בתוכן (Smirra et al., 1993; Pozueta-Romero et al., 1997; Kim et al., 2001). בפלפל כונה החלבון fibrillin (Deruere et al., 1994), והוא החלבון העיקרי שנמצא בפלסטוגלובולות (Pozueta-Romero et al., 1997). במערכת *in vitro* המבוססת על פירות פלפל נמצא, שיצירת מבני ה-fibrils תלויה בנוכחות החלבון fibrillin ובנוכחות קרוטנואידים ציקליים (cyclic carotenoids). כאשר הוספו למערכת קרוטנואידים המכילים קבוצת הידרוקסיל (xanthophylls), יצירת המבנים הייתה יעילה יותר, ככל הנראה בגלל יצירת קשרי אסתרי בין ה-xanthophylls



לליפידים פולריים (Deruere et al., 1994). אכן נמצא בפלפל, שהיחס בין xanthophylls הקשורים בקשרים אסתריים לבין xanthophylls חופשיים עולה עם התקדמות ההבשלה (Hornero, 2000). תוצאות אלו רומזות שהקרונואידים העיקריים שמשותפים ביצירת הפלסטוגלובולות הם xanthophylls והקרונואידים האחרים במידה פחותה יותר. על פי המודל המסביר את צורת מבנה הפלסטוגלובולות בפירות פלפל (איור 2א'), נראה, שהקרונואידים ממוקמים בפלסטוגלובולות ברובד פנימי, עטופים בשכבת ליפידים. שכבה זו עטופה אף היא בשכבה חיצונית של החלבון fibrillin.

החלבון ההומולוגי ל-fibrillin שנמצא בפרחי מלפפון כונה (Vainstein et al., 1994) (CHRC) Chromoplast Protein C. התעתוק והתרגום של הגן ל-CHRC במלפפון הוגברו עם הפריחה במקביל להצטברות הקרונואידים בעלי הכותרת. עם הזדקנות הפרח, חלה ירידה דרסטית בכמות החלבון במקביל לירידה בכמות הקרונואידים (Vainstein et al., 1994). תצפית זו מצביעה על מערכת בקרה משותפת או מערכת היזון חוזר בין הקרונואידים לחלבון CHRC. אכן, נמצא, שהבקרה של ביטוי החלבון מתקיימת גם לאחר התעתוק ותלויה בכמות הקרונואידים והרכבם בפלסטידה (Vishnevetski et al., 1999). בפרחי מלפפון, כמו בפלפל בתחילת הפריחה, מופיעות פלסטוגלובולות בפלסטידות ובהמשך נוצרים מהם ה-fibrils (Prebeg et al., 2006). המודל שהוצע להסבר מבנה ה-fibrils בפרחי מלפפון שונה במעט מזה שהוצע בפלפל: על פי המודל, שכבה משולבת של חלבון וליפידים פולריים עוטפת את הקרונואידים ליצירת המבנה (איור 2ב'). גם במודל המתייחס למבנה הפלסטוגלובולות בפרחי אמנון ותמר מוצע ששכבה חיצונית דקה המורכבת מליפידים פולריים מצפה את השכבה הפנימית המורכבת בעיקרה מחומרים א-פולריים (Vishnevetski et al., 1999). נראה לכן, ששלושת המודלים מציעים שהקרונואידים בפלסטידה אגורים בתוך מבנים פנימיים ומוגנים מפני פירוק.



**איור 2: סכמות המתארות את מבנה ה-fibrils בפירות פלפל (Deruere et al., 1994) (א') ובפרחי מלפפון (Vishnevetsky et al., 1999) (ב').** ליפידים פולריים = LIP; ליפידים פולריים = C / CAR; קרונואידים = CHRC = Chromoplast Protein C.

נראה שחלבונים אלו ממלאים תפקידים נוספים בצמח מעבר לאגירת קרונואידים. בצמחים שונים נמצא שמשפחת חלבוני fibrillin מונה פריטים רבים, ושהגנים לחלבונים מתבטאים בכל איברי הצמח ונמצאים תחת בקורות שונות: בפלפל הגן לחלבון fibrillin מתבטא ברמה בסיסית בכל איברי הצמח (Pozueta-Romero et al., 1997); בארבידופסיס נמצאו 13 גנים המשתייכים למשפחה זו (Laizet, 2004); בכלורופלסטים של עלי ארבידופסיס נמצאו 7 fibrillins שונים ובכרומופלסטים של פירות פלפל נמצאו ארבעה. קבוצת חלבוני fibrillin היא הקבוצה העיקרית

שנמצאה בין חלבוני הפלסטוגלובולות, הן בכלורופלסטים והן בכרומופלסטים (Ytterberg et al., 2006). בקנולה (*Brassica rapa*) נמצאו 3 חלבונים מהמשפחה באיברי הצמח השונים, שכינוי PAP (Plastid Associated Protein). הגן *PAP1* מתבטא בעיקר באבקנים, *PAP2* מתבטא רק בעלי הכותרת ו-*PAP3* מתבטא באיברים רבים אבל ביטויו הוא ברמה בסיסית בלבד. בהתאמה לכך חלבוני PAP נמצאו בכל איברי הצמח אך הכמות הרבה ביותר הצטברה בעלי הכותרת (Kim et al., 2001).

ידוע ממחקרים רבים שחלבוני fibrillin משתתפים בתגובת הצמח בהגנה כנגד עקות שונות, בפרט עקות בהן מעורבים רדיקלים מחמצנים, וכן שהגנים לחלבונים אלו מבוקרים על ידי ההורמון חומצה אבציסית (ABA) (Gillet et al., 1999; Manac'h and Kuntz, 1998; al., 1998). כך, בין השאר, בדוגמאות הבאות: הגנים שנמצאו בארבידופסיד מתבטאים באופן שונה ברקמות שונות בצמח ובתגובה לעקות שונות (Lazet et al., 2004); עקת יובש ועקת אוזון הורידו את רמת הביטוי של שלושת תעתיקי *PAP* בקנולה, ואילו פציעה ועקת אור הגבירו את רמתם (Kim et al., 2001); צמחי טבק שנחשפו לעקות יובש או עקת אור הגבירו את צבירת החלבון בכלורופלסטים שבעלים (Rey et al., 2000); בארבידופסיד נמצא ש-ABA השרה את הצטברות החלבון fibrillin והגביר בכך את יכולת ההתמודדות עם עקת אור בכלורופלסטים (Yang et al., 2006); בעלי תפוח אדמה עלתה רמת ביטוי הגן ההומולוגי ל-fibrillin בתגובה לעקות בהם מעורבים רדיקלים מחמצנים (ROS); בעגבניות עלתה רמת החלבון fibrillin בתגובה להדבקה בבקטריה *E. chrysanthemi* (Langenkämper et al., 2001), ובעלי עגבנייה בהם הושתק ביטוי הגן *CHRC* על ידי RNAi עלתה רמת הרגישות לפטרייה *Botrytis cinerea*, בנוסף לירידה בכמות הקרוטנואידים שהצטברו בפרחים. (Leitner-Dagan et al., 2006)

בנוסף למצבי עקה, גנים אלו גם מבוקרים על ידי מצבי התפתחות והורמונים צמחיים אחרים. לדוגמה: ביטוי הגן *CHRC* בפרחי מלפפון, אשר הוגבר עם הצטברות הקרוטנואידים, הוגבר גם בתגובה לג'יברלין וירד מאוד בתגובה ל-ABA (Vishnevetsky et al., 1997). יחד עם זאת, עד כה לא דווח על קשר בין ההורמון חומצה יסמונית (JA) והמתיל אסתר הנדיף שלו, מתיל יסמונט (MJ), לבין ביטוי הגן או החלבון *CHRC*.

## 7.2. אופני פירוק הקרוטנואידים ואפיון תוצרי הפירוק

קרוטנואידים מתחמצנים לתוצרים שונים המכונים אפוקרוטנואידים (Schwartz et al., 2001). תוצרי פירוק אלו נפוצים בטבע, והם בעלי חשיבות ביולוגית וכלכלית. בין התוצרים ניתן למנות את ההורמון ABA (Schwartz et al., 1997), הפיגמנטים הצהובים Mycorradicin ( $C_{14}$ ) ו-Blumenin ( $C_{13}$ ) הנוצרים בשורשים המאוכלסים במיקוריזה (Walter et al., 2007), הפיגמנטים המקנים את הצבע האדום לתבלין הזעפרן, bixin ו-crocetin (Bouvier et al., 2003), מולקולות סיגנל לעיכוב יצירת ענפים צדדיים (Booker et al., 2004) ונדיפים שונים כגון  $\beta$ -ionone (Lewinsohn et al., 2005).

בניגוד למסלול הביוסינתזה שפוענח, המידע על מסלולי הקטבוליזם של הקרוטנואידים בצמחים עודנו חלקי והנתונים הולכים ומצטברים רק בשנים האחרונות. פירוק הקרוטנואידים עשוי להיות תוצאה של ריאקציות ספונטניות, כגון חמצון על ידי אור (Caris-Veyrat et al., 2003), או תוצאה של ריאקציות אנזימטיות לא ספציפיות כגון פירוק חומצות שומן וקרוטנואידים על ידי האנזים lipoxigenase (Wu et al., 1999), וחמצון של קרוטנואידים ליצירת התוצר  $\beta$ -ionone אשר זורז על ידי האנזים xanthin oxidase בנוכחות אלדהידים (Bossert and Belin, 1994).

לעומת הדוגמאות האלו, נראה שעיקר פירוק הקרוטנואידים הינו מכוון ומזורז על ידי מסלולים אנזימטיים מוגדרים ליצירת האפוקרוטנואידים השונים. דגש מחקרי רב הושם על שתי תת-משפחות חלבונים המזרזים ריאקציות של חמצון קרוטנואידים בצמחים: 9-cis Epoxy-carotenoid Dioxygenase (NCED) ו-Carotenoid Cleavage Dioxygenase (CCD). אנזים ממשפחת NCED התגלה לראשונה בתירס, במוטנט *vp14* המתאפיין במחסור בהורמון ABA (Schwartz et al., 1997). בהמשך התגלו חלבונים נוספים ממשפחה זו. במסלול חמצון הקרוטנואידים המוביל ליצירת ABA, הקרוטנואידים violaxanthin ו-neoxanthin משמשים כסובסטרטים לאנזים NCED. אנזים זה מזרז ריאקציית חמצון שבה מתבקע הקשר הכפול בעמדה 11-12 ליצירת מולקולה בעלת 25 פחמנים ( $C_{25}$ ) ומולקולה בעלת 15 פחמנים ( $C_{15}$ ), xanthoxin. ה-xanthoxin הוא סובסטרט ליצירת AB-aldehyde, שהוא חומר המוצא ל-ABA (Camara and Bouvier, 2004) (איור 1).

בארבידופיס התגלו 9 גנים המשתייכים למשפחת הגנים NCED/CCD (Tan et al., 2003). חמישה מתוכם, *AtNCED2,3,5,6,9*, הם בעלי הומולוגיה קרובה יותר לגן *vp14*, וככל הנראה מקודדים לחלבונים שמחמצנים קרוטנואידים במסלול יצירת ה-ABA. כל חמשת הגנים האלו מכילים רצף מוביל לפלסטידות, אך הם נבדלים זה מזה בסוג הרקמה שבה הם מתבטאים, במיקומם בתוך הכלורופלסט, ובגורמי הבקרה – עקות או מצבי התפתחות – המגבירים את ביטויים (Tan et al., 2003).

ארבעת הגנים הנותרים שאותרו בארבידופסיס ובצמחים נוספים היו בעלי הומולוגיה נמוכה לגנים ממשפחת *NCED*, וסווגו לתת-משפחה נפרדת על פי ההומולוגיה ביניהם (Camara and Bouvier, 2004). לקבוצת זו משתייכים הגנים *CCD1,4,7,8*. חלבונים אלה מפרקים קרוטנואידים לתוצרים שונים. חלק מהאנזימים ממשפחה זו מזרזים *in vitro* פירוק של קרוטנואידים שונים, ולחלקם יש סובסטרט ספציפי.

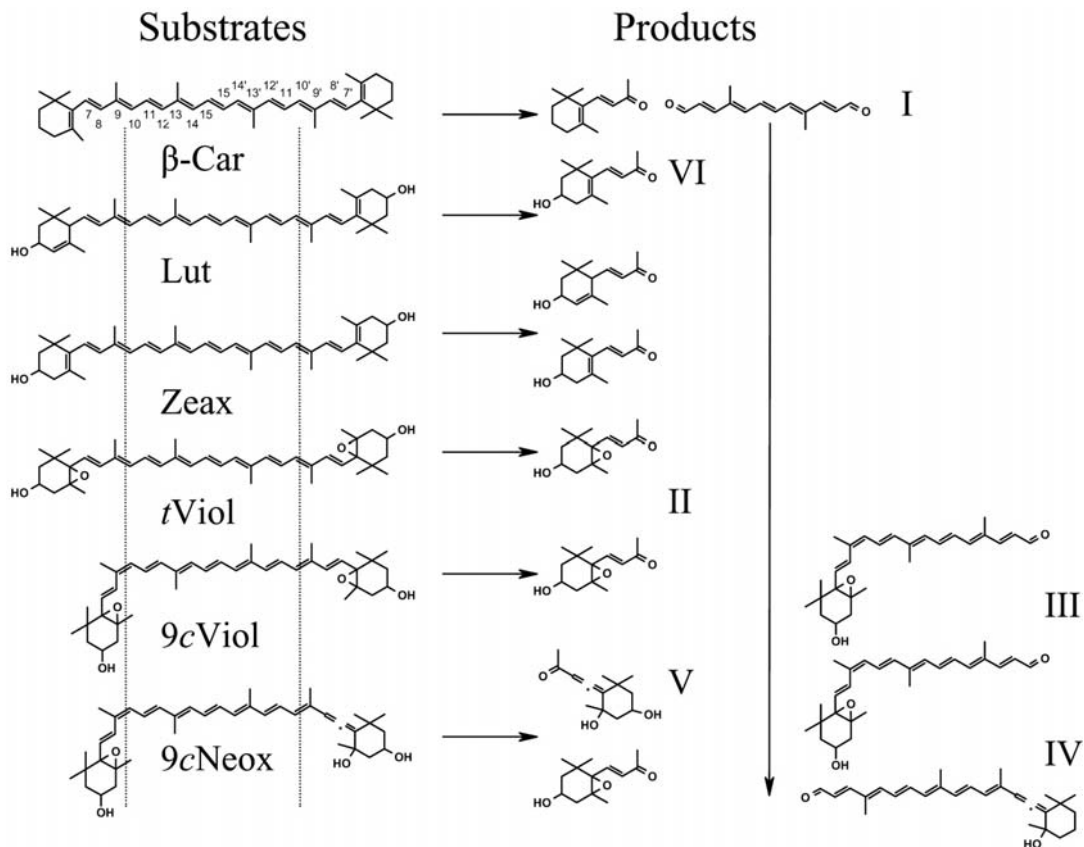
התוצרים המתקבלים מהפירוק הם תוצאה של המיקום על גבי מולקולת הקרוטנואיד בו התבצע החיתוך. במקרים רבים שנחקרו תוצרי הפירוק היו מולקולות בעלות 13 ו-14 פחמנים ( $C_{13}$  ו- $C_{14}$ ), והן מעידות על חיתוך כפול של המולקולה בשני קצותיה בין הפחמנים 9 ו-10 (איור 3). במקרים אחדים התוצרים היו של 13 ו-27 פחמנים ( $C_{13}$  ו- $C_{27}$ ), עדות לחיתוך המולקולה בקצה אחד בלבד (Camara and Bouvier, 2004). מחקרים אחרים מצאו שפירוק הקרוטנואידים יכול להתבצע בעמדות חיתוך אחרות, וחלקם מתוארים להלן. יש לציין כי חלק מהדיווחים על פעילות האנזימים מתבססים על מחקרים *in vitro*. כפי שמתברר באחרונה, בפעילות *in vivo* הן הסובסטרט והן העמדה בה הוא נחתך עשויים להיות ספציפיים (Floss et al., 2008; Rubio et al., 2008).

האנזים הציטוזולי *AtCCD1*, שבודד מארבידופסיס ושובט ב-*E. coli*, זרז *in vitro* פירוק של קרוטנואידים שונים בין הפחמנים 9 ו-10, משני קצוות המולקולה. תוצרי הפירוק היו שתי מולקולות בעלות 13 פחמנים ( $C_{13}$ ) אשר צורתן תלויה בקצוות הקרוטנואיד שפורק (איור 3) (Schwartz et al., 2001). מולקולות אלו מכונות norisoprenoids. אלו הם טרפנואידים ארומטיים הנפוצים בפרחים ובפירות. התוצר הנוסף של פירוק הקרוטנואידים על ידי *CCD1* הוא מולקולת דיאלדהיד בעלת 14 פחמנים ( $C_{14}$ ), הנגזרת מהשלד שנותר לאחר חיתוך הקצוות. תוצר זה משותף לקרוטנואידים רבים בגלל מבנה השלד המרכזי המשותף לקרוטנואידים שונים. חיזור מולקולה זו מניב את המולקולה הפלואורוסצנטית, rosafuene, שאופיינה בוורדים שונים (Schwartz et al., 2001). תוצרי פירוק אופייניים אלו נמצאו גם בצמחים נוספים.

בעגבניה, באבטיח ובהדרים הנגזרות  $C_{13}$  של פירוק הקרוטנואידים מהוות מרכיבים חשובים התורמים לריח

ולטעם הפירות (Lewinsohn et al., 2005). חומרים ארומטיים אלו אופיינו באנליזות HPLC שנערכו למיצויים צמחים אלו: במיץ תפוזים נמצא שתוצרי פירוק הקרוטנואידים תורמים לטעם ולריח האופייניים (Mahattanatawee et al., 2005); בעגבנייה ובאבטיח נמצאו החומרים  $\beta$ -ionone ו- $\beta$ -cyclocitral שהם תוצרי הפירוק של  $\beta$ -carotene, וכן geranial ו- pseudoionone שהם תוצרי פירוק של lycopene (Lewinsohn et al., 2005). ביטוי של הגן *CCD1* בפרחי פטוניה הושרה על ידי אור והשתנה לאורך שעות היממה. תוצר הפירוק,  $\beta$ -ionone, התנדף מהפרחים בעיקר בשעות היום, במקביל לשינויים ברמת הביטוי של הגן. החוקרים שיערו שפעילותו של אנזים זה בייצור נדיפים המופרשים מהצמח מותאמת לזמני הפעילות של החוקים המאביקים (Simkin et al., 2004).

אנליזה ממוחשבת העלתה שהחלבון *CCD1* בארבידופסיס אינו מכיל רצף מוביל לפלסטידות (Simkin et al., 2004). גם בחבוש (Fleischman et al., 2002), בקרמבולה (Fleischmann et al., 2003), בזעפרן (Rubio et al., 2008) ובצמחים נוספים האנזים *CCD1* נמצא פעיל בציטוזול בלבד. תוצאה זו מפתיעה, מכיוון שהסובסטרטים של האנזים הזה, הקרוטנואידים, אגורים בפלסטידות ולכאורה מוגנים שם מפני פירוק על ידי אנזימים ציטוזוליים.



**איור 3:** תוצרי פעילות *in vitro* של אנזים *CCD1* רקומביננטי עם קרוטנואידים שונים כסובסטרטים. התמונה לקוחה מתוך (Schwartz et al., 2001).

$\beta$ -Car =  $\beta$ -carotene; Lut = lutein; Zeax = zeaxanthin; *t*Viol = *trans*-violaxanthin; 9*c*Viol = 9 *cis*-violaxanthin; 9*c*Neox = 9 *cis*-neoxanthin.

האנזימים CCD8, CCD7 פועלים ברצף (Schwartz et al., 2004) בפלסטידות (Booker et al., 2004; Snowden et al., 2005) ופעילותם בשורשי ארבידופסיס מייצרת מולקולת סיגנל, strigolactone, שמדכאת פריצת ענפים צדדיים (Schwartz et al., 2004; Snowden et al., 2005; Gomez-Roldan et al., 2008). תעתיקים של גנים אלו נמצאו בכל רקמות הצמח, אך רמתם הגבוהה ביותר הייתה בשורשים. בדומה ל-CCD1, האנזים CCD7 חותך את הקרוטנואיד בין הפחמנים 9 ו-10. תוצרי הפירוק של CCD7 הם מולקולת C<sub>13</sub> ומולקולת C<sub>27</sub>. זו האחרונה עוברת חיתוך נוסף על ידי CCD8 לקבלת המולקולות C<sub>9</sub> ו-C<sub>18</sub> (Schwartz et al., 2004).

האנזים הפחות נחקר מכל המשפחה הוא CCD4. המידע שהצטבר עד כה מעיד שהאנזים הוא פלסטידי ומעורב בפירוק קרוטנואידים בין פחמנים 9 ו-10 בקצה אחד של המולקולה או בשניהם. בסריקת חלבונים מפלסטידות של ארבידופסיס נמצא החלבון ההומולוגי בפלסטוגלובולות שבכלורופלסט (Ytterberg et al., 2006). CmCCD4a פעיל בפרחי חרצית (*Chrysanthemum morifolium*), שכן בפתיחת הפרחים הגוון הצהוב נעלם במהירות מעלי הכותרת והם הלבינו, ואילו בפרחים בהם הושקת הגן *CmCCD4* הצטברו קרוטנואידים והפרחים נותרו צהובים (Ohmiya et al., 2006, 2008). בזעפרן הוצע לאחרונה שההומולוגים הפלסטידיים *CzCCD4a,b* מסוגלים לפרק β-carotene בין פחמנים 9 ו-10 בשני קצוות המולקולה (Rubio et al., 2008). במחקר שפורסם לארונה דווח על שיבוט *CCD4* מצמחים שונים, ביניהם *Rosa Damascena* (Huang et al., 2009). במחקר זה נמצא שהאנזים מחרצית, CmCCD4a, זרז *in vitro* פירוק β-carotene לתוצר הנדיף β-ionone אולם האנזים ההומולוגי מוורד, RdCCd4, לא זרז תגובה זו. למעשה, החוקרים לא הצליחו לאפיין את תוצר הפעילות של CCD4 בוורדים.

על סמך הדיווחים שתוארו לעיל, ניתן לשער שקיימים אופני פירוק שונים של קרוטנואידים:

1. בתאים מרקמות בהן לא חלה ירידה משמעותית בצבע, כגון בעגבנייה, באבטיח ובהדרים, הפירוק נעשה בציטוזול על אחוז קטן מאד מכלל הקרוטנואידים. הפירוק מזורז על ידי האנזים הציטוזולי CCD1 ומניב את התוצרים הנדיפים האופייניים (Simkin et al., 2004).

2. במקרים בהם מתרחש פירוק מאסיבי של קרוטנואידים המוביל לשינוי משמעותי בצבע, יש צורך במגע תוך-פלסטידי ישיר בין הקרוטנואידים לאנזים המזרז את פירוקם. כך בדוגמאות של פרחי חרצית וזעפרן וכן מפירוק קרוטנואידים המושרה ע"י מיקוריזה בשורשי אספסת. בחרצית - האנזים CmCCD4a שמזרז פירוק מואץ של הצבע הצהוב מכיל פפטיד מוביל לפלסטידות (Ohmiya et al., 2006). בזעפרן - האנזים הפלסטידי CsZCD מזרז את הפירוק של zeaxanthin בכרומופלסט בין פחמנים 7 ו-8 משני קצוות המולקולה. תוצר הפירוק, המולקולה crocetin בעלת הצבע האדום, עובר גליקוזילציות ומובל אל תוך חללית התא (Bouvier et al., 2003). בשורשי אספסת, *Medicago trunculata*, הגוון הצהוב מתקבל מפירוק ראשוני של הקרוטנואידים למולקולות C27 ו-C13 אשר מתבצע בתוך הפלסטידות על ידי אנזים פלסטידי, כנראה CCD4 או CCD7. התוצר C27 עובר גליקוזילציה ומובל אל הציטוזול שם הוא נתון לפירוק נוסף על ידי האנזים CCD1 (Floss et al., 2008).

לאור זאת נראה, שאין לפסול את האפשרות שגם בעגבנייה, באבטיח בהדרים ובדומיהם מתקיים פירוק ראשוני בפלסטידות, אלא שהאנזים הפלסטידי טרם אותר.

## 8. פיגמנטים, שינויי צבע ופירוק קרוטנואידים בוורדים

ורדים מכילים אנתוציאנינים או קרוטנואידים בעלי הכותרת, ולעיתים צבע עלי הכותרת הוא שילוב של שני

סוגי הפיגמנטים. דהייט צבע הפרח במהלך חיי האגרטל היא תופעה נפוצה בזני ורדים שונים. דהייח זה מתחילה במהלך פתיחת ראש הפרח והיא מקדימה את התופעות האופייניות להזדקנות כגון הכמישה. כפי שתואר בסעיף 2.2, כאשר הפיגמנטים בעלי הכותרת הם אנתוציאנינים, שינויי צבע במהלך פתיחת הפרחים עשויים להיגרם כתוצאה מעלייה ב-pH של חללית התא. למשל, בזן הוורדים האדום 'Better-Times' עלייה של מעט יותר מחצי יחידת pH במוהל התא של עלי הכותרת גרמה להופעת גוון כחול בפרחים (Eugster and Märki-Fischer, 1991).

שינויי צבע בפרחי ורדים המכילים קרוטנואידים הנובעים מפירוק אנזימטי כמעט ולא נחקרו עד עתה. מחקרם המקיף של Eugster ו-Märki-Fischer (1991) על פיגמנטים בעלי כותרת של פרחי ורדים הקדים בכמעט שני עשורים את הדיווחים הראשונים על האנזימים ממשפחת ה-CCD. אף על פי כן, השערותיהם על אופן חיתוך הקרוטנואידים התאמתו כמעט במלואן עם השנים.

במאמר המסכם את עבודתם משנות ה-70 וה-80 של המאה הקודמת (Eugster and Märki-Fischer, 1991) מתוארים 15 תוצרי פירוק שונים של קרוטנואידים בוורדים. החוקרים מצאו אפוקרוטנואידים בעלי 14 ו-13 פחמנים ( $C_{13}$ ,  $C_{14}$ ,  $C_{27}$ ) בזני ורדים שונים. בין האפוקרוטנואידים המתוארים נמצאה המולקולה *sinensianthrin* בעלת 27 פחמנים ( $C_{27}$ ), שהיא תוצר הפירוק של *violaxanthin*. המולקולה נפוצה גם בפירות ומאופיינת בצבע צהוב בהיר, כדוגמת צבע ציפת הפרי בתפוחים מזן 'גולדן דליש'. בנוסף, החוקרים איתרו בוורדים שונים את המולקולה *rosaflluene* ( $C_{14}$ ). כאמור, מולקולה זו בעלת 14 פחמנים נגזרת מהשלד המרכזי, הלינארי, של קרוטנואידים שונים. בנוסף לכך, החוקרים ריכזו נדיפים מוורדים שונים ובאנליזות GC-MS מצאו 8 מולקולות נדיפות שונות בעלות 13 פחמנים ( $C_{13}$ ), אשר המבנה הכימי שלהם התאים לקצוות קרוטנואידים שונים אשר שימשו כסובסטרטים לפירוק (Eugster and Märki-Fischer, 1991).

מניתוח התוצרים שהתקבלו שיערו החוקרים, שבוורדים מתקיים חיתוך אנזימטי של הקרוטנואידים בין פחמנים 9 ו-10 משני קצוות המולקולה. נפוצות המולקולה האחת, *rosaflluene* ( $C_{14}$ ) בוורדים שונים לעומת מגוון המולקולות בעלות 13 פחמנים ( $C_{13}$ ), הובילו את החוקרים להשערה שקיים אנזים אחד המסוגל לחתוך קרוטנואידים שונים בשני שלבי חיתוך על פי הנוסחה הבאה:



דגם זה, המציע חיתוך מדורג של הקרוטנואידים לא אומץ על ידי רוב החוקרים בגלל שהמחקרים הרבים שבוצעו על האנזים CCD1 הצביעו על כך שבפעילות *in vitro* האנזים מסוגל לחתוך את מולקולת הקרוטנואיד משני קצותיה בו זמנית.

כפי שצויין לעיל, המודל המעודכן ביותר מציע שחיתוך הקרוטנואידים הוא אכן מדורג ונעשה בשני שלבים. מודל זה חוזר במידה רבה לגישתם של Eugster ו-Märki-Fischer, אך בשונה מהם, המודל מתבסס על פעילותם של שני אנזימים – הראשון פלסטידי (CCD4 או CCD7) והשני ציטוזולי (CCD1).

הדיווח הראשון על קיומם של אנזימים ממשפחת CCD בוורדים הופיע רק לאחרונה (Huang et al., 2009). בדיווח זה צויין שהגן *RdCCD4* מתבטא בעיקר בפרחים בעוד שבשאר איברי הצמח ביטוי נמוך עשרות מונים. החוקרים מצאו שהאנזים זרז *in vitro* את הפירוק של 8'-apo-β-caroten-8'-al אבל לא את הפירוק של *cis-ξ-carotene*, *β-carotene*, *lycopene*, *zeaxanthin*. החוקרים שיערו ש-*RdCCD4* אינו מזרז את ייצור β-ionone בפרחים, והוסיפו שתפקידו הביולוגי של CCD4 בפרחים אינו ברור.

פרחי ורדים צהובים מזן 'גולדן גייט' מכילים פיגמנטים קרוטנואידים (Shalit et al., 2004). בפרחים אלו צבע

עלי הכותרת נותר יציב במשך רוב חיי האגרטל ודוהה רק לקראת סופם. באנליזת נדיפים מעלי הכותרת של זן זה לא נמצאו תוצרי הפירוק האופייניים שתוארו לעיל (Shalit et al., 2004). לעומת זאת, בזני ורדים צהובים אחרים, כגון 'פריסקו', קיימת ירידה חדה בעוצמת הצבע ובתכולת הקרוטנואידים בפרחים במהלך חיי האגרטל (Meir et al., 1998; Glick et al., 2007).

## ב.9. תגובת צמחים לחומצה יסמונית או מתיל יסמונט והשפעת ההורמון על הקרוטנואידים

חומצה יסמונית (JA) והמתיל אסתר הנדיף שלה, מתיל יסמונט (MJ), הם הורמונים צמחיים המווסתים תהליכי התפתחות ותגובות הגנה כנגד עקות בצמחים (Howe, 2004). מולקולת המקור לייצור JA היא חומצה אלפא לינולנית ( $\alpha$ -linolenic acid), שהיא חומצת שומן המצויה בממברנות צמחיות. המולקולה משתחררת מהממברנה על ידי ליפאז ומשמשת כסובסטרט לסנתזת JA במסלול ה- octadecanoid (Howe, 2004). האנזימים המרכזיים במסלול הביוסנתזה של JA הם: AOC (allene oxide cyclase), AOS (allene oxide synthase), LOX (lipoxygenase). אנזימים אלו נמצאים בפלסטידות (Ytterberg et al., 2006; Wasternack, 2007). החלבון AOS נמצא בתוך פלסטוגלובולות בכלורופלסטים שבעלי ארבידופסיס (Ytterberg et al., 2006).

JA מעורב בתגובות הגנה בצמח כנגד טווח רחב של פתוגנים (Thaler et al., 2004). טיפול משולב של ריסוס והטענה ב-MJ, שניתן לורדים קטופים מזנים שונים הגביר את עמידות הפרחים לפטרייה (*Botrytis cinerea*) (Meir et al., 1998). תגובות דומות לעיבוד התפתחות פטריית הבוטריטיס ו/או פתוגנים נוספים באמצעות MJ נמצאו גם בגפנים (Girault et al., 2008) ובארבידופסיס (Thomma et al., 2000). התגובה ל-JA מתבטאת בעליה של אנזימי הגנה שונים, ביניהם מעכבי פרוטאזות (Farmer et al., 1992). במחקרים גנומיים נמצא כי מתן טיפול ב-MJ לתרבית תאי טבק (Goossens et al., 2003) ולצמחי ארבידופסיס (Schenk et al., 2000; Mahalingam et al., 2003) גרם לשינויים משמעותיים בביטוי גנים במסלול מעבר האות של JA, ולייצור מגוון רחב מאוד של מטבוליטים משניים, שחלקם קשורים למסלולי הגנה כנגד עקות שונות בצמח.

עקות ביוטיות וא-ביוטיות שונות עשויות להגביר את כמות המחמצנים (ROS) בצמח. דוגמאות למעורבות JA בתגובת הצמח כנגד נזקי חמצון נמצאו במערכות שונות: טיפולים ב-JA הפחיתו תמותת תאים המושרית על ידי  $O_3$  בצמחי ארבידופסיס (Rao et al., 2000); טיפול JA שניתן לנבטי ארבידופסיס השרה את תעתוק הגן ל- glutathione peroxidase (Rodriguez-Milla et al., 2003), אנזים המשתתף בתגובות הגנה תאיות כנגד חמצון ע"י ROS; טיפול ב-MJ שניתן לחסה (*Lactuca sativa* L.) הגביר את הפעילות נוגדת החמצון על ידי העלאת רמתו של מרכיב פנולי בעלים, וגם מנע את פירוק הקרוטנואידים בעלים (Kim et al., 2007). השערת החוקרים הייתה ש-  $H_2O_2$  הוא שליח משני בתיווך תגובת הצמח ל-JA (Rodriguez-Milla et al., 2003).

חלק מהתהליכים המבוקרים בצמח על ידי JA כוללים עיכוב צמיחת שורשים ונצרים (Howe, 2004), עלייה ברמת האנתוציאנינים, ירידה בתכולת הכלורופיל ולעיתים גם בתכולת הקרוטנואידים ברקמות מטמיעות, וכן הזדקנות מואצת (Perez et al., 1993, 1997). תופעות אלו הובילו להשערה של- JA יש תפקיד התפתחותי בתהליכי ההזדקנות. השערה זו נתמכת ע"י הדיווחים המראים שיישום JA בארבידופסיס גרם להזדקנות מוקדמת של העלים, וכן נמצא שהרמה האנדוגנית של JA עולה בהזקנות (He et al., 2002). גם יישום MJ בפרחי פטוניה וסחלבי דנדרוביום האיץ את הזדקנות הפרחים באמצעות הגברת רמת האתילן (Porat et al., 1993).

הנתונים לעיל מצביעים על כך שבדומה לאתילן, גם JA יכול להגביר תהליכי הזדקנות מחד, ומאיךך להפעיל מערכות הגנה בצמח. נראה שכיוון הפעילות של JA מושפע מהריכוזים, מסוג הרקמה ומהתנאים בצמח, וכן מנוכחות של סיגנלים הורמונליים נוספים. מחקרים רבים מצביעים על הבקרה המשולבת של JA ואתילן בתגובות הגנה שונות בצמח. דוגמה בולטת אחת היא גורם השיעתוק Ethylene Response Factor1 (ERF1) המופעל הן על ידי JA והן על ידי אתילן (Lorenzo et al., 2003). לעומת זאת, מחקרים אחרים מצביעים על השפעות מנוגדות של אתילן ו-JA. למשל, התגובה לאוזון בארבידופסיס המתבטאת בתמותת תאים כתוצאה מהגברת המחמצנים ברקמה, מוגברת באמצעות אתילן, בעוד ש-JA מדכא את התגובה לאתילן ומגן על הרקמה מפני תמותה (Tuominen et al., 2004).

השפעת JA ו-MJ על יצירת צבענים ידועה בעיקר בהקשר לאנתוציאנינים (Tamari et al., 1995), אבל ידועה גם ההשפעה של JA על יצירת טרפנים (Goossens et al., 2003), שהם חומרי מוצא לקרוטנואידים. במקרים מסוימים אף נמצא קשר ישיר בין JA ליצירת קרוטנואידים: בהבשלת פירות מנגו טיפול ב-MJ הגביר את הצבע הצהוב והאדום (González-Aguilar et al., 2001), בהבשלת עגבניות (Czapski and Saniewski, 1995) ובתפוחים (Perez et al., 1993) MJ הגביר את הסינתזה של  $\beta$ -carotene, ובתפוחי אדמה JA הגביר את כמות ה-antheraxantin (Kovac and Ravnkar, 1994). טיפול MJ שניתן לתאי טבק BY2 גרם להאטה בצמיחה ולהעצמת צבע התאים מצהוב בהיר לגוון כתום (Goossens et al., 2003). בעלי חסה, כאמור, טיפול MJ מנע את פירוק הקרוטנואידים (Kim et al., 2007). בוורדים קטופים אשר טופלו ב-MJ לצורך הגברת העמידות כנגד *Botrytis cinerea*, נמצא שכתוצאה מהטיפול בחלק מהזנים הוגבר צבע הפרחים ועוכבה הדהייה האופיינית (Meir et al., 1998; Glick et al., 2007). עד כה, לא נמצאו בספרות עדויות נוספות למעורבות של JA או MJ בעידוד יצירת קרוטנואידים בפרחים ולא למעורבותם בעיכוב הפירוק של קרוטנואידים.

## ב.10. הנחת העבודה

הנחת העבודה שלנו היא שבעלי הכותרת של ורדים קטופים מתקיימים תהליכים מקבילים של יצירה ופירוק קרוטנואידים במהלך חיי האגרטל. שינויי הצבע שחלים במהלך חיי האגרטל נובעים משינוי העוצמה היחסית של תהליכי היצירה והפירוק של הקרוטנואידים, וכתוצאה מכך צבע הפרחים דוהה. ייצור הקרוטנואידים בזן 'פריסקו' מבוקר ברמה המולקולארית, ופירוק הקרוטנואידים נובע מחמצון אנזימטי שלהם באמצעות אנזים פלסטידי (CCD), ומותנה בהריסת מידור הקרוטנואידים בתוך הכרומופלסטידות. הטיפול ב-MJ מגביר את עוצמת הצבע באמצעות השפעה על כל אחד משלבי הייצור, המידור או הפירוק. מטרת העבודה הייתה לבחון את ההנחה לגבי ייצור, פירוק ומידור הקרוטנואידים, לברר היכן מתרכזת השפעת ה-MJ על תהליכים אלה ומהו אופן ההשפעה.

## ב.11. מטרת המחקר

1. אפיון תכולת הקרוטנואידים והרכבם בעלי הכותרת של פרחי ורדים מזן 'פריסקו' במהלך חיי האגרטל, והגדרת ההשפעה של הטיפול ב-MJ על התכולה וההרכב.
2. בחינת ביטוי גנים המקודדים לאנזימים במסלול הביוסנתזה של קרוטנואידים בעלי הכותרת של ורדים צהובים במהלך חיי האגרטל, ובחינת ההשפעה של MJ על הביטוי של גנים אלו.



3. איתור גנים נוספים הקשורים ליציבות ופירוק קרוטנואידים אשר רמת ביטויים משתנה כתוצאה מהטיפול ב-MJ, ובחינת הקשר בינם לבין העצמת הצבע.
4. בחינת ההנחה שדהיית הצבע בוורדים הצהובים באגרטל נובעת מפירוק הקרוטנואידים כתוצאה מתהליכי חמצון בכרומופלסטידות שבהם מעורב האנזים CCD, ובחינת השפעת הטיפול ב-MJ על תהליכים אלו.

## ג. שיטות המחקר

### ג.1. טיפולים בפרחים

**החומר הצמחי:** פרחי ורדים מהזנים: 'פריסקו' ('Frisco'), 'גולדן גייט' ('Golden Gate'), 'פרופיטה' ('Prophyta'), 'ג'אז' ('Jazz'), 'רד צ'ארם' ('Red Charm'), 'מרסדס' ('Mercedes'), 'שרי ברנדי' ('Cherry Brandy'), 'ספארי' ('Safari'), 'בוונזה' ('Bonanza') ו'פרגרנט קלאוד' ('Fragrant Cloud') הובאו ממגדלים מסחריים במהלך היממה הראשונה שלאחר הקטיף.

**טיפול ב-MJ:** החומר MJ נקנה מחברת סיגמה והועבר לחברת האחים מילצ'ן לשם הפיכתו לתכשיר מסיס במים (TOG-MJ) על ידי המסתו ב- 5% אגרל ו- 5% Triton X-100. התכשיר יושם בוורדים קטופים באמצעות טיפול משולב של ריסוס עלי הכותרת בריכוז סופי של 500  $\mu\text{M}$  MJ והטענה בריכוז סופי של 350  $\mu\text{M}$  MJ למשך 24 שעות (Meir et al., 1998). פרחי הביקורת טופלו באותו אופן, אך ללא הוספת MJ לתמיסות הטיפול, כלומר – ריסוס והטענה בממסים של תכשיר ה- TOG-MJ.

**טיפול MJ נוספים:** הפרחים רוססו בתמיסת MJ 500  $\mu\text{M}$  או בממסים של תכשיר ה- TOG-MJ (ביקורת) במועדים נוספים במהלך חיי האגרטל: לאחר 24 שעות מהריסוס הראשון, וכן לאחר 24 ו- 48 שעות מהריסוס הראשון. **יישום נורפלורזון (NF):** נורפלורזון 80% התקבל מחברת האחים מילצ'ן. הפרחים רוססו ביום 0 או ביום 2 ב- NF בריכוז של 0.04 mM חומר פעיל והוטענו בתמיסה זו למשך 24 שעות ב- 20 מ"צ.

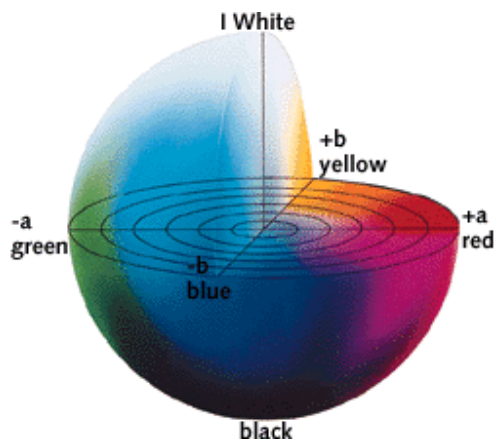
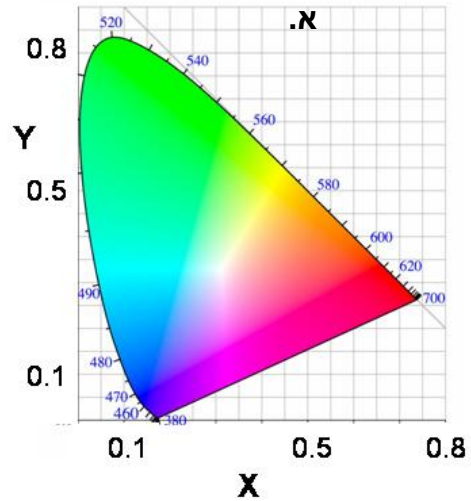
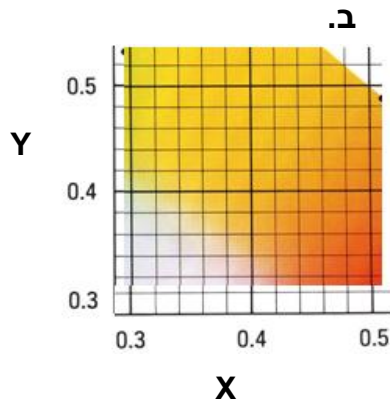
בתום כל אחד מהטיפולים שתוארו לעיל הפרחים הועברו לאגרטלים עם תמיסת כלורין אורגני - Sodium dichloroisocyan-urate (תכשיר מסחרי TOG-6, מחברת אחים מילצ'ן) בריכוז של 50 ח"מ, והוצבו בתנאים המבוקרים של חדר התצפית (20 מ"צ, לחות יחסית של 60-70%, פוטופריודה של 12 שעות והארה בעוצמה של 14 מיקרואינשטיין) למעקב אחר מדדי איכות שונים במהלך חיי האגרטל.

**הדגרה באווירה של חמצן נמוך:** פרחי ורדים מהזן 'פריסקו' הובאו מהמגדל בשלב קטיף מסחרי והוצבו באגרטלים עם תמיסת TOG-6 בריכוז של 50 ח"מ ב- 20 מ"צ למשך 24 שעות. לאחר היממה הראשונה הפרחים הודגרו באגרטל עם אותה התמיסה באור פלואורסצנטי רציף ב- 20 מ"צ בתאי אווירה מבוקרת, שאליהם הוזרמו גזים ליצירת אווירה בעלת ריכוז חמצן נמוך ( $0.5\% \text{CO}_2$ ,  $97.5\% \text{N}_2$ ,  $2\% \text{O}_2$ ) למשך 9 ימים. פרחי הביקורת הודגרו במקביל באותם תנאים אך באוויר רגיל.

**מדדי איכות:** כמישה, הזדקנות, קוטר ראש הפרח, משקל טרי ויבש של ראש הפרח ועוצמת צבע (כמפורט להלן).

### ג.2. מדידות של עוצמת הצבע

מדידה כמותית של עוצמת הצבע הצהוב בעלי הכותרת בוצעה במכשיר קולורימטר מסוג Minolta CR-300 עם מעבד נתונים Minolta DP 301. התוצאות מוצגות כקואורדינטות X,Y על מערכת צירים המתבססת על ערכי X,Y,Z tristimulus עם צבעי היסוד אדום-כחול-ירוק על פי לוח הצבעים CIE color space (איור 4א, ב'), או כקואורדינטות a,b על מערכת צירים תלת-מימדית על פי לוח הצבעים CIE-L\*a\*b\* color space, שבה הגוונים a,b מיוצגים בצירים X,Y והבהירות, L, מיוצגת בציר Z (איור 4ג) (Clydesdale, 1978).



ג.

**איור 4: לוחות הצבעים ומערכות הצירים ששימשו למדידת עוצמת הצבע במכשיר מינולטה.**  
 א. מערכת צירים X,Y המתבססת על ערכי X,Y,Z tristimulus. אורכי הגל מצויינים בכחול בהיקף של ספקטרום הצבעים.  
 ב. הגדלה של האזור במערכת הצירים שבו מופעים הצבעים צהוב-לבן-כתום המצויים בעלי הכותרת.  
 ג. מערכת הצירים של CIE-L\*a\*b\* color space.

ג.3. זיהוי סוג הפיגמנט בעלי הכותרת של ורדים

לצורך זיהוי סוג הפיגמנטים המצוי בעלי הכותרת של ורדים מזנים שונים, ביצענו הפרדה שלהם ממיצוי עלי הכותרת בהתבסס על מידת ההידרופוביות השונה של הפיגמנטים. עלי כותרת כתושים הושרו באצטון עד למיצוי הצבע הצהוב. המיצוי עורבב עם כלורופורם, הודגר וסורכז להפרדת הפאזות. בתום הסרכוז נבחן האם הצבע הצהוב נמצא בפאזה ההידרופילית (אופייני לאנתוציאנינים) או בפאזה ההידרופובית (אופייני לקרוטנואידים).

#### ג.4. מיצוי וקביעת ריכוז הקרוטנואידים

עלי כותרת שנדגמו בניסויים השונים הוקפאו ב-20 מ"צ עד לבדיקה. העלים נדגמו מדורים שונים לפי ההגדרות הבאות: דור חיצוני = עלי כותרת 1-4; דור אמצעי = עלי כותרת 9-12; ודור פנימי = עלי כותרת 18-21. בחלק מהניסויים נבדקה תכולת הקרוטנואידים הכללית בעלי כותרת מספר 5-7 המייצגים שילוב של הדורים האמצעיים והחיצוניים בפרחים.

העלים נכתשו וטולטלו בתמיסת אצטון 80% עד למיצוי הצבע מהכתש לתמיסה. קביעת רמת הקרוטנואידים היחסית ברקמה נעשתה בספקטרופוטומטר באורך גל של 441 ננומטר (Wellburn, 1994).

קביעת ריכוז הקרוטנואידים במדגם שקול של רקמה ממנה בוצע המיצוי נעשתה על פי הצבה בנוסחת

Beer-Lambert:

$$\text{Concentration} = \text{Absorbance} / \varepsilon \quad \text{נוסחה 2:}$$

$$\varepsilon = \text{קבוע בליעה מולרי (} \frac{1\%}{1\text{cm}} \text{A)}; \text{ ערך משוער לקרוטנואידים} = 2500.$$

#### ג.5. הפרדת הקרוטנואידים וזיהויים

**הפרדת הקרוטנואידים וזיהויים בעלי כותרת של ורדים מזן 'פריסקו':** ההפרדה והזיהוי בוצעו במעבדתו של פרופ' יוסף הירשברג, בפקולטה למדעים של האוניברסיטה העברית, גבעת רם, ירושלים.

הקרוטנואידים מוצו באצטון מכתש קפוא של 3 עלי כותרת מספר 5-7. האצטון נודף תחת זרם חנקן גזי והקרוטנואידים הורחפו ב-diethylether ועברו ספוניפיקציה עם KOH למשך הלילה ב-4 מ"צ. בתום הספוניפיקציה בוצעה הפרדת פאזות באמצעות הוספת NaCl 1N (v/v) 20%. הפאזה ההידרופובית שהכילה את הקרוטנואידים נודפה תחת זרם חנקן גזי והורחפה ב-1 מ"ל אצטון (Ronen et al., 1999).

דגימה של 40 µl מהתמיסה הוזרקה למכשיר HPLC מסוג Waters 600 המצויד בקולונה בעלת המאפיינים הבאים: SPHERISORB 5 ODS 1 (silica 5 µm, 250 mm- 4.6 mm) (Phenomenex®).

הפאזה הנוזלית הוזרמה בקצב של 1 מ"ל לדקה. השיאים נחשפו בעזרת גלאי מסוג Waters 996 photodiode array detector. שטחי השיאים וחלקם היחסי מתוך כלל החומר המופרד התקבלו מתוכנת Waters Millennium. הקרוטנואידים זוהו על פי התאמת זמן הדחיקה (retention time) וספקטרום הבליעה שלהם לאלה של סטנדרטים ידועים.

**טבלה 1:** הרכב הממס במהלך ההרצה במכשיר HPLC להפרדת הקרוטנואידים בעלי כותרת מזן 'פריסקו'.

Time (min)	% MeCN:H <sub>2</sub> O (1:9)	% Ethyl Acetate
0	95	5
1	95	5
10	80	20
14	2	98
30	2	98

## הפרדת הקרוטנואידים וזיהויים בעלי כותרת של ורדים מ'זן גולדן גייט': ההפרדה והזיהוי בוצעו במעבדתו של

ד"ר יעקב תדמור, במרכז המחקר נווה יער של מינהל המחקר החקלאי.

כתש קפוא של 3 עלי כותרת מספר 5-7. טולטל בחושך בתמיסת [50:25:25 (v/v)] hexane:acetone:ethanol עד למיצוי הצבע. התמיסה הצבעונית עברה ספוניפיקציה ב- 8% KOH (w/v) (5 דקות בטמפרטורת החדר) ושני שלבי הפרדת פאזות בהקסאן. לאחר מכן נודפה הפאזה ההידרופובית הצבעונית. המשקע הורחף ב- 400 µl מתמיסת הפאזה הנוזלית [45:5:50 (v/v)] acetonitrile:methanol:dichloromethane (Lewinsohn et al., 2005), ודגימה של 40 µl הוזרקה למכשיר HPLC מסוג Waters model 2690, המצויד בקולונה בעלת המאפיינים הבאים: C18 Nova-Pak, Waters 996 מסוג Waters 996 (250- 4.6 mm i.d.; 60 A°; 4 mm). הקרוטנואידים השונים נחשפו בעזרת גלאי מסוג Waters 996 photodiode array detector. הקרוטנואיד β-carotene זוהה על פי זמן הדחיקה וספקטרום הבליעה האופייניים לו.

## ג.6. אנליזת LC/MS

אנליזת LCMS בוצעו על מיצוי קרוטנואידים מהזן 'פריסקו' כמתואר בסעיף 5.5, במכשיר Agilent 1200 rapid resolution HPLC system עם גלאי UV/Visible וגלאי מסה Agilent 6410 triple quad mass selective detectors. לאנליזה של המיצויים ב- ESI electrospray ionization (ESI) הופעל מקור יונים חיוביים על פי המדדים הבאים: מתח הקולונה (capillary voltage) - 5000 V, טמפרטורת הגז - 350 מ"צ, זרם הגז - 10 ליטר לדקה, לחץ מערבול - 40 psi, מתח ה- fragmentor - 140 V. אנליזת MS/MS בוצעה ב- 15 eV, עם חנקן כגז מוליך (collision gas). ביציאה מהקולונה הוספה לדוגמה תמיסת 2% formic acid במתאנול בזרם של 0.15 מ"ל לדקה להגברת הפרוטונציה ב- ESI. כרומוטוגרמת UV התקבלה מההרצה במכשיר זה על פי התנאים שצויינו בסעיף 5.5. פרט לכך שקצב הזרימה היה של 0.4 מ"ל לדקה.

## ג.7. שיטות עבודה מולקולאריות

ככלל, העבודה המולקולאריות נעשתה בשיטות המקובלות, המבוססות על Sambrook et al., 1989. **הפקות RNA:** עלי כותרת מספר 5-8 מפרחים מטופלים ומפרחי הביקורת הוקפאו במועדים שונים לאחר מתן הטיפול ב- MJ ובמהלך חיי האגרטה. העלים נכתשו בחנקן נוזלי, עברו פירוק בבופר שכלל: 0.1M Tris, 0.025M EDTA, 2N NaCl, 2% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), 2% polyvinylpyrrolidone (PVP), 2% β-mercaptoethanol, ושני שלבי ניקוי ב- chloroform:isoamylalcohol (24:1, v/v). תמיסת חומצות הגרעין המתקבלת הושקעה בהדגרה למשך הלילה ב- 3M LiCl והורחפה במים (Gasic et al., 2004). ה-RNA הופק מהתמיסה בעזרת קולונה של חברת סיגמה (RNeasy mini kit) על פי הוראות היצרן, או בהשקעה אתאנולית על פי השיטות המקובלות (75% אתאנול + סודיום אצטט 15 mM, pH = 5.5).

**ייצור cDNA:** ה-RNA המופק טופל ב- DNase I, Promega) ושימש כ- template בריאקצית Reverse transcription ליצירת cDNA (M-MLV Reverse Transcriptase, Promega) עם תערובת של תחלים, Random Hexamers ו-Oligo dT (Promega).

**שיבוטים:** לכל אחד מהגנים שיועדו לשיבוט תוכננו שני זוגות תחלים, חיצוניים ופנימיים, על בסיס הומולוגיה לגנים אלו מצמחים שונים. התחלים סונתזו בחברת 'סינתזה' (ירושלים) (טבלה 2) ושימשו בשילובים שונים בריאקציית Touch-Down PCR עם cDNA template מעלי כותרת של ורדים מזן 'פריסקו'. ככלל, פרוטוקול הריאקציות בוצע כמפורט להלן: דנטורציה ראשונית ב- 94 מ"צ ל- 2 דקות, עשרה סבבי 'touch-down' בהם הולכת ויורדת טמפרטורת ה-annealing ושלושים סבבים של 94 מ"צ ל- 20 שניות, 64-57 מ"צ (בהתאם לתחלים השונים) ל- 20 שניות ו- 72 מ"צ ל- 30 שניות. בתום ההגברה בוצע שלב הארכת קצוות סופי ב- 72 מ"צ למשך 5 דקות. הריאגנטים והאנזים לריאקציה ה"ל נלקחו מערכת Ampliqon Taq DNA Polymerase Master Mix RED שנרכשה מחברת Genetech R&D.

הגן *RhCCD1* שבודד מעלי כותרת של ורדים (*Rosa hybrida*) מזן 'פריסקו' הוגבר בריאקציה כפולה שבה תוצרי הריאקציה עם התחלים החיצוניים היוו template לריאקציה שנייה עם זוג התחלים הפנימיים (nested). תנאי הריאקציה היו כמתואר לעיל, פרט לכך שטמפרטורות ה-annealing עם התחלים החיצוניים והפנימיים היו 54.5 ו- 50.9 מ"צ, בהתאמה.

כאשר התקבל תוצר PCR נקי שהתבטא בפס יחיד בגודל הצפוי, הוא אוחה עם הפלסמיד המסחרי pGEM-T (Promega) Easy, שובט בתאי JM-109 (Promega) ונשלח לריצוף בחברת Danyel Biotech. תוצאות הריצוף הושו למאגרי המידע הקיימים בתכנת BLASTx באתר <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

**ריצוף אזור קצה '5 של הגנים *RhCCD4*, *RhCCD1*:** בהמשך העבודה שובטו קצות '5 של הגנים ה"ל, שבודדו מעלי כותרת של ורדים (*Rosa hybrida*) מזן 'פריסקו', עפ"י ההומולוגיה שלהם לגנים המקבילים מ- *Rosa Damascena* אשר פורסמו במאגרי המידע.

מקטעי הגנים *Phytoene Synthase*, *ζ-Carotene Deasturase*, *Violaxanthin De-epoxidase* נלקחו מספריית הגנים מעלי כותרת של ורדים (Guterman et al., 2002), שפותחה במעבדתו של פרופ' אלכסנדר וינשטיין בפקולטה לחקלאות ברחובות.

**טבלה 2: רצף התחלים ששימשו לשיבוט גנים הקשורים לביוסינתזה או פירוק קרוטנואידים.**

שם הגן	רצף התחלים
<i>Lcy-b 5'</i>	TGCTTGATTGCCTCGACACTACCT
<i>Lcy-b 3'</i>	CTTGAATTGTGACGCCATCGTTGC
<i>Pds 5'</i>	ACCATACTGCTGGAAGCAAGAGA
<i>Pds 3'</i>	TCCACCAAGAATTGCTGGCACAAG
<i>RhCCD1 5'</i>	GTTYGAYGGNGAYGGNGA
<i>RhCCD1 3'</i>	GCRAARTCRTGCATCATDA
<i>RhCCD1 nested 5'</i>	ATYAARGATGGVAAAGCD
<i>RhCD1 nested 3'</i>	TTBGGRTGRGCHGTRAA
<i>RhCCD4 5'</i>	TACCAYYTVTTCGACGG
<i>RhCCD4 3'</i>	TTDGGRTGMGCMGTAT

**אנליזת (sqRT-PCR) Semi-quantitative RT-PCR:** השפעת הטיפול ב- MJ על ביטוי גנים נבחנה באנליזת

sqRT-PCR באמצעות השוואה איכותית של עוצמת הפסים המתקבלים מריאקציות PCR שבוצעו במקביל עם cDNA template, שבודדו מעלי כותרת של פרחי ביקורת ופרחים מטופלים ב-MJ במועדים שונים במהלך חיי האגרסל. ריאקציות כיוול מקדימות לקביעת מספר הסבבים בריאקציה בוצעו לכל אחד מזוגות התחלים בנפרד (טבלה 3). אחידות ה-cDNA בין הדוגמאות השונות הושגה באמצעות השוואת עוצמת הפסים בריאקציית PCR שבוצעה במקביל עם תחלים ממקטע 17S הריבוזומלי השמור בין צמחים רבים.

**בניית ספריית הפחתה:** ספריית הפחתה לגנים בעלי כותרת המושפעים מהטיפול ב-MJ נבנתה באמצעות הערכה PCR-Select cDNA subtraction kit (Clontech) על פי הוראות היצרן. דגימות RNA מעלי כותרת מפרחים מטופלי ופרחי ביקורת נלקחו בשעות 2, 4, 8, 16, 24 ו-48 ממתן הטיפול ב-MJ. דוגמאות ה-RNA מכל קבוצת טיפול אוחדו ושימשו ליצירת cDNA להפחתה.

**טבלה 3: רצפי התחלים ששימשו בריאקציות sqRT-PCR לאנליזה של גנים הקשורים לביוסיתתזה או פירוק של קרוטנואידים.**

שם הגן	רצף התחלים
<i>Lcy-b</i> 5'	TGCTTGATTGCCTCGACACTACCT
<i>Lcy-b</i> 3'	CTTGAATTGTGACGCCATCGTTGC
<i>Pds</i> 5'	ACCATACTGCTGGAAGCAAGAGA
<i>Pds</i> 3'	TCCACCAAGAATTGCTGGCACAAG
<i>Psy</i> 5'	TATGTCTGGTGTCTCTTTG
<i>Psy</i> 3'	TCCGCTCTGGTGTGATAAG
<i>Zds</i> 5'	ATGCCTGCAGGCCTTGCAAT
<i>Zds</i> 3'	AGCCTTGCGATGATGGGAA
<i>VEP</i> 5'	AACGGATAATACTTGCGGGCCTGA
<i>VEP</i> 3'	AGCTTCCGAAGAGGAAGTGTTCGT
<i>RhCCD1</i> 5'	AGGTTTGTCTGCCTCTGAAAGAGC
<i>RhCCD1</i> 3'	GGAAAGCAACATAGTCTCCCGCT
<i>RhCCD4</i> 5'	ATGCTCCACTCCATCAGAATCTCC
<i>RhCCD4</i> 3'	GAACAGCTCGCCGTTAAAGTCGTT
<i>RhCHRC</i> 5'	ACGATTTCGGCCTTGCTACTTGAGA
<i>RhCHRC</i> 3'	TGTCCGAAGTCCTAAGCGTGTTC
ribosomal 5'	GCGACGCATCATTCAAATTTC
ribosomal 3'	TCCGGAATCGAACCCTAATTC

**היברידיזציות Reverse Northern:** ה-DNA מהקלונים שהתקבלו בספריית ההפחתה הוגבר בריאקציית PCR בעלת 35 סבבים, וטופטף על ממברנות ניילון טעונות במטען חיובי (HyBond N+, Amersham Biosciences). הכנת גלאים רדיואקטיביים לא ספציפיים בוצעה בריאקציית שיעתוק עם dCTP<sup>32</sup> ל-cDNA מופחת לטיפול ב-MJ, ומנגד, ל-cDNA מופחת לביקורת. החומר הרדיואקטיבי נרכש מחברת דניאל ביוטק, והריאגנטים והאנזים לריאקציה סופקו בערכה Random Primer DNA Labeling kit (תעשיות ביולוגיות, בית העמק). היברידיזציות Reverse Northern בוצעה בבופר מסחרי (Clontech ExpressHyb) על פי הוראות היצרן.

הממברנה עם הגלאים המוצמדים נחשפה ללוח הדמיה זרחני (Fuji-film imaging plate) למשך 12 שעות, שנסרק לאחר מכן במכשיר פוספואימג'ר מסוג Fuji-film FLA-5100 imaging system. קלונים שהגיבו באופן שונה לשני הגלאים רוצפו, והרצפים הושוו למאגרי המידע בתכנת BLASTx. חלק מהקלונים שימשו כגלאים באנליזת Northern. הרצף ההומולוגי לגן CHRC שימש גם ליצירת תחלים עבור אנליזת sqRT-PCR כמפורט לעיל.

**אנליזות Northern:** RNA הופק מעלי כותרת מספר 5-8 של פרחים מזן 'פריסקו' וגולדן גייט' בשיטה שצויינה לעיל. ה-RNA כומת על פי הבליעה שלו ב-280 nm. מדגם RNA של 20 µg מכל הפקה עבר דנטורציה והורץ ב-60 V למשך 3 שעות בג'ל אגרוז + פורמאלדהיד 0.66M טבול בבופר MOPS (10 mM MOPS, pH 7.0, 40 mM EDTA, 1 mM sodium acetate). הג'ל צולם על שולחן UV לצורך כימות נוסף. ה-RNA הועבר בשיטה קפילרית מהג'ל אל ממברנת ניילון טעונה חיובית (HYBOND N+, Amersham Biosciences) במשך 16 שעות, ואז קובע אל הממברנה בעזרת מכשיר UV Cross-linker מתוצרת חברת UltraLUM.

גלאים ספציפיים הוכנו בריאקציית שיעתוק כמפורט בסעיף הקודם. ה-templates בריאקציות אלו היו פלסמידים שהופקו מהקלונים שנבחרו לאנליזה.

טרם ההיברידיזציה הממברנה טולטלה למשך שעותיים ב-65 מ"צ ב-Denhardt's buffer שהכיל Salmon testes DNA בריכוז של 25 µg/ml (Sigma). היברידיזציית Northern בוצעה באותם תנאי טמפרטורה למשך 16 שעות בבופר טרי שהוספו לו הסמן הרדיואקטיבי ו-Salmon testes DNA. בתום ההיברידיזציה הממברנה נשטפה ב-0.05% SSC + SDS בתשעה שלבי שטיפה בני 5-10 דקות כל אחד, כאשר ריכוז ה-SSC יורד בהדרגה מ-1X ל-0.05X. הממברנה נחשפה ללוח הדמיה זרחני מסוג Fujifilm imaging plate למשך 12 שעות, שנסרק לאחר מכן במכשיר פוספואימג'ר מסוג Fuji film FLA-5100 Imaging System.

## 8. אנליזות חלבונים: הפקה, כימות והרצה, ואנליזת Western Blot לחלבון RhCHRC

עלי כותרת מספר 5-8 של פרחי ביקורת ופרחים מטופלים ב-MJ נאספו והוקפאו במועדים שונים במהלך חיי האגרטה. מדגם של 2 גרם רקמת העלים נכתש בחנקן נוזלי בתוספת 1 גרם polyvinylpyrrolidone (PVPP) ובופר הפקה המורכב מ-50 mM BisTris propane, pH 7.5, 10% (v/v) glycerol, 5 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, 14 mM β-mercaptoethanol, 1% (w/v) PVP-40 (Biorad) בספקטרופוטומטר באורך גל של 595 nm מול עקומת כיוול שנבנתה מסטנדרט BSA. מדגם של 25 מיקרוגרם מכל דוגמת חלבון עורבב ביחס של 1:5 עם בופר צבע שהכיל 10% w/v SDS, 10 mM β-mercaptoethanol, 20% v/v Glycerol, 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.05% w/v Bromophenol blue, עבר דנטורציה של 5 דקות בחום (95 מ"צ), הוטען על שני ג'לים מסוג SDS-PAGE במקביל לסמני גודל, והופרד באלקטרופורזה ב-100 mV למשך 1.5 שעות בטמפרטורת החדר בנוכחות בופר הרצה Tris-SDS-glycine. בתום ההרצה ג'ל אחד נצבע בריאגנט Coomassie 0.2% Blue, 7.5% acetic acid, 50% ethanol, והחלבונים מהג'ל השני הוספו לממברנת ניטרולולוז ב-90 mV למשך 1.5 שעות בבופר Tris-glycine-methanol, ב-4 מ"צ.

**אנליזת Western Blot לחלבון CHRC** בוצעה עם נוגדן ראשוני, שהופק מארנבת שחוסנה כנגד החלבון CHRC שהופק מעלי כותרת של פרחי מלפפון (Smirra et al., 1993), שהתקבל ממעבדתו של פרופ' וינשטיין בפקולטה



לחקלאות ברחובות. הממברנה טולטלה במשך שעה בבופר חסימה שהכיל 0.02M Tris, 0.15N NaCl (TBS) בנוחות 5% חלב רזה (1%) בטמפרטורת החדר, ולאחר מכן הממברנה הוגבה עם הנוגדן הראשוני במיהול של 1:20,000 בטולטול למשך הלילה ב- 4 מ"צ. לאחר שטיפות (15 דקות X 3 שטיפות) בבופר שטיפה (TBS + Tween-20) (TBST) הממברנה הוגבה עם נוגדן שניוני Anti-rabbit IgG-AP conjugate (Promega, Madison, USA) במיהול של 1:6000 באמצעות הדגרה למשך 1.5 שעות בטמפרטורת החדר.

לאחר סדרת שטיפות נוספת ב- TBST (15 דקות X 3 שטיפות), הממברנה הועברה לתמיסת צבע שהכילה NBT (nitro blue tetrazolium) / BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) (Promega, Madison, USA), וטולטלה בחושך למשך 1.5 שעות עד להתפתחות הצבע. הריאקציה הופסקה ע"י שטיפת הממברנה במים למשך 10 דקות.

### 9.ג. בדיקת הרכב הנדיפים בפרחים מזן 'פריסקו'

**אנליזת Headspace:** פרחי 'פריסקו' קטופים הוכנסו לצנצנת זכוכית (10 x 0.7 ס"מ) שהכילה 0.1 גרם של טפלו, והחומרים הנדיפים שנפלטו נשאבו (200 cm<sup>3</sup>/min) לתוך קולונת זכוכית (10 x 0.7 ס"מ) שהכילה 0.1 גרם של Porapak Q 80/100 (Waters, USA) כשמשני צידיה צמר זכוכית. קולונה נוספת, שהכילה 0.2 גרם של Porapak Q 80/100, שימשה לסינון האויר שנכנס לכלי. החומרים הנדיפים מוצו מהקולונה עם 3 מ"ל הקסאן, שאליהם הוסף סטנדרט isobutyl benzene בריכוז של 2 µg/ml. הדוגמה רוכזה לנפח של 0.1 מ"ל.

**מיצוי נדיפים:** עלי כותרת 5-7 מפרחי 'פריסקו' קטופים נכתשו בחנקן נוזלי וטולטלו למשך הלילה ב- 4 מ"צ ב- 3 מ"ל הקסאן עם isobutyl benzene 10 ח"מ. הדוגמה סורכזה והפאזה העליונה רוכזה לנפח של 0.1 מ"ל.

**אנליזת GCMS:** התרכובות הנדיפות עברו אנליזה במערכת של Gas chromatography-mass spectrometry המצוידת במרכיבים הבאים:

Pal autosampler (CTC analytic, Zwingen, Switzerland)

TRACE GC 2000 gas chromatograph

TRACE DSQ quadruple mass spectrometer (Thermo Finnigan, Hemel UK)

התרכובות הופרדו על גבי קולונה קפילרית (25 מ"מ X 30 מ"מ) מסוג RTX -5Sil (Restek, California).

טמפרטורת ה-injector הייתה 250 מ"צ, טמפרטורת ה-ion source הייתה 200 מ"צ וטמפרטורת ה-transfer line הייתה 280 מ"צ. הליום שהוזרם בקצב של 1 מ"ל לדקה שימש כגז נשא.

זיהוי החומרים נעשה על ידי אנליזת ספקטרום המסות באמצעות שימוש בספריה ממוחשבת NIST V.2.0.

לצורך האנליזה הכמותית isobutyl benzene (2 µg / ml) שימש כסטנדרט פנימי.

### 10.ג. אנליזת דוגמאות במיקרוסקופ אלקטרוניים

ריבועים בגודל של 0.5 X 0.5 ס"מ נחתכו ממרכזו של עלה כותרת מספר 5 של פרחי ביקורת או פרחים

מטופלים ב-MJ מזן 'פריסקו' בימים 0, 2, 4, ו-6 של חיי האגרסל. החתכים מעלי הכותרת הושרו ב-PBS המכיל 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> עם 3.5% glutaraldehyde לצורך קיבוע. החתכים

נשטפו ועברו קיבוע נוסף ב- 1% OsO<sub>4</sub> in PBS, נשטפו ב- PBS ונצבעו בבלוק ב- uranyl acetate. לאחר מכן הדוגמאות יובשו על ידי העברתן בתמיסות עם ריכוזי אתאנול עולים ואצטון. בתום הייבוש הדוגמאות הושקעו ב- epoxy resin Agar100 (Agar Scientific, Cambridge), נפרסו לחתכים ונצבעו שנית ב- uranyl acetate/ lead citrate. האנליזה של הדוגמאות בוצעה במיקרוסקופ מסוג Tecnai G2 Spirit TEM (FEI company, Philips). הכרומופלסטים שבתאי הרקמה צולמו ובכל כרומופלסט נספר מספר הפלסטוגלובולות. לכימות התוצאות, חושב היחס של מספר הפלסטוגלובולות לכרומופלסט/רדיוס הכרומופלסט, והכרומופלסטים בכל חתך סווגו לקבוצות על פי ערכי היחס הזה.

## ד. תוצאות

### ד.1. מופע עלי הכותרת בורדים קטופים במהלך חיי האגרטל והשפעת הטיפול ב-MJ על המופע

#### ד.1.1. השתנות מופע הצבע בזנים 'פריסקו' ו'גולדן גייט' במהלך חיי האגרטל והשפעת הטיפולים ב-MJ

מופע הצבע במהלך חיי האגרטל נבדק בשני זני ורדים צהובים, בזן 'גולדן גייט' שהוא בעל גוון צהוב כהה (איור 5א') ובזן 'פריסקו' שהוא בעל גוון צהוב בהיר (איור 5ב'). ביומיים הראשונים באגרטל, במהלך פתיחת פרח, הצבע הצהוב האופייני לזן 'פריסקו' התעצם, אך בזן 'גולדן גייט' היה קשה להבחין בהעצמת הצבע בשל צבעו המקורי הכהה יחסית. עם התקדמות הפתיחה, חלה דהייה הדרגתית ומתמשכת בצבע של עלי הכותרת בשני הזנים. בזן 'פריסקו' דהייה משמעותית ניכרה כבר במהלך יום 2 או ביום 3 לחיי האגרטל, שקדמה בהרבה לדהייה בזן 'גולדן גייט' בו דהייה ניכרה רק ביום 5 או 6 ובעוצמה נמוכה יותר.

דהייה מתפתחת מהדור החיצוני כלפי פנים, וברמת עלה הכותרת הבודד - מהקצה האפיקלי כלפי בסיס העלה (איור 5ג'). רוב הצבע בעלי הכותרת דהה קודם לאיבוד הטורגור והכמישה האופייניים להזדקנות.

טיפול ב-MJ, שניתן לפרחים במשולב בהטענה (350  $\mu$ M) ובריסוס (500  $\mu$ M), העצים את מופע הצבע בשני הזנים החל מ-24 שעות ממתן הטיפול ובמשך כל חיי האגרטל (איור 5). בפרחים מהזן 'פריסקו' שטופלו ב-MJ הצבע נשמר ואף התעצם, והדהייה החלה רק לאחר היום הרביעי. בזן זה ניתנו ריסוסים נוספים ב-MJ במהלך היומיים הראשונים לחיי האגרטל. מנות הריסוס ניתנו לאחר 24 שעות מהטיפול הראשון וכן לאחר 24 שעות + 48 שעות מהטיפול הראשון. לכל מנת ריסוס הייתה השפעה מתווספת על עוצמת הצבע בעלי הכותרת (איור 6).

בזן 'פריסקו' הטיפול ב-MJ גם האט את פתיחת ראש הפרח, בנוסף להגברת עוצמת הצבע (איור 5ב'). גם בזן 'גולדן גייט' הטיפול הגביר את עוצמת הצבע, אך ההבדלים בין הטיפול לביקורת היו קטנים יותר והטיפול לא השפיע על פתיחת ראש הפרח (איור 5א').

#### ד.1.2. זיהוי הפיגמנט האחראי לצבע הצהוב בזנים 'פריסקו' ו'גולדן גייט'

כצעד ראשון לבירור ההשפעה של MJ על הצבענים ברקמה, נערכה בדיקה איכותית על מנת לברר האם הצבען בעלי הכותרת של הזנים 'פריסקו' ו'גולדן גייט' הוא קרוטנואיד או פלבנואיד. הבדיקה התבססה על מידת ההידרופוביות השונה של הפיגמנטים: הפיגמנטים מוצו מעלי כותרת כתושים באצטון, והמיצוי עורבב עם כלורופורם והודגר עד להפרדת הפאזות. בשני הזנים בתום ההדרגה עיקר הצבע הצהוב נמצא בפאזת הכלורופורם ההידרופובית האופיינית לקרוטנואידים (התוצאות אינן מוצגות). תוצאה זו הובילה למסקנה שקרוטנואידים הם הצבענים העיקריים בעלי הכותרת של הורדים מזנים 'פריסקו' ו'גולדן גייט'.

#### ד.1.3. השפעת הטיפול ב-MJ על מופע הצבע בזני ורדים נוספים במהלך חיי האגרטל

השפעת הטיפול ב-MJ נבחנה גם בזני ורדים מצבעים אחרים בנוסף לזנים הצהובים 'פריסקו' ו'גולדן גייט' במטרה לאפיין את כלליות התופעה (איורים 7, 8). הטיפול ב-MJ ניתן לוורדים אדומים מהזנים 'רד צ'ארם', 'מרצדס' (איור 7) ו'פרגרנט קלאוד' (התוצאות אינן מוצגות), לוורדים ורודים מהזנים 'פרופיטה' ו'ג'אז', וכן לוורדים הצהובים

'פריסקו' וגולדן גייט', (איור 8). עוצמת הצבע (איור 7א, ב') ומידת הבהירות (איור 7ג) נמדדו ברפרקטומטר ביום 4 לחיי האגרטל. בנוסף להשפעה על עוצמת הצבע הצהוב בזן 'פריסקו', נמצא שהטיפול ב-MJ השפיע במובהק על הצבע בזנים הורודים. בזן 'פרופיטה' הטיפול הגביר את ערכי a ו-b (גווני האדום והצהוב, בהתאמה) (איור 7א, ב'), ואילו בזן 'ג'אז' פרחים מטופלים היו אדומים יותר (a) (איור 7א') וכהים יותר (L) (איור 7ג'). הטיפול ב-MJ לא השפיע על צבע עלי הכותרת בזנים האדומים 'רד צ'ארם' ו'מרצדס' (איור 7).

השפעת הטיפול ב-MJ נבחנה בסדרה נוספת של זנים בעלי גוון כתום (איור 8). עוצמת הצבע ומידת הבהירות נמדדו בימים 4 ו-7 במהלך חיי האגרטל. הזן 'שרי ברנדי' מתאפיין בשינויים בצבע עלי הכותרת מכתום-ורוד בראשית חיי האגרטל ועד לורוד בסופם. הטיפול ב-MJ שימר את הצבע הכתום בזן זה, ובדיקת הרפרקטומטר שבוצעה בעלי הכותרת לאחר 7 ימי אגרטל הראתה, שהפרחים המטופלים היו בעלי עוצמת צבע גבוהה יותר ושהם היו כהים יותר מפרחי הביקורת (איור 8א'). הזן 'ספארי' (איור 8ב') אשר נוצר מהזן 'פריסקו' הוא בעל צבע כתום שהולך ודוהה במהלך חיי האגרטל. הטיפול ב-MJ הגביר את עוצמת הצבע הכתום ומנע את דהיית עלי הכותרת בזן זה. גם בזן זה בדיקת הרפרקטומטר העלתה שהפרחים המטופלים היו כהים יותר ובעלי עוצמת צבע גבוהה יותר מזו של פרחי הביקורת (איור 8ב'). בזן הכתום 'בוננזה' הצבע דוהה בקצב איטי במהלך חיי האגרטל. השפעת הטיפול בזן זה הייתה מינורית ביותר ונראתה רק בימים המאוחרים בחיי האגרטל, ובבדיקת הרפרקטומטר בזן זה לא נמצא הבדל בין פרחים מטופלים לביקורת (איור 8ג'). בחינת סוג הפיגמנט בזנים אלה העלתה שהפיגמנט העיקרי בעלי הכותרת שלהם הוא קרוטנואיד.

התוצאות מראות לכן ש-MJ הגביר את הצבע בפרחי ורדים שונים בעלי גוון צהוב-כתום שהצבענים בעלי הכותרת שלהם הם קרוטנואידים וכן בזנים ורודים, אך לא השפיע על הצבע בזנים האדומים. מקובל שהצבענים המקנים צבעים אדומים בעלי הכותרת של ורדים הם אנתוציאנינים (Eugster and Märki-Fischer, 1991). לאור זאת, התמקדנו באפיון השפעות הטיפול ב-MJ על קרוטנואידים, תוך שימוש בשני הזנים הצהובים 'פריסקו' וגולדן גייט' כזני מודל.

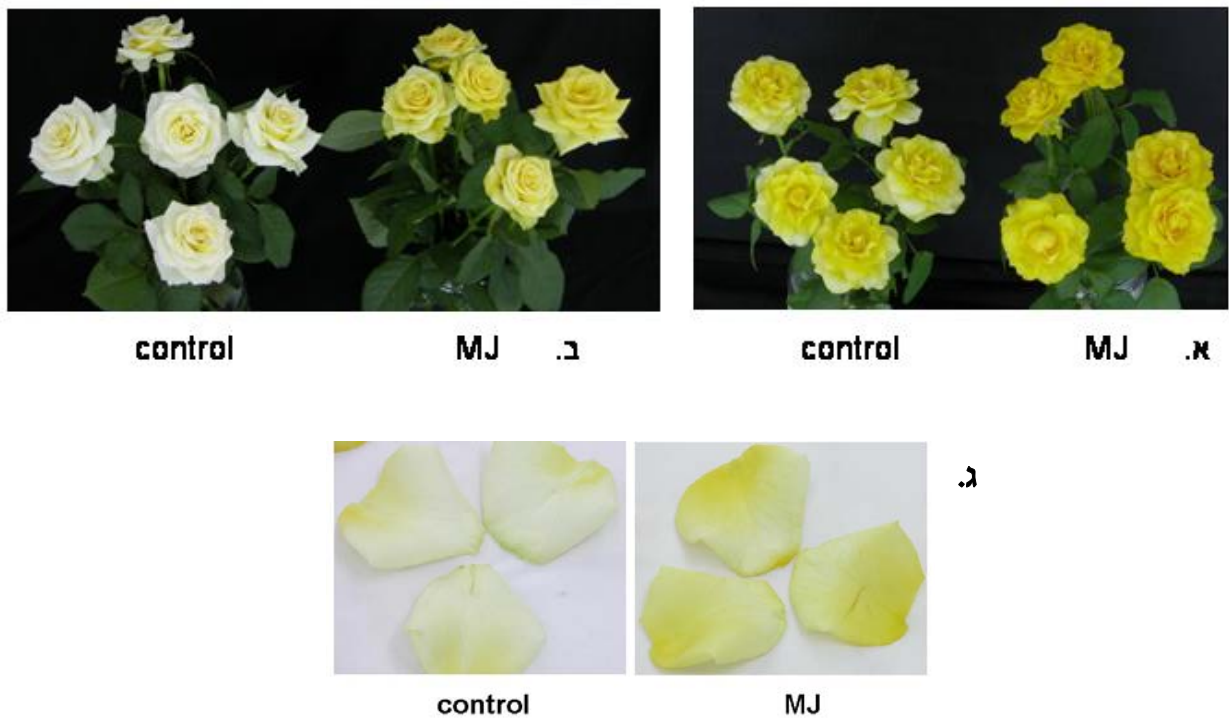
#### ד.1.4. השפעת הטיפול ב-MJ על שינויי הקוטר והמשקל של פרחי הזן 'פריסקו' במהלך חיי האגרטל

אחת האפשרויות להסביר את הבדלי הצבע בין פרחים מטופלים ב-MJ לבין פרחי הביקורת היא שהטיפול ב-MJ הגביר את כמות הקרוטנואידים בפרח. יחד עם זאת, מאחר והטיפול גם גרם לעיכוב בפתיחת הפרח בזן 'פריסקו' (איור 25) עלתה האפשרות שתוצאה זו אינה נובעת מהבדלים בכמות הקרוטנואידים בעלי הכותרת אלא מריכוז גבוה יותר שלהם בפרחים המטופלים ב-MJ כתוצאה מקליטת מים איטית בהם יחסית לפרחי הביקורת. על מנת לאפיין גורמים שיכולים להשפיע על עוצמת הצבע בעלי הכותרת, נמדדו השינויים בקוטר ובמשקל הטרי של ראש הפרח במהלך חיי האגרטל בהשפעת הטיפול ב-MJ.

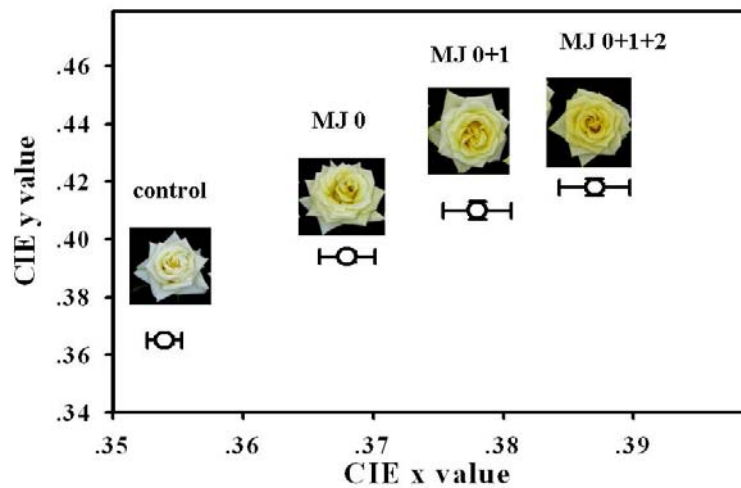
מעקב אחר ההבדלים בקוטר ראש הפרח בזן 'פריסקו' בין פרחים מטופלים ב-MJ לבין פרחי הביקורת הראה שעיקוב פתיחת הפרח על ידי MJ התבטא בעיקר בשני ימי האגרטל הראשונים בלבד, ובהמשך הפרחים המטופלים ב-MJ הגיעו לפתיחה מלאה (איור 9א'). בזן 'גולדן גייט' לא ניכרה השפעה של הטיפול ב-MJ על פתיחת ראש הפרח (התוצאות אינן מוצגות). תוצאה זו מעידה שהבדל הצבע בין פרחים מטופלים לפרחי ביקורת אינו נובע מהשפעת הטיפול ב-MJ על פתיחת הפרחים.

המשקל הטרי של פרחי הביקורת במהלך חיי האגרטל עלה בין יום 0 ל-1. העלייה במשקל נעצרה עד ליום 2

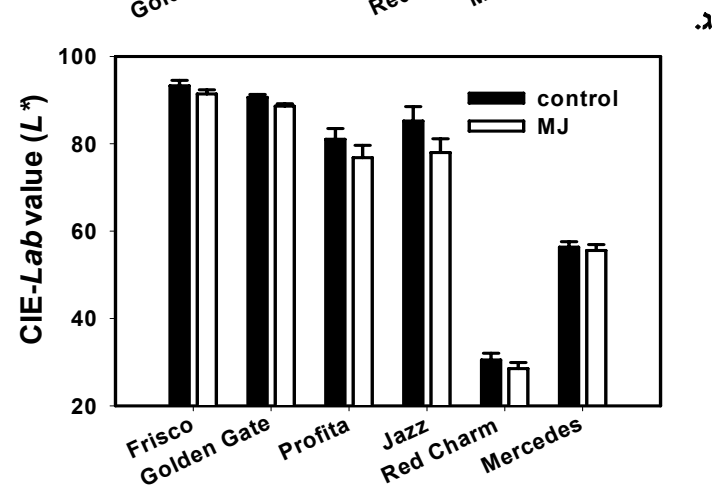
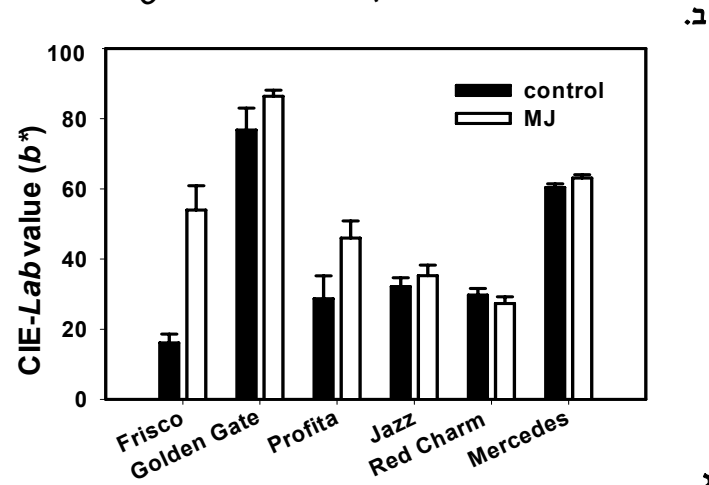
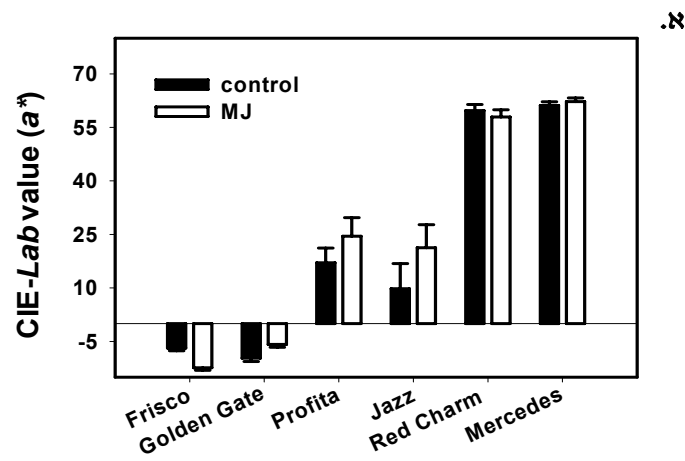
ומכאן והלאה המשקל הטרי עלה בקצב מואץ עד ליום 5, שלאחריו הובחנה ירידה ביום 6 (איור 5ב). ברוב הניסויים המשקל הטרי של פרחים שטופלו ב-MJ היה נמוך מזה של פרחי הביקורת במשך רוב חיי האגרטל (איור 5ב). ככלל, הייתה התאמה בין המשקל הטרי לבין המשקל היבש (התוצאות אינן מוצגות). עם זאת, השונות בין הניסויים ובתוכם הייתה רבה, והיו מקרים בהם השפעת הטיפול ב-MJ על המשקל הטרי והיבש לא הייתה מובהקת או שלא הייתה אחידה במהלך חיי האגרטל.



**איור 5:** השפעת טיפול ב-MJ על עוצמת הצבע הצהוב בורדים קטופים מהזנים 'גולדן גייט' (א) ו'פריסקו' (ב, ג). פרחים קטופים משני הזנים טופלו בטיפול משולב הכולל ריסוס ב- $500 \mu\text{M}$  MJ והטענה ב- $350 \mu\text{M}$  MJ למשך 24 שעות. פרחי הביקורת טופלו בתמיסת המשטחים שבתכשיר, ללא תוספת MJ. לאחר מכן הפרחים הוצבו באגרטלים עם תמיסת כלורין אורגני (TOG-6) בחדר התצפית למשך 6 (א) או 5 (ב, ג) ימים. מופע עלי כותרת מהדור החיצוני של פרחים מזן 'פריסקו' עם או ללא טיפול ב-MJ לאחר 5 ימים באגרטל (ג).



**איור 6: השפעת טיפולים מתווספים ב-MJ על עוצמת הצבע בעלי כותרת של פרחים מהזן 'פריסקו'.**  
 פרחים קטופים טופלו בטיפולים המפורטים להלן והודגרו באגרטל בחדר התצפית למשך 7 ימים. הטיפולים כללו: MJ0 = ריסוס ב-500  $\mu\text{M}$  MJ והטענה ב-350  $\mu\text{M}$  MJ למשך 24 שעות; MJ0+1 = טיפול MJ ראשון + טיפול ריסוס שני ב-500  $\mu\text{M}$  MJ יממה לאחר טיפול MJ הראשון; MJ0+1+2 = טיפול ריסוס שלישי לאחר שתי יממות. עוצמת הצבע של עלי כותרת מדורים 2-3 (עלים מספר 5-7) נמדדה ברפרקטומטר מינולטה ומבוטאת כקואורדינטות x,y על מערכת צירים המבוססת על ערכי X,Y,Z tristimulus כמפורט באיור 4א', ב'. הערכים המוצגים מייצגים ממוצעי מדידות של 15-20 עלי כותרת  $\pm$  שגיאות תקן.

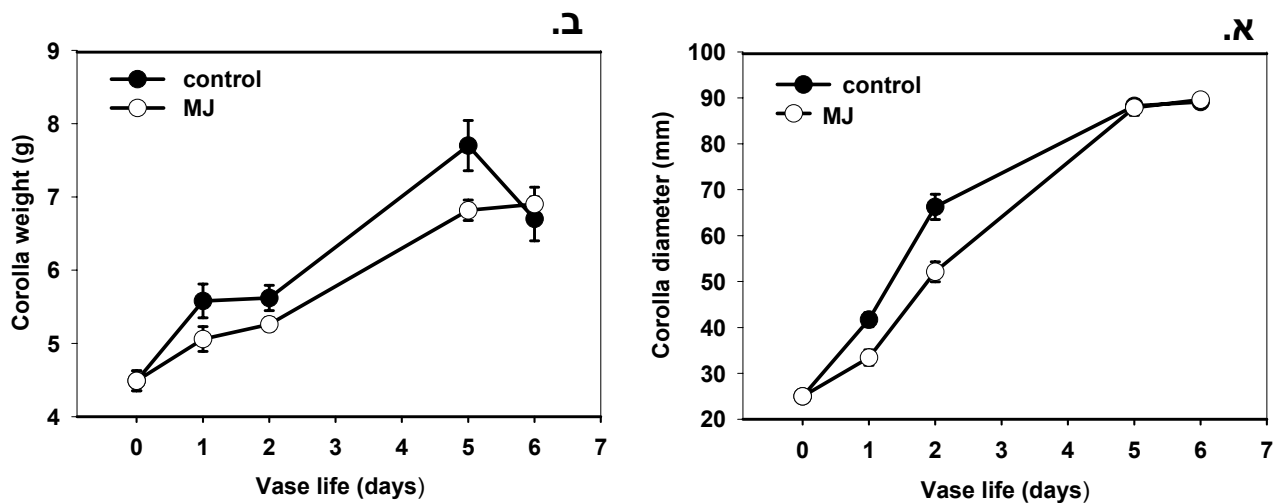


**איור 7: השפעת טיפולים ב-MJ על מדדי עוצמת הצבע  $a^*$  (א),  $b^*$  (ב) ו- $L^*$  (ג) בזני ורדים שונים לאחר 4 ימים באגרסל.**

הפרחים טופלו ב-MJ כמפורט באיור 5 והוצבו במקביל לפרחי הביקורת בחדר התצפית בתמיסת כלורין אורגני (TOG-6). עלי כותרת מהדור השני (עלים 4-6) הוסרו מפרחי הוורדים מהזנים המצוינים באיור ביום הרביעי לחיי האגרסל ומדדי עוצמת הצבע שלהם נקבעו בפרקטומטר מינולטה על פי לוח הצבעים  $L^*a^*b^*$  כמפורט באיור 4ג'. הערכים מייצגים ממוצעי מדידה של 15 עלי כותרת  $\pm$  שגיאות תקן.







**איור 9: השפעת הטיפול ב-MJ על השינויים בקוטר (א') ובמשקל הטרי (ב') של ראש הפרח בוורדים מזן 'פריסקו' במהלך חיי האגרטל.**

הפרחים טופלו ב-MJ כמפורט באיור 5 והוצבו במקביל לפרחי הביקורת בחדר התצפית למעקב אחר מדדי הקוטר והמשקל של ראש הפרח. קוטר הפרחים נמדד במד קוטר עגול, והמשקל של ראשי הפרחים נקבע לאחר הסרתם מהגבעולים. הערכים מייצגים ממוצעי מדידה של 10 פרחים  $\pm$  שגיאות תקן.

## 2. שינויים בתכולת הקרוטנואידים ובהרכבם בעלי הכותרת של ורדים מהזנים 'פריסקו' ו'גולדן גייט' בחיי האגרטל והשפעת הטיפול ב-MJ על שינויים אלו

### 2.1. שינויים בתכולת הקרוטנואידים של ורדים מזן 'פריסקו' והשפעת הטיפול ב-MJ על שינויים אלו

התוצאות עד כה מצביעות על שינויים בעוצמת הצבע של עלי הכותרת של ורדים מהזן 'פריסקו' במהלך חיי האגרטל ובהשפעה ברורה של הטיפול ב-MJ על שינויים אלה. תוצאות אלה מצביעות על כך שיתכן ו-MJ משפיע על תכולת הקרוטנואידים בפרח. אי לכך, נערכו אנליזות שונות שמטרתן לאפיין את השינויים האלו ואת השפעת MJ עליהם. הזן 'פריסקו', שבו נראתה דהייה משמעותית והשפעה חזקה ביותר של הטיפול ב-MJ, נבחר לביצוע האנליזות.

בשלב ראשון נבדקה תכולת הקרוטנואידים הכללית בעלי כותרת מספר 5-7 המייצגים שילוב של הדורים האמצעיים והחיצוניים בפרחים. מהתוצאות המוצגות באיור 10 נראה, שבפרחי הביקורת הצטברו הקרוטנואידים בעלי הכותרת ביומיים הראשונים של חיי האגרטל, ובין יום 2 ליום 6 תכולת הקרוטנואידים פחתה פי 2. הטיפול ב-MJ הגביר את תכולת השיא של הקרוטנואידים בעלי הכותרת, ובנוסף, בפרחים המטופלים הירידה בתכולת הקרוטנואידים החלה רק לאחר יום 4. ביום 6 כמות הקרוטנואידים בפרחים המטופלים הייתה גבוהה פי 2.4 מאשר בפרחי הביקורת (איור 10). תוצאות אלו הן בהתאמה לשינויים במופע הפרחים שתוארו בפרק 1.1.

תכולת הקרוטנואידים מבטאת את המאזן בין שני תהליכים שיכולים להתרחש בעלי הכותרת במקביל –

ייצור ופירוק. בין יום 0 ליום 2 ישנה עלייה בתכולת הקרוטנואידים בפרחי הביקורת. עלייה זו מצביעה שבימים אלו מתקיימים בפרחים תהליכי סינתזה של קרוטנואידים. בין יום 2 ליום 6 ישנה ירידה בתכולת הקרוטנואידים. ירידה זו מצביעה על כך שהתהליך השולט בעלי הכותרת בימים אלו הוא הפירוק. מאחר והטיפול ב-MJ הגביר את תכולת הקרוטנואידים, השפעת הטיפול עשויה להיות על כל אחד מהתהליכים, או על שניהם. כך למשל, בימים 2-4 בפרחים שטופלו ב-MJ הייתה תכולה מוגברת של קרוטנואידים בעלי הכותרת 5-7 (איור 10). הגברה זו עשויה לנבוע משינוי שחולל הטיפול במאזן בין תהליכי הייצור לפירוק הקרוטנואידים, אולם לא ניתן לקבוע האם הטיפול הגביר את הייצור בימים אלו או מנע את הפירוק. קושי נוסף בהגדרת השפעת הטיפול ב-MJ נבע מכך שעלי הכותרת בדורים החיצוניים של הפרח נמצאים בשלב ההתפתחותי מתקדם יותר מאשר בדורים הפנימיים והם מקדימים לדהות. כתוצאה מכך שינוי הצבע אינו אחיד בכל ראש הפרח. על מנת להפריד בין שני התהליכים, השתמשנו בנורפלורזון (NF) שחוסם את מסלול יצירת הקרוטנואידים על ידי עיכוב האנזים phytoene desaturase (Simkin et al., 2000). בנוסף, הפרדנו בין הדורים השונים של הפרח על פי המפתח הבא: דור חיצוני = עלי כותרת 1 – 4; דור אמצעי = עלי כותרת 9 – 12; ודור פנימי = עלי כותרת 18 – 21.

ראשית, נערך ניסוי מקדים כדי לוודא ש-NF אכן חוסם את סינתזת הקרוטנואידים בעלי הכותרת של הוורדים (איור 11). הפרחים טופלו ב-NF ביום 0 והוצבו בחדר התצפית. ביום 2 כמות הקרוטנואידים בדור החיצוני של פרחי הביקורת עלתה ב-37%, אך בפרחים שטופלו ב-NF כמות הקרוטנואידים הייתה שווה לכמותם ביום 0 (איור 11א'). הבדלים ברמות הקרוטנואידים (איור 11א') ובצבע (איור 11ב') בין פרחי הביקורת לפרחים שטופלו ב-NF נשמרו במהלך כל חיי האגרטה וניכרו גם ביום 6. מניסוי זה עולה שייצור הקרוטנואידים בעלי הכותרת נמשך לאחר הקטיף, ויישום NF אכן מנע את הצטברותם של הקרוטנואידים. בנוסף, הכמות השווה של הקרוטנואידים שנמצאה בין יום 0 ליום 2 בפרחים שטופלו ב-NF מעידה שבתקופה זו לא התרחשו תהליכי פירוק של קרוטנואידים בעלי הכותרת.

בהמשך נערך ניסוי בו יושומו טיפולים שונים בדורים השונים של הפרחים (איור 12) ונמדדה תכולת הקרוטנואידים בעלי הכותרת לאורך חיי האגרטה:

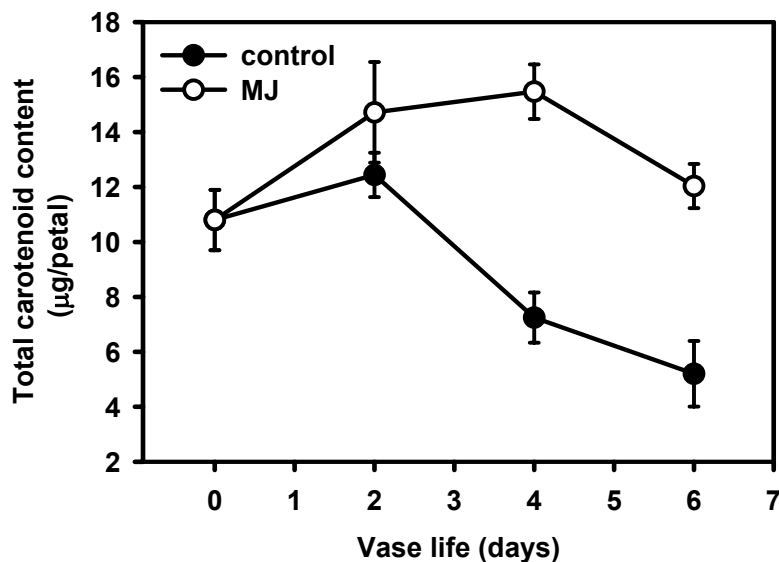
בדומה לתוצאות שהוצגו באיור 10 בפרחי הביקורת הצטברו הקרוטנואידים בעלי הכותרת ביומיים הראשונים של חיי האגרטה. בין יום 2 ליום 6 תכולת הקרוטנואידים פחתה בדור החיצוני פי 3 (איור 12א') ובדור האמצעי כמעט שלא השתנתה (איור 12ב') בדור הפנימי לא חל שינוי בתכולת הקרוטנואידים בימים אלו (הנתונים אינם מוצגים).

הטיפול ב-MJ הגביר את תכולת הקרוטנואידים בפרחים. בדור האמצעי ביום 2 כמות הקרוטנואידים של פרחים מטופלים הייתה גבוהה פי 1.5 יותר מאשר בפרחי הביקורת וביום 6, לאחר ארבעה ימי אגרטה נוספים, כמות הקרוטנואידים בפרחים מטופלים הייתה גבוהה פי 1.4 מהביקורת (איור 12ב'). בדור החיצוני ביום 2 לא היה הבדל בין הטיפול לביקורת, אך ביום 6 כמות הקרוטנואידים הייתה גבוהה פי 2.4 מהביקורת (איור 12א'). בדור הפנימי לא ניכרה השפעה לטיפול (התוצאות אינן מוצגות).

פרחי הביקורת ופרחים מטופלים ב-MJ הוטענו ורוססו ב-NF ביום 2 (NF2). כאמור, במועד זה לא היה הבדל בכמות הקרוטנואידים בעלי כותרת של הדור החיצוני בין פרחים מטופלים ב-MJ לפרחי ביקורת (איור 12א'). ביום 6 כמות הקרוטנואידים בפרחי הביקורת הייתה שווה לכמותם בפרחי NF2, הן בדור החיצוני (איור 12א') והן בדור האמצעי (איור 12ב'). תוצאה זו מהווה עדות לכך שבפרחים אלו לא נוצרו קרוטנואידים נוספים אחרי יום 2.

מנגד, בדור החיצוני של פרחים מטופלים ב-MJ אשר קיבלו את טיפול ה-NF2, תכולת הקרוטנואידים הייתה דומה לזו של פרחים שטופלו ב-MJ וגבוהה במובהק מתכולתם בפרחי הביקורת (איור 12א). מכאן, שהטיפול ב-MJ גרם לעיכוב פירוק הקרוטנואידים בעלי כותרת של הדור החיצוני. גם בדור האמצעי ביום 6 התקבלה מגמה דומה לגבי תכולת הקרוטנואידים בפרחים שטופלו ב-MJ ופרחי MJ אשר קיבלו את טיפול NF2 (איור 12ב). יחד עם זאת, בדור זה ההבדל בתכולת הקרוטנואידים בין פרחים שטופלו ב-MJ לבין פרחי הביקורת ניכר כבר ביום 2 (איור 12ב), ולכן ייתכן שהבדל זה נשמר עד ליום 6.

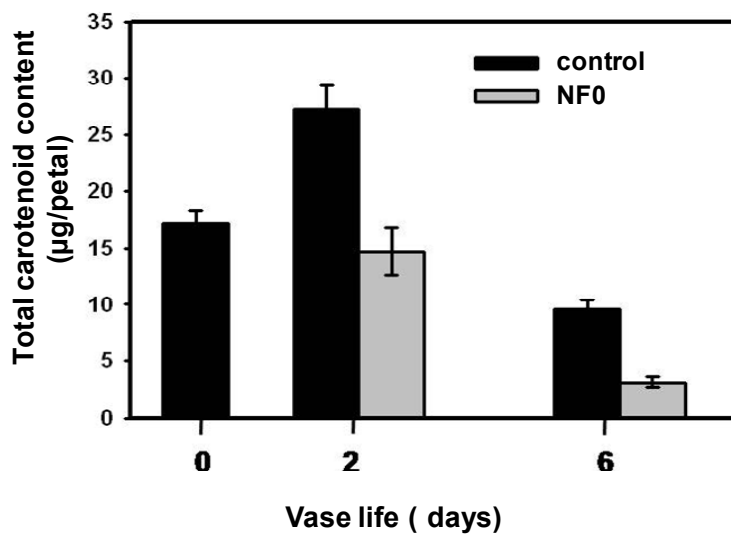
בסדרת הניסויים הזאת הוכח שהשפעת MJ על שיפור עוצמת הצבע בעלי הכותרת של ורדים מזן 'פריסקו' נובעת הן מהגברת הייצור והן מעיכוב הפירוק של הקרוטנואידים ברקמה. לאור התוצאות האלו הוחלט לברר מהו הרכב הקרוטנואידים בעלי הכותרת, ולבחון אילו מהקרוטנואידים שבעלי הכותרת מושפעים מהטיפול ב-MJ, ובאיזה אופן.



**איור 10: השפעת הטיפול ב-MJ על שינויים בתכולת כלל הקרוטנואידים בעלי הכותרת של פרחי ורדים מזן 'פריסקו' במהלך חיי האגרטל.**

הפרחים טופלו ב-MJ כמפורט באיור 5 והוצבו במקביל לפרחי הביקורת בחדר התצפית בתמיסת כלורין אורגני (TOG-6) למשך 6 ימים. הקרוטנואידים מוצו משלושה עלי כותרת (מס' 5-7) של פרחי ביקורת או של פרחים מטופלים ב-MJ במועדים שונים במהלך חיי האגרטל וכומתו עפ"י בליעת המיצוי בספקטרופוטומטר באורך גל של 441 ננומטר. הנתונים מייצגים ערכים ממוצעים של חמש חזרות לכל טיפול ± שגיאות תקן.

א.



ב.

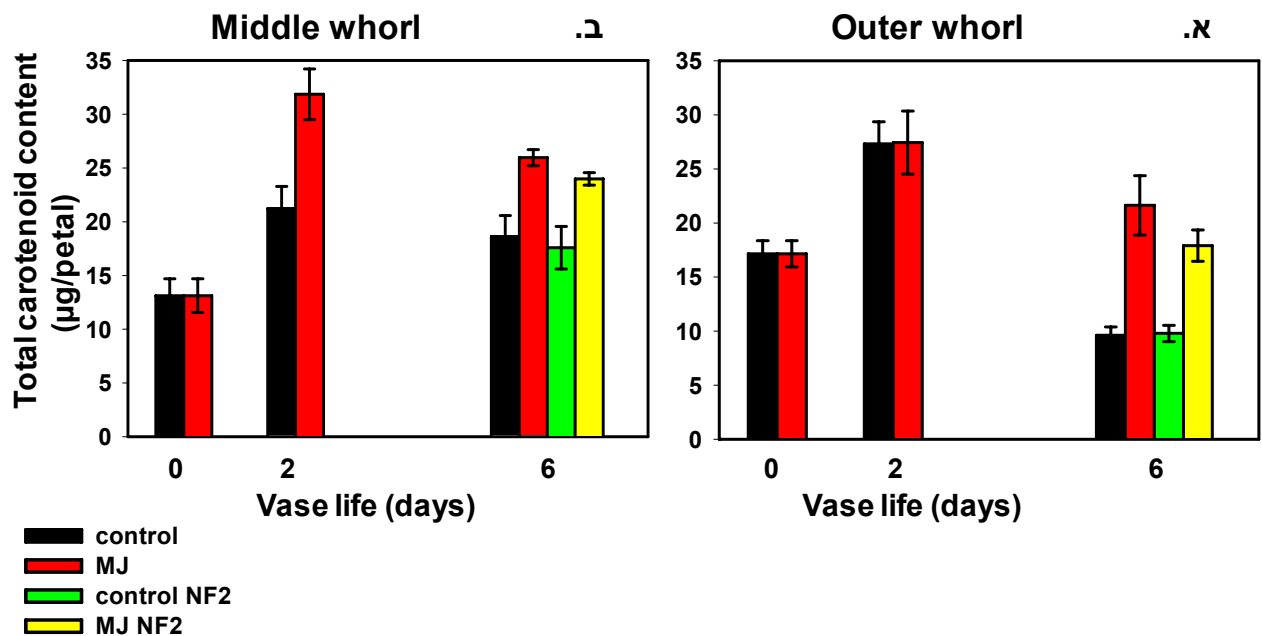


control

NF

**איור 11: השפעת יישום NF על תכולת הקרוטנואידים (א') ומופע הצבע של הפרח (ב') בוורדים מזן 'פריסקו' במהלך חיי האגרטל.**

קרוטנואידים מוצו בימים 0, 2, ו-6 מעלי כותרת מהדור החיצוני של פרחי ביקורת או פרחים שרוסו והוטענו ביום 0 ב- 0.04 mM norflurazon (NF0). תכולת כלל הקרוטנואידים נקבעה עפ"י בליעת האור של המיצויים, שנמדדה בספקטרופוטומטר באורך גל של 441 ננומטר (א'). מופע הפרחים המטופלים ופרחי הביקורת צולם ביום 6 לחיי האגרטל (ב').



**איור 12:** השפעת טיפולים ב-MJ וב-NF על תכולת כלל הקרוטנואידים בעלי הכותרת בדור החיצוני (א) והאמצעי (ב) של ורדים מזן 'פריסקו' במהלך חיי האגרסל. קרוטנואידים מוצו בימים 0, 2, ו-6 מעלי כותרת מהדור החיצוני (א) או האמצעי (ב) של פרחי ביקורת (control), פרחים מטופלים ב-MJ (MJ), פרחי ביקורת שרוססו ב-NF ביום 2 (NF2) או פרחים מטופלים ב-MJ שרוססו והוטענו ב-0.04 mM norflurazon ביום 2 (MJ NF2). הקרוטנואידים כומתו כמתואר באיור 10. נתוני האירורים מייצגים ערכים ממוצעים של חמש חזרות לכל טיפול ± שגיאות תקן.

## ד.2.2. שינויים בהרכב הקרוטנואידים של ורדים מזן 'פריסקו' במהלך חיי האגרטל והשפעת הטיפול ב-MJ על שינויים אלו

כלל הקרוטנואידים מוצו מעלי כותרת מספר 5-7 של פרחי ביקורת ופרחים שטופלו ב-MJ, וכמותם נמדדה (איור 10). מיצויים אלו עברו הפרדה כמתואר בפרק החומרים ושיטות, על מנת לזהות מהו הרכב הקרוטנואידים בזן זה ואילו קרוטנואידים מושפעים מהטיפול ב-MJ. איור 13 מדגים שתי כרומוטוגרמות אופייניות של הקרוטנואידים בעלי הכותרת של הזן 'פריסקו' שמוצו מפרחי ביקורת בימים 0 ו-4 באגרטל. זיהוי הקרוטנואידים נעשה על פי השוואה בין מועד היציאה מהקולונה וצורת ספקטרום הבליעה של כל שיא לבין סטנדרטים ידועים. הקרוטנואידים שזוהו הם:  $\beta$ -carotene, zeaxanthin, antheraxanthin, violaxanthin, neoxanthin. בנוסף לאלו זוהו גם כמויות נמוכות ביותר של הקרוטנואיד phytoene (התוצאות אינן מוצגות). באיור 13 ניתן לראות ירידה כללית בבליעה של כל השיאים בין יום 0 ליום 4, מלבד השיא הראשון, peak 1, שכמעט ואינו מופיע ביום 0 ואילו ביום 4 הוא גבוה ובלוט. החומר המיוצג בשיא הזה יתואר להלן.

תוצאות ההפרדה מראות שהקרוטנואיד העיקרי בעלי הכותרת הוא violaxanthin (איורים 13, 14), ותכולתו היחסית מהווה 70% – 80% מכלל הקרוטנואידים. שני לו הוא neoxanthin אשר תכולתו היחסית מהווה כ-10% מכלל הקרוטנואידים. שני החומרים האלו נמצאים במורד מסלול הבייסיתזה של הקרוטנואידים בצמחים (איור 1). שאר הקרוטנואידים נמצאים באחוזים נמוכים בהרבה ותכולתם היחסית הולכת ופוחתת עוד יותר במהלך חיי האגרטל (איור 14). יחד עם זאת, במהלך חיי האגרטל מצטבר בעלי הכותרת חומר נוסף במגמה הפוכה לקרוטנואידים ובמקביל לירידה בתכולתם. החומר הופיע בכרומוטוגרמה וצויין כ- 'peak 1' (איור 13). לחומר זה ספקטרום בליעה הדומה לזה של קרוטנואידים, אך אורכי הגל המקסימליים שלו (394 nm, 420 nm) הם קצרים מאורכי הגל האופייניים לקרוטנואידים ( $\approx 441$  nm,  $\approx 470$  nm) (Wellburn, 1994).

בהשפעת הטיפול ב-MJ הוגברה כמות כלל הקרוטנואידים במהלך חיי האגרטל (איור 10). יחד עם זאת, הטיפול לא שינה את הרכב הקרוטנואידים בעלי הכותרת ולא הגביר או הוריד את תכולתו היחסית של קרוטנואיד מסויים מתוך ההרכב. כמו בפרחי הביקורת, כך גם בעלי הכותרת של פרחים המטופלים ב-MJ violaxanthin ו-neoxanthin תפסו כ-80%–90% מכלל הקרוטנואידים (תוצאות לא מוצגות). יוצא מן הכלל היה החומר 'peak 1' אשר הצטבר בפרחים המטופלים בכמות קטנה יותר מאשר בפרחי הביקורת. ביום 4 הגיעה תכולתו היחסית של חומר זה ל-17% מתוך כלל הקרוטנואידים בפרחי הביקורת (איור 14) לעומת 3% בלבד בפרחים המטופלים ב-MJ (התוצאה אינה מוצגת באיורים).

לאחר איפיון הרכב הקרוטנואידים וקביעת תכולתו היחסית של כל קרוטנואיד בהרכב, נבחנה השפעת הטיפול ב-MJ על כל תכולתו של כל קרוטנואיד בנפרד במהלך חיי האגרטל (איור 15). ככלל, בפרחי הביקורת נצפתה ירידה בכמותם של כל הקרוטנואידים החל מיום 2. בחלקם החלה הירידה כבר בין יום 0 ליום 2. השפעת הטיפול ב-MJ על הקרוטנואידים השונים החלה ביום 2 והגיעה לשיאה ביום 4 כמפורט להלן.

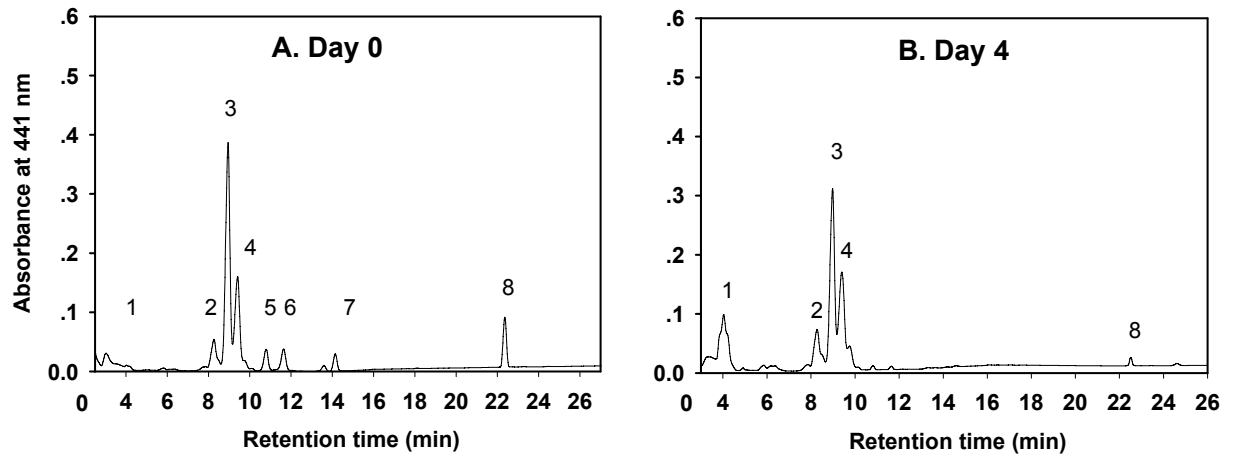
$\beta$ -carotene (איור B15) נמצא בפרחי הביקורת ברמת השיא שלו ביום 0. ביומיים הראשונים לחיי האגרטל קרוטנואיד זה נשמר ברמתו המקורית. בין יום 2 ליום 4 רמת הקרוטנואיד ירדה כמעט כליל, וביום 6 הוא לא אותר כלל. בפרחים המטופלים ב-MJ נשמרת רמתו המקורית של ה- $\beta$ -carotene עד ליום 4, ורמתו ביום זה הייתה גבוהה

פי 6 מרמתו בפרחי הביקורת.

**antheraxanthin** ו- **zeaxanthin** (איור C15, D) נמצאים בפרחי הביקורת בשיא הצטברותם ביום 0. בימים 2-0 רמתם יורדת באופן מואץ ולאחר יום 2 היא ממשיכה לרדת בקצב איטי יותר עד שערכם יורד ל- 0. MJ עיכב את הירידה ברמתם רק החל מיום 2 והם נותרו ברמה קבועה זו עד יום 6. כמות antheraxanthin שנמדדה בפרחים המטופלים ב- MJ ביום 4 הייתה גבוהה פי 10 מאשר בפרחי הביקורת, והבדל זה נשמר גם ביום 6 (איור C15).

**neoxanthin** ו- **violaxanthin** (איור E15, F), המהווים את הקרוטנואידים העיקריים בעלי הכותרת, המשיכו להצטבר בפרחי הביקורת ביומיים הראשונים לחיי האגרסל. ביום 2 הם הגיעו לשיא הצטברותם ולאחר מכן רמתם ירדה בהדרגה. לעומת זאת, בפרחים מטופלים ב- MJ שני קרוטנואידים אלה המשיכו להצטבר בקצב מואץ עד ליום 4, ורמת ה- violaxanthin בעלי הכותרת של הפרחים המטופלים ביום זה הייתה גבוהה פי 3 מאשר זו שבפרחי הביקורת. בנוסף לכך, הכמות המקסימלית של violaxanthin שהצטברה בפרחים מטופלים ביום 4 הייתה גבוהה פי 1.6 מאשר הכמות המקסימלית שנמדדה בפרחי הביקורת ביום 2 (איור E15). תבנית שינויים דומה מצטיירת גם לגבי הקרוטנואיד neoxanthin. ביום 4 כמות ה- neoxanthin בפרחים המטופלים ב- MJ הייתה גבוהה פי 2.6 מאשר בפרחי הביקורת, ומהשוואת כמויות המקסימום עולה שבפרחים המטופלים הכמות הייתה גבוהה פי 2 מאשר בפרחי הביקורת (איור F15).

בניגוד למגמה הכללית של פירוק קרוטנואידים, הקרוטנואיד שהוגדר כ- 'peak 1' הלך והצטבר בפרחי הביקורת עד ליום 4 (איורים 13, 14, A15). בין יום 2 ליום 4, החומר 'peak 1' הצטבר בקצב מואץ (איור A15), במגמה הפוכה לירידה המואצת ברמתם של violaxanthin ו- neoxanthin (איור E15, F). השפעת הטיפול ב- MJ על הצטברות החומר 'peak 1' הייתה גם היא הפוכה להשפעתו על שאר הקרוטנואידים, שכן הטיפול עיכב את הצטברותו. ביום 4 כמותו של 'peak 1' בפרחים מטופלים ב- MJ הייתה נמוכה פי 2.3 מאשר בפרחי ביקורת (איור A15). מהשוואת כמות השיא של 'peak 1' בפרחי ביקורת (ביום 4) מול כמות השיא שלו בפרחים מטופלים ב- MJ (ביום 6) עולה, שכמות 'peak 1' בפרחי הביקורת הייתה גבוהה פי 1.3 מאשר בפרחים המטופלים. מכאן שהטיפול ב- MJ לא רק האט את הצטברותו של 'peak 1' אלא אף מנע אותה חלקית. עם זאת, ייתכן שהחומר 'peak 1' המשיך להצטבר בפרחים המטופלים גם לאחר יום 6, בו הסתיימה המדידה. התוצאות תומכות בהשערה ש- 'peak 1' הוא כנראה תוצר פירוק של קרוטנואידים. תוצאות נוספות שמחזקות השערה זו יוצגו בהמשך העבודה.

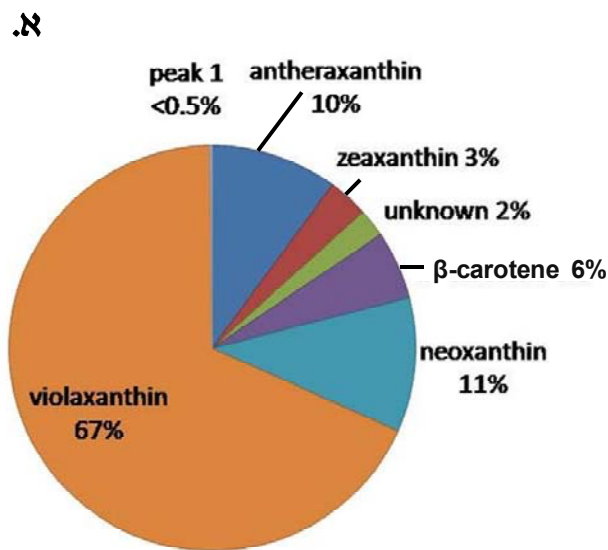


**איור 13:** כרומטוגרמות אופייניות לקרוטנואידים שמוצו מעלי הכותרת של פרחים לא מטופלים מהזן 'פריסקו' ביום 0 (A) וביום 4 (B) במהלך חיי האגרטל.

הקרוטנואידים משלושה עלי כותרת (מס' 5-7) מוצו ב- 1 מ"ל אצטון ביום 0 וביום 4 באגרטל, והופרדו בקולונת C18 Spherisorb. החומרים זהו על פי השוואת זמן היציאה וספקטרום הבליעה של כל פיק לסטנדרטים ידועים, כמתואר בפרק החומרים ושיטות. הפיקים המזוהים ממוספרים ומוגדרים כמפורט להלן:

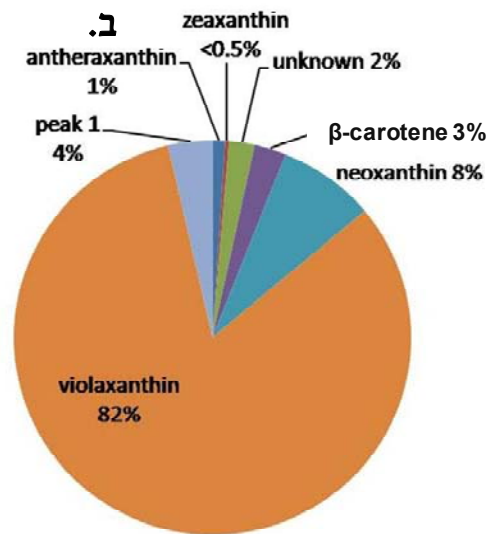
1. peak 1; 2. neoxanthin; 3. violaxanthin; 4. cis-violaxanthin; 5. cis-antheraxanthin; 6. antheraxanthin; 7. zeaxanthin; 8.  $\beta$ -carotene.





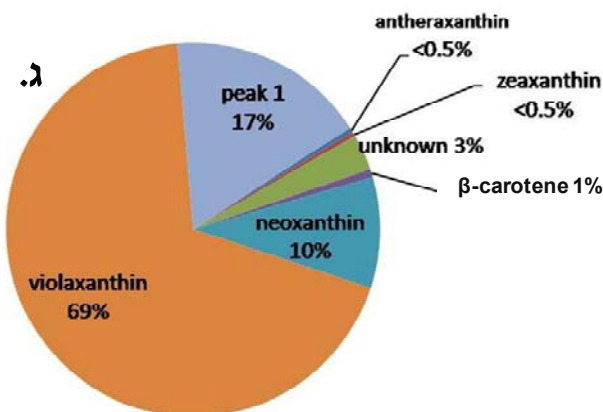
Day 0

10.8 μg carotenoids/g FW



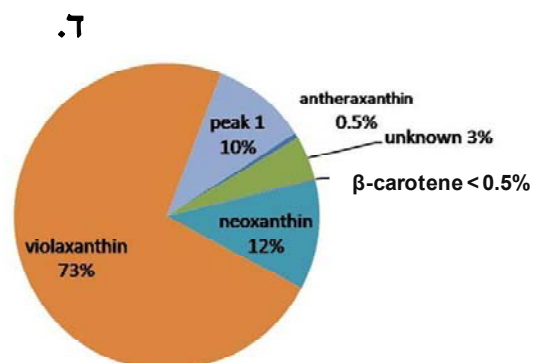
Day 2

12.3 μg carotenoids/g FW



Day 4

7.6 μg carotenoids/g FW

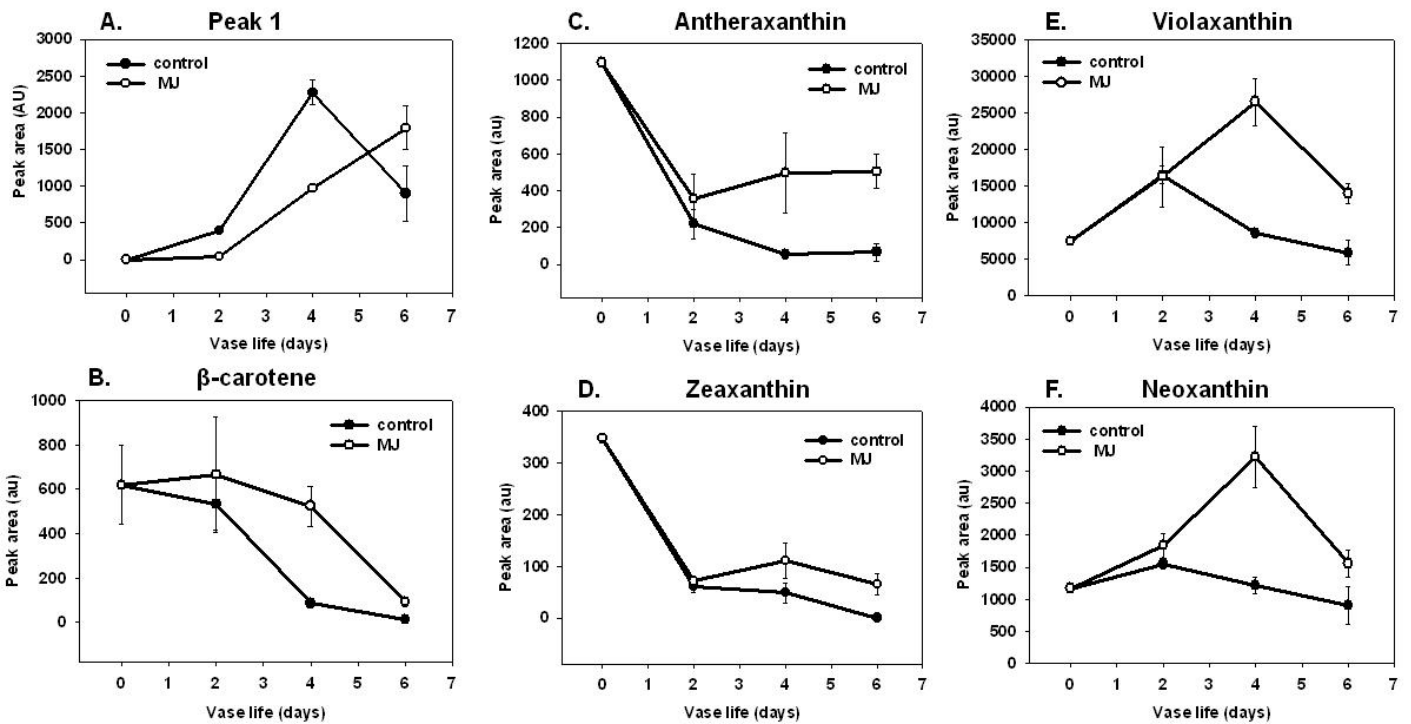


Day 6

4.3 μg carotenoids/g FW

**איור 14:** הרכב הקרוטנואידים ותכולתם היחסית בעלי הכותרת של פרחים לא מטופלים מהזן 'פריסקו' שמוצו בימים 0 (א'), 2 (ב'), 4 (ג') ו-6 (ד') במהלך חיי אגרסל.

הקרוטנואידים מוצו והופרדו כמתואר בפרק החומרים ושיטות. תכולתו היחסית של כל קרוטנואיד בהרכב התקבלה מניתוח שטחי השיאים בכרומטוגרמות בתוכנת Waters Millennium, והשטח היחסי של כלל הקרוטנואידים (כל העיגול) מבטא באופן יחסי את תכולת כלל הקרוטנואידים ברקמה. הערכים המוצגים מהווים ממוצעים של חמש חזרות.



**איור 15: השפעת הטיפול ב-MJ על השינויים בתכולת הקרוטנואידים השונים בעלי הכותרת של פרחי הזן 'פריסקו' במהלך חיי האגרטל.**

כלל הקרוטנואידים מוצו משלושה עלי כותרת כתושים (עלים מספר 5-7) של פרחי ביקורת (●) ופרחים מטופלים ב-MJ (○), הופרדו כמתואר באיור 13 ורמתם נמדדה באורך גל של 441 ננומטר. תכולת הקרוטנואידים מיוצגת באמצעות שטחי השיאים שהתקבלו בכרומטוגרמה. השינויים בתכולת 'peak 1' (A) וכן בתכולת כל אחד מהקרוטנואידים המזוהים - (B) β-carotene, (C) antheraxanthin, (D) zeaxanthin, (E) violaxanthin ו-(F) neoxanthin מוצגים בגרפים נפרדים בעלי תחום ערכי Y בהתאם לתכולתם בעלי הכותרת. הנתונים מייצגים ממוצע של חמש חזרות לכל טיפול ± שגיאת תקן.

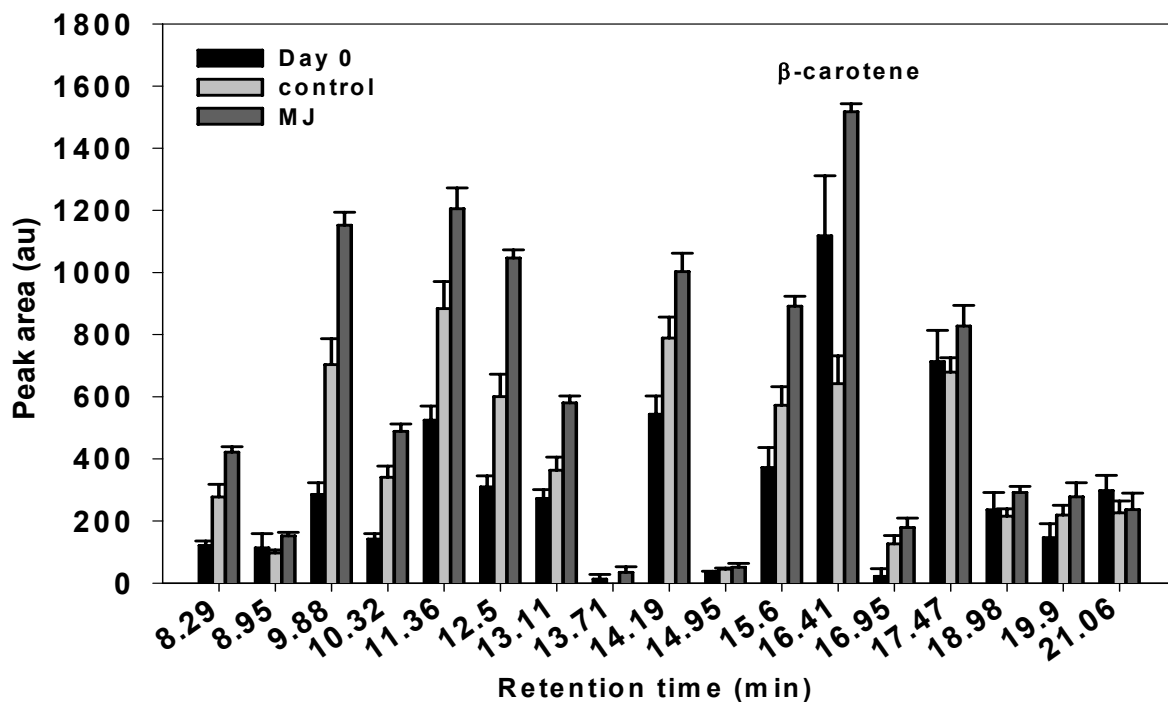
### ד.3.2. שינויים בתכולת הקרוטנואידים ובהרכבם בזן 'גולדן גייט' במהלך חיי האגרטל והשפעת MJ על שינויים אלה

קרוטנואידים מוצו מעלי כותרת מספר 5-7 של פרחי 'גולדן גייט' והופרדו כמתואר בפרק החומרים ושיטות. הקרוטנואיד היחיד שזוהה מתוך כלל הקרוטנואידים בכרומטוגרמה של ההפרדה הזו היה  $\beta$ -carotene, (איור 16), אולם בהסתמך על עבודה קודמת שנערכה במעבדתו של פרופ' הירשברג (הנתונים לא פורסמו) נראה, שלזנים 'פריסקו' ו'גולדן גייט' יש הרכב קרוטנואידים דומה, והגוון השונה ביניהם נובע מתכולה יחסית שונה של הקרוטנואידים. כך למשל, תכולתו היחסית של  $\beta$ -carotene בזן 'גולדן גייט' הייתה גבוהה בהרבה מתכולתו בזן 'פריסקו'.

בכרומטוגרמה של הקרוטנואידים מפרחי 'גולדן גייט' נראים 7-9 שיאים עיקריים ועוד 7 שיאים משניים (איור 16). הסיבה למספר השיאים השונה בין הכרומטוגרמות של הזנים 'פריסקו' (איור 13) ו'גולדן גייט' (איור 16) נובעת מהשיטות השונות של הכנת הדוגמאות להרצה.

חישוב שטחי השיאים המתקבלים מאנליזת ההפרדה מראה, שבזן 'גולדן גייט' נמצאה עלייה בתכולת רוב הקרוטנואידים העיקריים בעלי הכותרת בין יום 0 ליום 5. יוצאים מכלל זה הם  $\beta$ -carotene, שתכולתו יורדת, וכן קרוטנואיד נוסף (retention time 18.98), אשר כמותו ביום 5 שווה לכמותו ביום 0. בפרחים שטופלו ב-MJ כמותם של כל הקרוטנואידים העיקריים ביום 5 הייתה גבוהה מזו שבפרחי הביקורת.  $\beta$ -carotene הצטבר בכמות הרבה ביותר בהשפעת הטיפול ב-MJ (איור 16).

התוצאות עד כה מצביעות על כך שתכולת הקרוטנואידים מוגברת בעלי הכותרת בעקבות הטיפול ב-MJ. בתחילת חיי האגרטל, בימים 0-2, הקרוטנואידים לא התפרקו בדור החיצוני (איור 11א) ובדור האמצעי הטיפול ב-MJ הגביר את תכולתם (איורים 10, 12ב). נראה, שהטיפול ב-MJ הגביר את ייצור הקרוטנואידים בימים אלו. בהמשך חיי האגרטל, בימים 2-6, הקרוטנואידים התפרקו בדור החיצוני של פרחי הביקורת. בהשוואה לפרחי הביקורת, הטיפול ב-MJ הגביר את תכולת הקרוטנואידים בדור החיצוני גם בפרחים שטופלו ב-NF ביום 2 (איור 12א), כנראה בשל עיכוב פירוק הקרוטנואידים בימים אלו. מכאן עולה שמנגנוני הפעולה של MJ כוללים הן עידוד יצירה נוספת של קרוטנואידים והן את עיכוב פירוקם. עיכוב הפירוק עשוי לנבוע מהשפעה של הטיפול על מידור הקרוטנואידים הקיימים בתוך הפלסטידות. בסעיפים הבאים יוצגו תוצאות הניסויים שנערכו לבחינת שלושה מנגנונים אלו.



**איור 16: השפעת הטיפול ב-MJ על השינויים בתכולת הקרוטנואידים השונים בפרחי ורדים מזן 'גולדן גייט' לאחר 5 ימים באגרטל.**

פרחי הזן 'גולדן גייט' טופלו ב-MJ כמפורט באיור 5 והוצבו בחדר התצפית למשך חיי האגרטל. בימים 0 ו-5 נדגמו עלי כותרת מספר 5-7. הקרוטנואידים מוצו מהעלים, הופרדו על גבי קולונת C18 Nova-Pack כמפורט בפרק החומרים ושיטות, וכומתו באורך גל של 441 ננומטר כמתואר בפרק החומרים ושיטות. העמודות בזמן 16.41 מייצגות את הקרוטנואיד  $\beta$ -carotene, אשר זוהה בכרומטוגרמה על פי התאמת זמן הדחיקה שלו וצורת הספקטרום לסטנדרט ידוע. שאר הקרוטנואידים בכרומטוגרמה הזאת אינם מזוהים בוודאות. הנתונים מייצגים את ממוצעים של שטחי השיאים של שלוש חזרות לכל טיפול  $\pm$  שגיאות תקן.

### ד.3. שינויים בביטוי גנים במסלול הביוסינתזה של קרוטנואידים בעלי הכותרת של פרחי ורדים מזן 'פריסקו' והשפעת הטיפול ב-MJ על ביטויים במהלך חיי האגרטל

#### ד.1.3.1. איתור ושיבוט מקטעים מגנים המקודדים לאנזימים במסלול הביוסינתזה של קרוטנואידים בוורדים

במערכות צמחיות שונות נמצא, שבקרת הסינתזה של קרוטנואידים מתרחשת ברמת התעתוק (כמפורט בפרק סקירת הספרות). מהתוצאות שתוארו עד עתה נראה, שבדור האמצעי של עלי הכותרת הטיפול ב-MJ השרה סינתזת קרוטנואידים לפחות ביומיים הראשונים (איורים 10, 12 ב'), ותוצאות ההרצה ב-HPLC הראו שבהשפעת הטיפול ב-MJ, הקרוטנואידים violaxanthin ו-neoxanthin המשיכו להצטבר בעלי הכותרת גם בין יום 2 ליום 4 (איור E15, F). במטרה לבחון את השפעת הטיפול ב-MJ על סינתזת הקרוטנואידים בעלי הכותרת, נבחנו השינויים בביטוי גנים המקודדים לאנזימים במסלול הביוסינתזה של הקרוטנואידים במועדים שונים בחיי האגרטל (ימים 1, 2, 4, ו-5), ונבחנה השפעת הטיפול ב-MJ על ביטויים של גנים אלו.

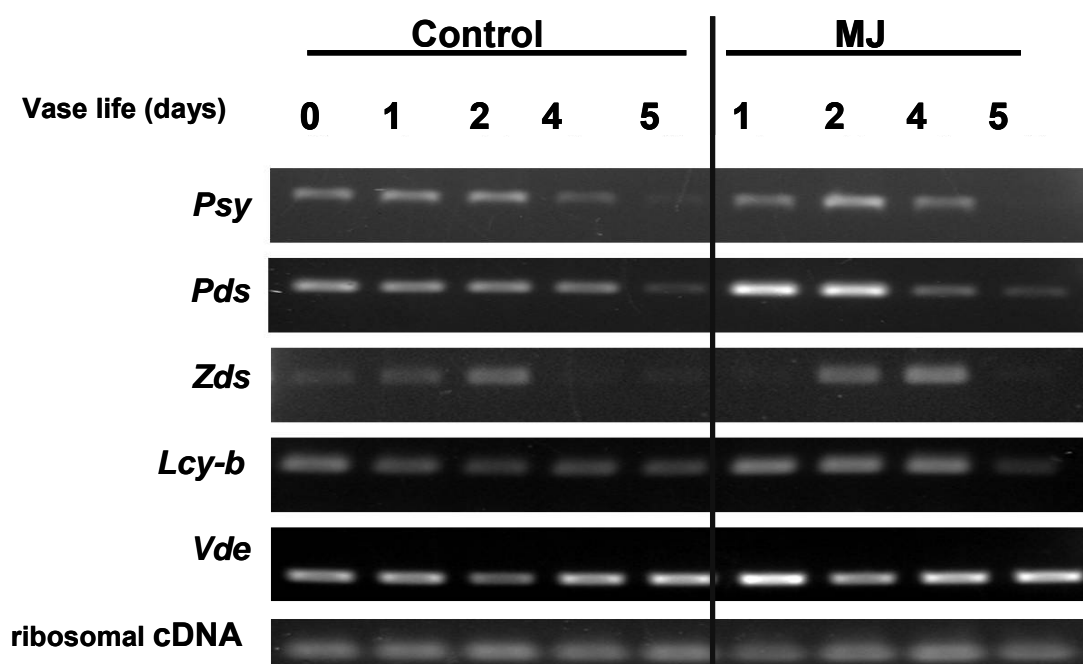
מקטעי הגנים *Phytoene desaturase (Pds)* ו-*Lycopene cyclase (Lcy-b)* שובטו מעלי הכותרת של הזן 'פריסקו' בריאקציית PCR עם תחלים שתוכננו על בסיס ההומולוגיה לגנים אלו מצמחים אחרים. תוצרי הריאקציה שובטו במערכת TA cloning ורצפי החלבונים המקודדים שלהם הושו למאגר NCBI. ההומולוגיה לגנים מקבילים מצמחים אחרים הייתה גבוהה מאד בשני המקטעים ששובטו (איור 17). המקטעים נרשמו במאגר הגנים של NCBI: *Pds* – FJ853597, *Lcy-b* – FJ853596. מקטעי הגנים *Phytoene Synthase (Psy)* ו-*ζ-carotene Desaturase (Zds)* הוגברו מספריית cDNA של ורדים שקיימת במעבדתו של פרופ' וינשטיין (Guterman et al., 2002). מספרייה זו הוגבר גם מקטע הגן *Violaxanthin de-epoxidase (Vde)* אשר אינו חלק ממסלול הביוסינתזה של הקרוטנואידים אלא מקודד לחלבון המזרז דה-אפוקסידציה של violaxanthin ל-antheraxanthin ול-zeaxanthin (איור 1) במסלול ה-xanthophyll cycle (Rockholm and Yamamoto, 1996). מקטע זה שימש כביקורת.

#### ד.3.2. שינויים בביטוי גנים במסלול הביוסינתזה של קרוטנואידים בעלי הכותרת של פרחי ורדים מזן 'פריסקו' והשפעת הטיפול ב-MJ על ביטויים במהלך חיי האגרטל

השינויים בביטוי גנים במסלול הביוסינתזה של קרוטנואידים, *Lcy-b*, *Zds*, *Pds*, *Psy* ובביטוי הגן *Vde* והשפעת הטיפול ב-MJ על ביטוי גנים אלו נבחנו באמצעות sqRT-PCR שבוצע על cDNA מעלי כותרת של פרחי ביקורת ופרחים מטופלים ב-MJ במועדים שונים במהלך חיי האגרטל. באיור 18 מוצגות תוצאות מייצגות מתוך ארבעה ניסויים בלתי תלויים שבוצעו לכל גן בנפרד:

הגן *Psy* מגיע לשיא ביטוי בפרחי הביקורת בימים 1 ו-2. עד ליום 5 ביטוי נחלש בהדרגה בכ- 65%. הטיפול ב-MJ הגביר את ביטוי של הגן *Psy* ביומיים הראשונים לחיי האגרטל בשני ניסויים בלבד מתוך הארבעה. ביטוי הגן *Pds* בפרחי הביקורת היה בשיאו ביום 0. ביומיים הראשונים לחיי האגרטל ביטוי הגן נחלש בכ- 15% ובימים 4-5 ביטוי נחלש עוד בכ- 65%, בדומה ל-*Psy*. הטיפול ב-MJ הגביר את ביטוי הגן *Pds* כמעט פי 2 ביומיים הראשונים של חיי האגרטל.





**איור 18:** השפעת הטיפול ב-MJ על ביטוי גנים ממסלול הביוסינתזה של קרוטנואידים בעלי הכותרת של ורדים מזן 'פריסקו' במהלך חיי האגרטל.

עלי כותרת מספר 5-8 של פרחי ביקורת ופרחים מטופלים ב-MJ נדגמו במועדים שונים במהלך חיי האגרטל. cDNA מהעלים שימש מצע בריאקציות sqRT-PCR עם תחלים לארבעה גנים שונים ממסלול הביוסינתזה של קרוטנואידים, ולגן *Vde* אשר שימש כגן ביקורת. כל ריאקציה בוצעה במקביל עם תחלים ריבוזומליים לזיהוי אחידות ה-cDNA (בתחתית האיור מוצגות תוצאות של הרצה אחת). לינאריות הריאקציות נבחנה עבור כל זוג תחלים בנפרד. מוצגות תוצאות של ניסויים מייצגים מתוך ארבע חזרות ביולוגיות בלתי תלויות שבוצעו לכל גן.

#### 4.ד. שינויים במידור הקרוטנואידים בכרומופלסטידות שבעלי הכותרת במהלך חיי האגרטל והשפעת הטיפול ב-MJ על מידורם

##### 1.4.ד. אנליזה של גנים מספריית הפחתה שביטויים הושפע מהטיפול ב-MJ

ספריית הפחתה גנטית, של פרחים מטופלים ב-MJ ופרחי ביקורת, נבנתה במטרה לאתר גנים הקשורים להגברת הצבע שביטויים מוגבר בפרחים בהשפעת הטיפול ב-MJ במהלך 24 השעות הראשונות לחיי האגרטל. ספריית ההפחתה בוצעה על cDNA שנוצר מעלי הכותרת שנדגמו בשעות 2, 4, 8 ו-24 ממתן הטיפול ב-MJ. הספרייה שובטה ול-600 מושבות מתוכה נערכה אנליזת PCR על מנת לוודא שכל מושבה מכילה מחדר DNA יחיד בטווח הגדלים המצופה. מחדרי DNA שעברו את הסינון הראשוני באנליזת PCR, טופטפו על שני עותקים של ממברנות ניילון בעלות מטען חשמלי חיובי ונסרקו בשיטת reverse Northern כמפורט בפרק החומרים ושיטות. עותק אחד הודגר עם סמנים רדיואקטיביים שהוכנו מ-total mRNA של פרחים מטופלים (forward hybridization) והשני - עם סמנים שהוכנו באותו אופן מפרחי ביקורת (reverse hybridization). מתוך המושבות שנסרקו נמצא ביטוי דיפרנציאלי ל-62 מחדרים. מחדרים אלה עברו ריצוף ונבדקה ההומולוגיה שלהם לחלבונים ידועים באמצעות תוכנת BLASTx. המחדרים נמצאו תואמים ל-27 חלבונים מוכרים ממשפחות שונות, כמו (טבלה 4): גורמי תעתוק (3 גנים), אנזימים המזרזים ייצור של מטבוליטים ראשוניים ומשניים (10 גנים), חלבוני עקות (9 גנים), ועוד. בנוסף, נמצאה הומולוגיה ל-8 חלבונים שתפקודם אינו ידוע. באיור 19 מודגמות תוצאות הסריקה בזוג אחד של ממברנות. בזוג זה נמצאו שני מחדרים שהראו ביטוי דיפרנציאלי ונמצאו הומולוגים לגן *CHRC* שתואר בסקירת הספרות, ולגן ממשפחת *RC12*, המושרים בעקבות עקות קור (Jarillo et al., 1994).

באותו אופן נבנתה ספריית הפחתה נוספת מעלי כותרת שנדגמו במועדים שונים במהלך 48 השעות הראשונות לחיי האגרטל. המחדרים המופחתים בספרייה זו נמצאו הומולוגיים ל-47 גנים משוערים. הגנים שאותרו בשתי ספריות ההפחתה מרוכזים בטבלה 4. 20% מהגנים שנמצאו בשתי ספריות ההפחתה הם הומולוגים לגנים הקשורים למסלולי הגנה מפני עקות ולמסלולים הקשורים בהזדקנות, ואכן ההורמון JA ידוע כמולקולת סיגנל המבקרת תגובות צמחיות במצבי עקות ביוטיות וא-ביוטיות וכן ידועה מעורבות ההורמון בעידוד תהליכי הזדקנות (Howe, 2004). לכן נוכחותם של גנים אלו בספריית ההפחתה הייתה צפויה. יחד עם זאת, באנליזת Northern שבוצעה כדי לאמת את התוצאות, ההבדלים בביטוי הגנים בין פרחי ביקורת לפרחים מטופלים ב-MJ היו מתונים מהצפוי, כמפורט להלן. יש לציין שלא נמצאו בספריית ההפחתה גנים הקשורים למסלול הביוסינתזה של קרוטנואידים.

היברידיזציות Northern בוצעו ל-28 מחדרים מהקבוצות השונות כדי לאשש את אמיתות תוצאות הסריקה. לגבי רוב הגנים שנבחנו באנליזה נמצאו בין הפרחים המטופלים ב-MJ לבין פרחי הביקורת הבדלים כמותיים בלבד ומינוריים יחסית למצופה. לא נמצאו גנים שהטיפול ב-MJ השרה את ביטויים, אלא רק גנים שביטויים הוגבר מעט בעקבות הטיפול. ההבדלים המשמעותיים ביותר בין הטיפול לביקורת נמצאו ב-6 מחדרים שהראו הומולוגיה לגנים הבאים (איור 20): *Superoxide dismutase (SOD)*, *Polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP)*, *Dehydrin*, *RCI-2*, *Extensin*,  $\Delta$ -9-Desaturase. כך למשל, ביטוי הגנים *SOD* ו-*PGIP* התגבר בכ 25% בעקבות הטיפול ב-MJ בשעה השמינית מתחילת הטיפול.

כאמור, בתוך כלל המחדרים בספריית ההפחתה שביטויים עלה בעקבות הטיפול ב-MJ נמצא מחדר הומולוגי

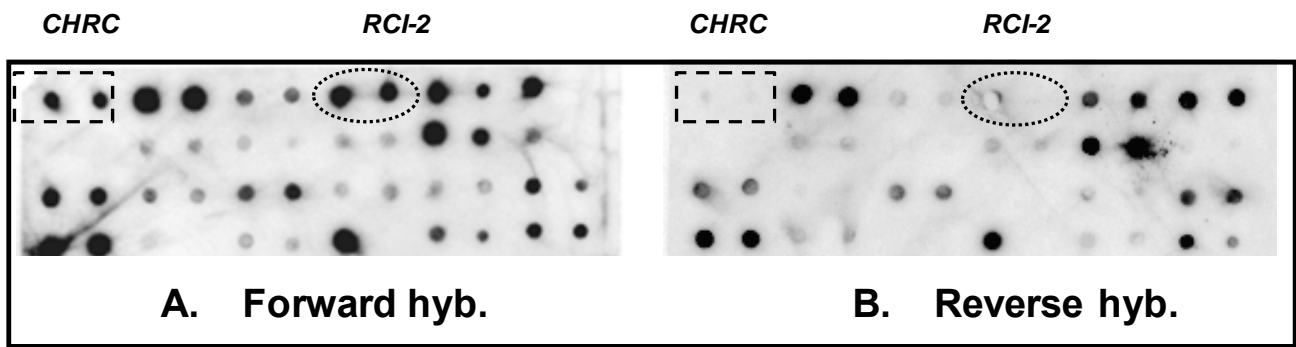


לגן שמקודד לחלבון המבני CHRC (איור 19, טבלה 4). חלבון זה משתתף באריזת הקרוטנואידים בתוך הכרומופלסטידות (Vishnevetzky et al., 1996, 1999). לאור זאת, ייתכן ש-MJ משפיע על מידור הקרוטנואידים בכרומופלסטידות באמצעות השפעתו על חלבון זה ועל הגן המקדד לו, ולכן הוחלט לבצע אנליזות מפורטות של שני גורמי מפתח אלה כמוצג להלן.

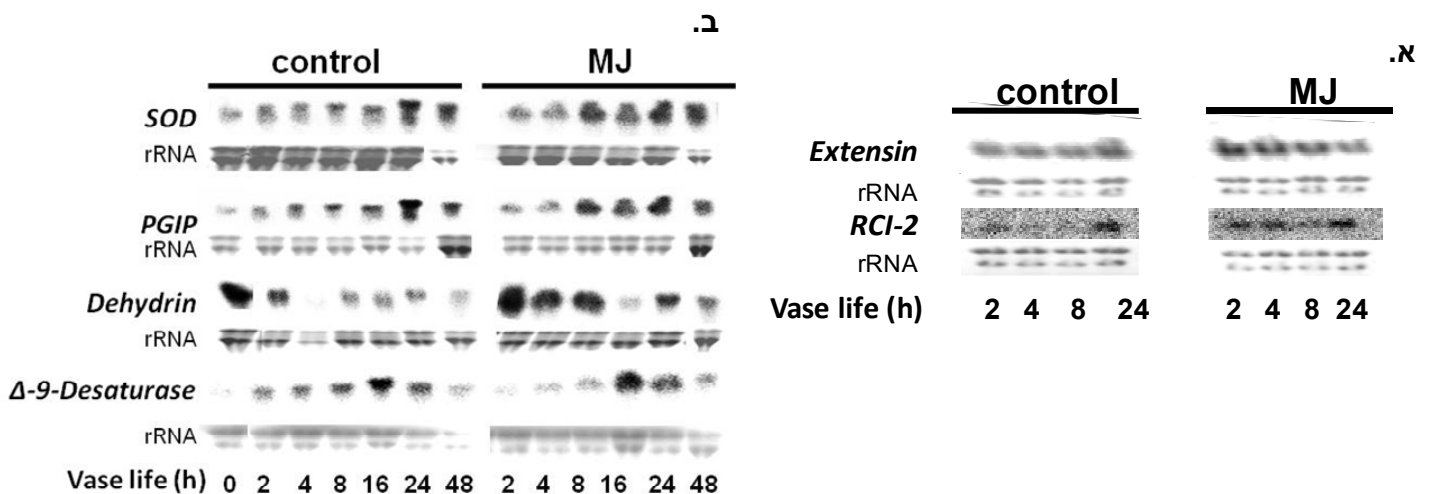
**טבלה 4: ספריית הפחתה לגנים שבודדו מעלי כותרת מפרחי הזן 'פריסקו' ושהושפעו מהטיפול ב-MJ ב-48 השעות הראשונות לחיי האגרסל.**

סיכום תוצאות סריקת BLASTx למחדרים שהראו ביטוי דיפרנציאלי בהיברידיזציות reverse Northern שבוצעו לשני ניסויי ההפחתה, והתאמת התפקוד האפשרי לכל מחדר על פי ההומולוגיה שלו לחלבונים ידועים. עמודת הכוכביות מייצגת את עוצמת ההבדל בביטוי בין ממברנת forward לממברנת reverse (\* = עוצמה חלשה; \*\*\* = עוצמה חזקה).

Putative function	Intensities	Putative function	Intensities
<b><u>cell cycle DNA replication and division</u></b>		<b><u>Primary and secondary metabolism</u></b>	
alpha Tubulin	**	ABC transporter	*
beta-Tubulin 1	*	Allergen-like protein	**
Translationally Controlled Tumor Protein	***	Aquaporin	**
60S ribosomal protein L10-	*	Aaquaporin plasma membrane	***
60S ribosomal protein L4	**	ATP synthase delta subunit	**
ElongationFactor-1 alpha	***	ATP:citrate lyase	**
Actin	**	Farnesyl diphosphate synthase precursor	***
Coatomer	**	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	**
Pyrophosphatase	***	NAD-dependent sorbitol dehydrogenase	**
Ubiquitin conjugating enzyme 8	***	Orcinol O-methyltransferase	***
		UDP glucose phosphorylase	**
<b><u>gene transcription</u></b>		UDP glucose epimerase	***
14-3-3 protein	**	Soluble Acid Invertase	**
MADS-box protein	**	Alkaline alpha Galactosidase	**
putative rac protein	**	beta Galactosidase	***
Myb	**	Expansin	***
		Xyloglucan Endotransglycosylase	**
<b><u>stress, defence &amp; senescence</u></b>		beta glucidase	**
Bowman-Birk type proteinase	*	Ferredoxin	**
Chaperonin-60 beta subunit	**	Oxidoreductase	**
Dehydration-induced Protein RD22	**	Zeatin Glucosyltransferase	**
Extensin-like Protein	**	Auxin Influx Protein	***
Phospholipid Hhydroperoxide Glutathione	***	Leucoanthocyanidin Dioxygenase	***
<b>plastid-lipid protein/ fibrillin precursor (CHRC)</b>	**	Lipid Transfer Protein	**
Stearoyl-CoA 9-Desaturase	**	Annexin	**
Blt101/RCI2- cold induced protein	***	Plasma Membrane Polypeptide	**
Cystein Proteinase	***		
Superoxide Dismutase	**	unknown	
Polygalacturonase Inhibitor Protein (PGIP)	**		
Serine Carboxypeptidase	**		
Dehydrin	***		
Senescence-associated Protein	***		
beta Xylodase	***		
Fructokinase Zinc Finger	**		
			20 sequences



**איור 19:** היברידיזציית reverse Northern לגנים מספריית ההפחתה שהופקו מעלי כותרת של פרחי הזן 'פריסקו' במהלך 24 השעות הראשונות שלאחר הטיפול ב-MJ (A) בהשוואה לגנים שהופקו מפרחי הביקורת (B). מחדרים מהקלונים של ספריית ההפחתה הוגברו ב-PCR וטופטפו באופן זהה על שתי ממברנות ניילון טעונות. ממברנה אחת הודגרה עם סמן רדיואקטיבי,  $\alpha$ - $P^{32}$  cDNA, שהוכן מ- total mRNA של פרחים מטופלים ב-MJ (A), והשנייה עם סמן שהוכן מ- total mRNA של פרחי ביקורת (B). ביטוי מוגבר של מחדרים בממברנת forward לעומת ביטוי מופחת של אותם מחדרים בממברנת reverse מודגם עבור הגנים CHRC ( ) ו- RCI-2 (○).



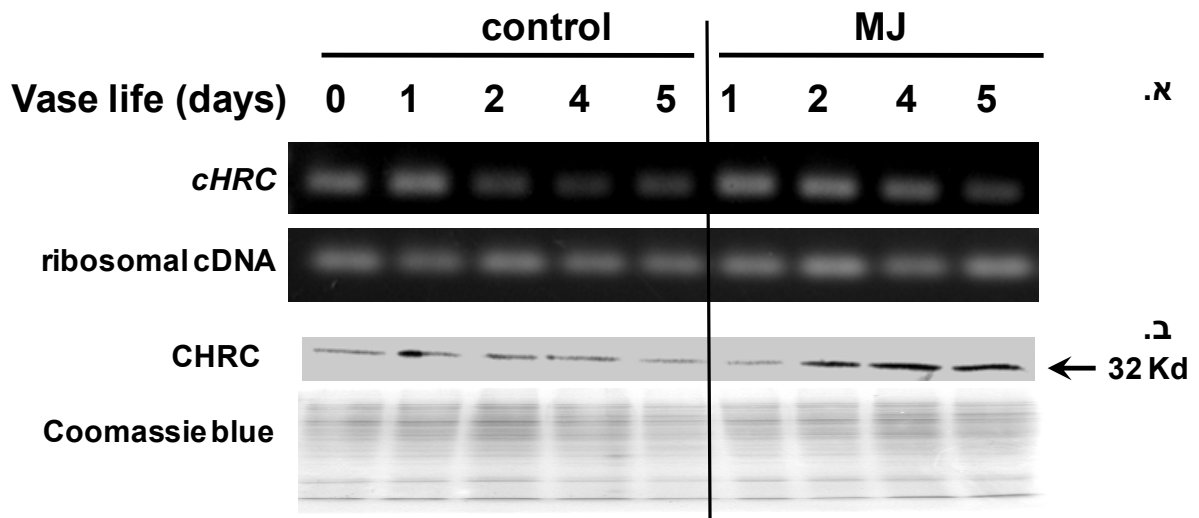
**איור 20:** אנליזות Northern Blot לגנים שונים מספריית ההפחתה שהופקו מעלי כותרת של פרחי הזן 'פריסקו' עם וללא טיפול ב-MJ.

דגימה של RNA 20  $\mu$ g הופקה מפרחים מטופלים ב-MJ ומפרחי ביקורת במועדים שונים במהלך היממה (א) או שתי היממות (ב) הראשונות שלאחר הטיפול ב-MJ. ה-RNA הוספג בממברנה והודגר עם סמנים רדיואקטיביים,  $\alpha$ - $P^{32}$  cDNA, שהוכנו מהקלונים שהראו ביטוי דיפרנציאלי באנליזת reverse Northern. היברידיזציות עם סמנים שהוכנו ממחדרים של הגנים *Extensin* ו-*RCI-2* במהלך 24 השעות הראשונות לאחר מתן הטיפול ב-MJ (א); היברידיזציות עם סמנים שהוכנו ממחדרים של הגנים *SOD* (*Superoxide dismutase*), *(PGIP) Polygalacturonase-inhibiting protein*, *Dehydrin* ו- $\Delta$ -9-*Desaturase* במהלך 48 השעות הראשונות לאחר מתן הטיפול ב-MJ (ב). תוצאות הביטוי של כל מחדר מוצגות בהשוואה ל-rRNA ריבוזומלי (rRNA) שצולם בג'ל עם אתידיום ברומיד במועדים המקבילים.

#### ד.4.2. השתנות דפוס הביטוי של הגן *RhCHRC* ורמת החלבון שלו בעלי כותרת של ורדים מזן 'פריסקו' במהלך חיי האגרטל והשפעת הטיפול ב-MJ על שינויים אלה

בהיברידיזציית Northern לבחינת ביטוי הגן *RhCHRC* במועדים שונים במהלך 24 השעות הראשונות לחיי האגרטל שלאחר הטיפול ב-MJ נמצא, שביטוי אינו משתנה בצורה משמעותית לאורך היממה הראשונה של חיי האגרטל, והטיפול ב-MJ לא הגביר את ביטוי הגן ביממה הזו (תוצאות לא מוצגות). למרות זאת, מאחר ולחלבון זה יש תפקיד בשמירה על שלמות הקרוטנוואידים בעלי הכותרת, הוחלט לבחון את ביטוי הגן ונוכחות החלבון גם בהמשך חיי האגרטל, וכן את השפעת הטיפול ב-MJ על רמת הביטוי והנוכחות שלהם.

באנליזות sqRT-PCR נמצא, שבפרחי ביקורת רמת ביטוי הגן *RhCHRC* היתה בשיאה ביום 1 ואחריו התרחשה ירידה מהירה וחזקה ברמתו. בפרחים מטופלים ב-MJ ירידה זו עוכבה וביטוי הגן *RhCHRC* היה גבוה מזה של פרחי הביקורת עד ליום 5 (איור 21א). בהמשך נערכה אנליזת Western לחלבונים שהופקו מפרחים מטופלים ב-MJ ומפרחי ביקורת בימים 1-5, עם נוגדן ראשוני כנגד CHRC מצמחי מלפפון (Vishnevetsky et al., 1996). בתום ההגבה עם הנוגדן השינוי נראתה על הממברנה סדרת פסים (איור 21ב) שהייתה בגודל הצפוי של החלבון, 32.6 kD (Dafny-Yelin et al., 2005). בפרחי הביקורת רמת החלבון הייתה יציבה עד ליום 4, ובין יום 4 ליום 5 חלה ירידה ברמה. בפרחים מטופלים ב-MJ רמת החלבון הייתה גבוהה יותר מאשר בפרחי ביקורת החל מיום 2, ורמה גבוהה זו נשמרה בפרחים המטופלים לאורך כל התקופה הנבדקת (איור 21ב).



**איור 21:** השפעת הטיפול ב-MJ על ביטוי הגן *RhCHRC* (א', ב') ורמת החלבון CHRC (ג') בעלי כותרת מפרחי הזן 'פריסקו' במהלך חיי האגרטל.

א. אנליזת sqRT-PCR לבחינת ביטוי הגן *RhCHRC* בעלי כותרת מספר 5-8 של פרחי ביקורת ופרחים מטופלים ב-MJ במהלך 5 ימים באגרטל. התחלים נוצרו על פי הרצף שהתקבל למקטע הגן הזה בספריית ההפחתה. האנליזה בוצעה בשיטות שתוארו לעיל. מוצגות תוצאות מייצגות של ניסוי אחד מתוך ארבע חזרות ביולוגיות.

ב. אנליזת Western Blot לבחינת שינויים ברמת החלבון CHRC במהלך 5 ימים באגרטל. האנליזה בוצעה עם דגימות של 25 µg חלבון שהופקו מעלי כותרת של פרחים מטופלים ב-MJ ופרחי ביקורת, הורצו ב-SDS-PAGE, הוספגו בממברנת ניטרוצלולוז והודגרו למשך הלילה עם נוגדן ראשוני שהופק כנגד CHRC מפרחי מלפפון. התוצאות מוצגות בהשוואה לצביעת Coomassie שנערכה בהרצה מקבילה של אותן כמויות חלבון בג'ל נפרד.

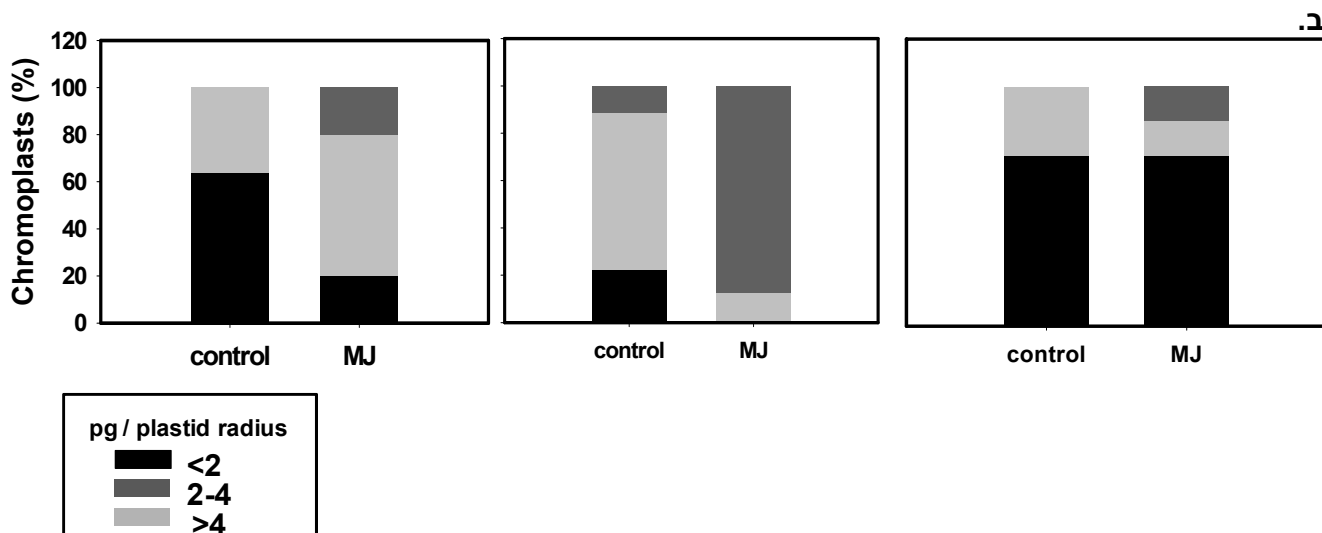
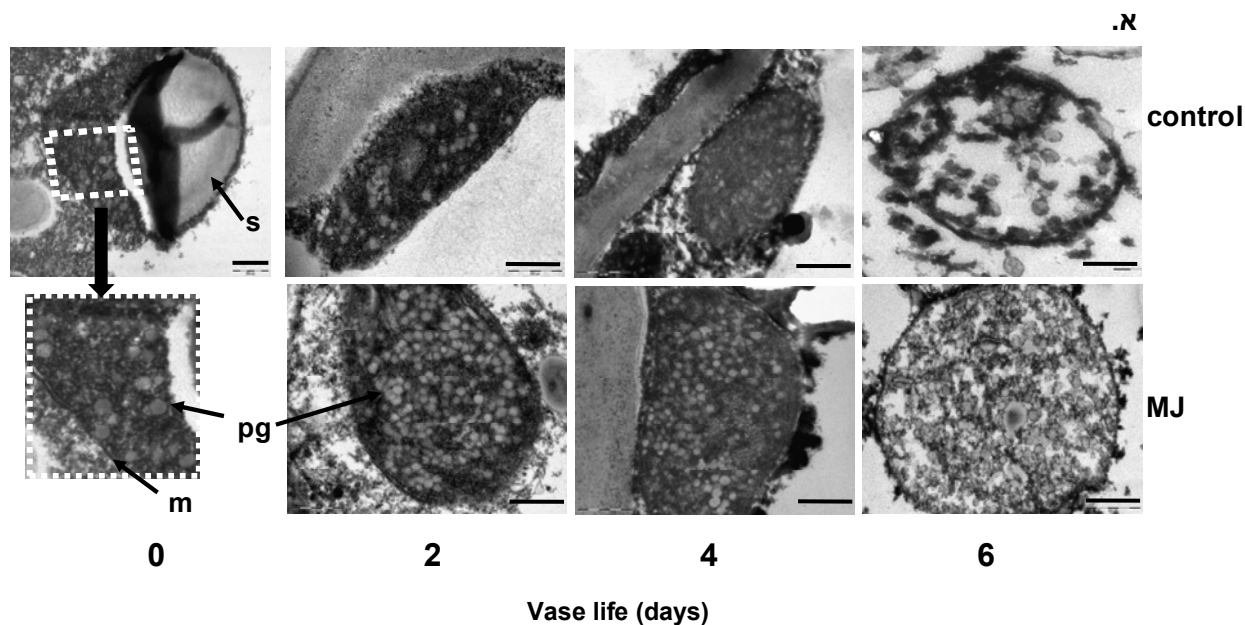
### 3.4.4. שינויים במבנה הפנימי של הכרומופלסטידות בעלי כותרת של ורדים מזן 'פריסקו' במהלך חיי האגרטל והשפעת הטיפול ב-MJ על המבנה

החלבון CHRC משתתף באריזת הקרוטנואידים למבנים פנימיים בתוך הכרומופלסטידות (Vishnevetsky et al., 1996). על פי מודלים שונים הוצע, ששכבות של ליפידים ו-CHRC עוטפות את הקרוטנואידים ומאפשרות את מידורם (Deruere et al., 1994). בעקבות תוצאות האנליזה לחלבון CHRC שבודד מורדים (איור 21) הוחלט לבחון כיצד משפיע הטיפול ב-MJ על המבנה הפנימי של הכרומופלסטידות בעלי כותרת של ורדים מזן 'פריסקו'. ההנחה היתה, שהגברת רמת החלבון ע"י MJ תבטא בשינויים בכמות הפלסטוגלובולות שבתוך הכרומופלסטידות או בצורתם.

עלי כותרת של פרחי ביקורת ופרחים מטופלים ב-MJ נדגמו במהלך חיי האגרטל. באיור 22 מוצגות תמונות מייצגות של כרומופלסטידות מעלי כותרת של פרחי ביקורת ופרחים מטופלים ב-MJ. ביום 0 בלטו גרגרי עמילן אשר תפסו את רוב נפח הפלסטידות. בשולי הפלסטידות ניכרו הפלסטוגלובולות. בפרחי הביקורת בין יום 2 ליום 4 מספר הפלסטוגלובולות בכרומופלסטידות עלה. ביום 4 נצפה המספר הגבוה ביותר של פלסטוגלובולות בכרומופלסטידות של פרחי הביקורת, וביום 6 מספרן ירד ברוב הכרומופלסטידות. ביום זה גם נצפו כרומופלסטידות בשלבי פירוק ובעלי גבולות פרוצים. כדי לכמת את מספר הפלסטוגלובולות, הכרומופלסטידות שנצפו בכל דגימה סווגו ל-3 קבוצות על פי מספר הפלסטוגלובולות לכרומופלסטידה בשקלול גודל הכרומופלסטידה שנקבע עפ"י הרדיוס שלה. הסקאלה שהוגדרה כללה:  $<2 =$  כרומופלסטידות דלילות בפלסטוגלובולות;  $2-4 =$  כרומופלסטידות בעלות צפיפות ביניים;  $>4 =$  כרומופלסטידות מאוכלסות בצפיפות בפלסטוגלובולות (איור 22). בפרחי הביקורת נצפו כרומופלסטידות מאוכלסות בצפיפות רק ביום 4 וביום זה הן היוו כ-10% מכלל הכרומופלסטידות. כרומופלסטידות הדלילות בפלסטוגלובולות נצפו בפרחי הביקורת במהלך כל חיי האגרטל. תכולתן מתוך כלל הכרומופלסטידות נעה בין 60-70% בימים 2 ו-6 לבין 20% ביום 4. לעומת זאת, בפרחים שטופלו ב-MJ הכרומופלסטידות הכילו יותר פלסטוגלובולות במהלך כל חיי האגרטל (תמונות מייצגות באיור 22). מהשוואה בין פרחים מטופלים לפרחי ביקורת נראה, שהחל מיום 2 ולאורך כל חיי האגרטל נמצאו בפרחים המטופלים ב-MJ יותר כרומופלסטידות המאוכלסות בצפיפות בפלסטוגלובולות מאשר בפרחי הביקורת, כאשר ביום 4 הכרומופלסטידות מקבוצה זו היוו 90% מכלל הכרומופלסטידות. ביום זה כלל לא נצפו כרומופלסטידות דלילות בפלסטוגלובולות בחתכים מהפרחים המטופלים ב-MJ (איור 22). הניסוי הנ"ל נערך בשלושה מועדים שונים לאורך השנה. המגמה המתוארת נשמרה בניסויים השונים, אולם בין הניסויים הייתה שונות שנבעה כנראה מקצב שונה של פירוק הפלסטוגלובולות. כך לדוגמה באחד הניסויים הייתה דחייה בפירוק הפלסטוגלובולות ולכן ביום 4 לא נראה הבדל במספר הפלסטוגלובולות בכרומופלסטידות של פרחים מטופלים ב-MJ לבין אלה של פרחי הביקורת. מנגד, באותו ניסוי בפרחי הביקורת הכרומופלסטידות היו כבר מפורקות ביום 6, בעוד שבפרחים המטופלים ב-MJ הכרומופלסטידות נותרו שלמות (התוצאות לא מוצגות).

כאמור, דהייט הצבע מתפתחת מהקצה העליון של עלה הכותרת הבודד כלפי בסיסו הפנימי (איור 25). גם בעלי כותרת של פרחים מטופלים ב-MJ הדהייה מתחילה מהקצה החיצוני של עלה הכותרת, אלא שהיא מתרחשת בקצב יותר איטי (איור 25). לכן נבחנו חתכים אשר נלקחו משני קצותיו של אותו עלה כותרת ביום 4 לחיי האגרטל במטרה לבחון את ההבדל במבנה הכרומופלסטידות הממוקמות בקצה העליון הדהוי לבין אלה הממוקמות בקצה הפנימי הצהוב של עלה הכותרת. ההבדל בין שני הקצוות ניכר במיוחד בשלמות מעטפת הכרומופלסטידות – בקצה

העליון, הדהוי, כ- 50% מהכרומופלסטטידות היו בשלבי פירוק ובעלות גבולות פרוצים, בעוד שבקצה הפנימי הצהוב רק 6% מהכרומופלסטטידות היו בשלבי פירוק (תמונות מייצגות באיור 23א). בנוסף, הכרומופלסטטידות בקצה הצבעוני אכן הכילו מספר פלסטוגלובולות רב יותר: כ- 60% מהכרומופלסטטידות סווגו בקבוצת צפיפות הביניים ו- 30% סווגו בקבוצת הכרומופלסטטידות הדלילות בפלסטוגלובולות, לעומת הקצה העליון הדהוי בו התונה הייתה הפוכה, כאשר 30% מהכרומופלסטטידות סווגו בקבוצת צפיפות הביניים ו- 60% מהכרומופלסטטידות סווגו בקבוצת הכרומופלסטטידות הדלילות בפלסטוגלובולות (איור 23ב).

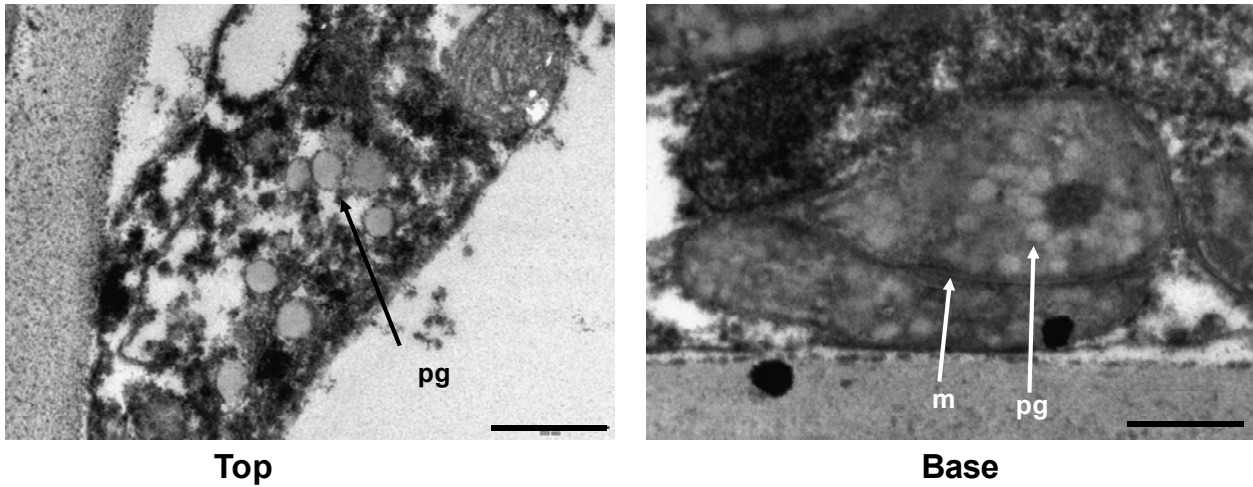


**איור 22:** השפעת הטיפול ב-MJ על שינויים במבנה הכרומופלסטידות (א') ועל התפלגות כמות הפלסטוגלובולות בכרומופלסטידות (ב') בעלי כותרת של ורדים מזן 'פריסקו' במהלך חיי האגרטל.

**א.** מיקרוגרפיות של כרומופלסטידות מחתכים של עלי כותרת, שנדגמו מפרחי ביקורת ופרחים מטופלים ב-MJ במהלך חיי האגרטל בימים 2, 4, ו-6, טופלו כמפורט בפרק שיטות המחקר, נצפו במיקרוסקופ אלקטרוני חודר וצולמו. באיור מוצגות תמונות מייצגות בהן נראות הפלסטוגלובולות כעיגולים אפורים בתוך הכרומופלסטים, וכן הגדלה של הצילום של מיום 0. קנה מידה = הבר מייצג  $0.5\ \mu M$  =  $pg$  = פלסטוגלובולות; S = גרגירי עמילן; m = ממברנה.

**ב.** התפלגות כמות הפלסטוגלובולות בכרומופלסטים במהלך חיי האגרטל: הכימות בוצע ב-5-9 כרומופלסטידות שאותרו בחתכים. הכרומופלסטידות מכל דגימה סווגו ל-3 קבוצות על פי מספר הפלסטוגלובולות שנצפו בהן בשקלול עם רדיוס הכרומופלסט, כאשר  $<2 =$  כרומופלסטידות דלילים בפלסטוגלובולות;  $2-4 =$  כרומופלסטידות עם פלסטוגלובולות בצפיפות ביניים;  $>4 =$  כרומופלסטידות מאוכלסים בצפיפות בפלסטוגלובולות. הנתונים מייצגים את אחוז הכרומופלסטידות בכל קבוצה מתוך כלל הכרומופלסטידות שנצפו בדגימה. מוצגות תוצאות של ניסוי מייצג מתוך שלוש חזרות ביולוגיות.

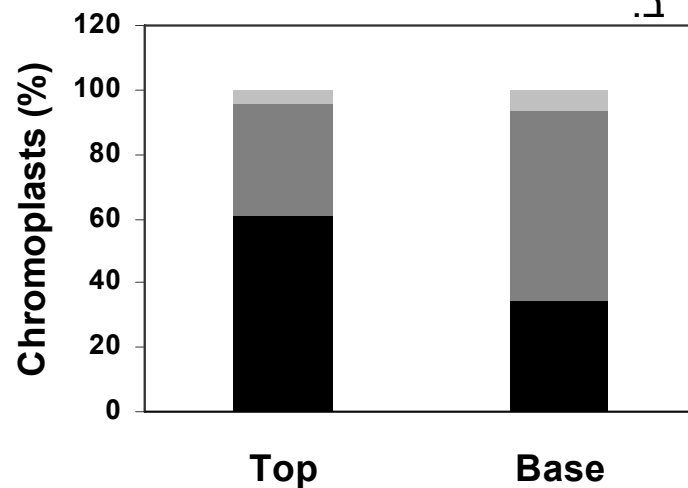
א.



Top

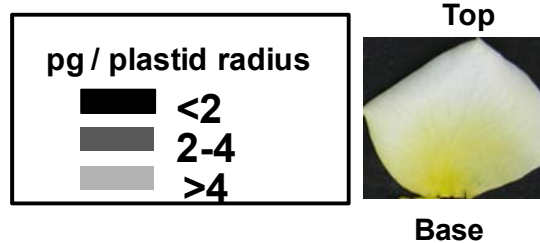
Base

ב.



Top

Base



**איור 23:** השפעת מיקום הכרומופלסטידות בעלה הכותרת של פרחי הזן 'פריסקו' על המבנה שלהם (א) ועל התפלגות מספר הפלסטוגלובולות בהם (ב) לאחר 4 ימים באגרסל.

א. מיקרוגרפיות של כרומופלסטידות מחתכים שנדגמו מהקצה העליון הדהוי (Top) או מהבסיס הצבעוני (Base) של עלה הכותרת שנקח מפרח ביקורת ביום 4 לחיי האגרסל. הדגימות טופלו כמפורט באיור 22. קנה מידה = הבר מייצג  $0.5 \mu\text{M}$ . pg = פלסטוגלובולות; S = גרגירי עמילן; m = ממברנה.  
 ב. התפלגות כמות הפלסטוגלובולות בכרומופלסטים שנדגמו כמתואר לעיל וכמודגם בתמונה. הכימות בוצע כמפורט באיור 22 במדגם של 23-30 כרומופלסטידות.

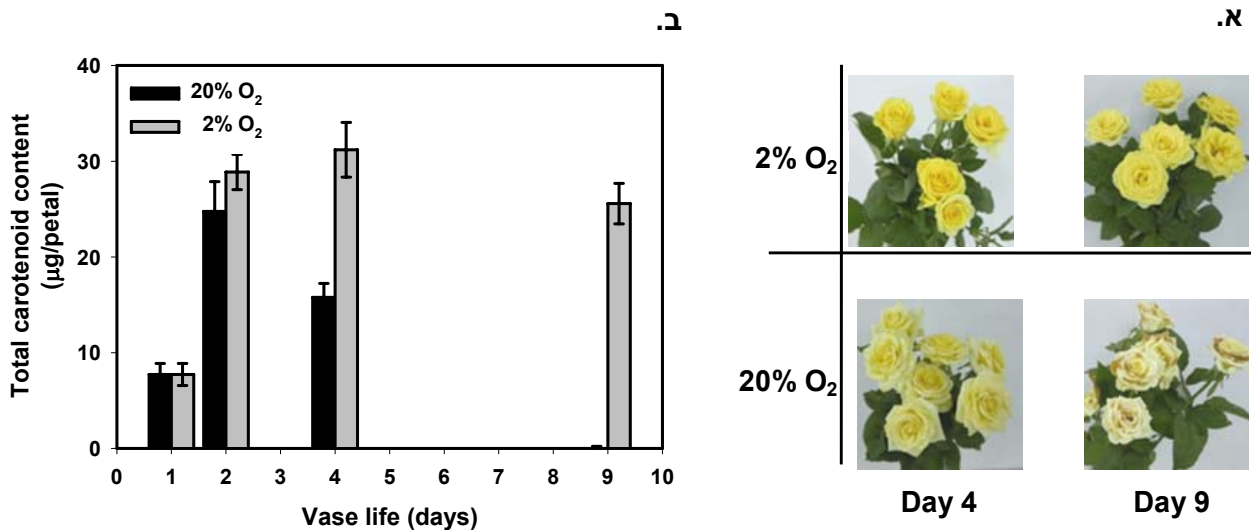


## 5.ד. איפיון של תהליכי חמצון המעורבים בפירוק של קרוטנואידים בעלי הכותרת של ורדים מהזן 'פריסקו' ובחינת השפעת הטיפול ב-MJ על תהליכים אלה

### 5.ד.1. השפעת הדגרה באווירה מעוטת חמצן על פירוק הקרוטנואידים

דהיית הצבע בעלי הכותרת של ורדים מהזנים 'פריסקו' ו'גולדן גייט' נובעת מירידה בתכולת הקרוטנואידים הצהובים בעלי הכותרת. התוצאות שהוצגו באיור 12 הראו שהטיפול ב-MJ עיכב את תהליך הפירוק של הקרוטנואידים. כמפורט בסקירת הספרות, תהליך פירוק הקרוטנואידים הוא בעיקרו תהליך חימצוני המזורז באמצעות חלבוני CCD. שיערנו, שגם בעלי הכותרת הירידה בתכולת הקרוטנואידים נובעת מפירוקם ע"י תהליכי חימצון. כדי לאמת השערה זו השתמשנו באחד האמצעים הידועים לעיכוב תהליכי חימצון ע"י הורדה משמעותית בריכוז החמצן באווירה בה שוהים הפרחים.

פרחים קטופים מזן 'פריסקו' הודגרו בחדר התצפית למשך 24 שעות בתמיסת כלורין אורגני ולאחר מכן הועברו לתאי אווירה מבוקרת בתנאי חמצן נמוך (2%) או בתנאי חמצן אטמוספריים כביקורת. מהתוצאות המוצגות באיור 24 נראה, שפרחי הביקורת הגיעו לתכולת השיא של קרוטנואידים בעלי הכותרת ביום 2, שלאחריו חלה ירידה בתכולתם, ואילו בפרחים שהודגרו באווירת חמצן נמוך לא חלה ירידה ברמת הקרוטנואידים לאחר יום 2. ביום 4 הדהייה ניכרה בפרחי הביקורת (איור 24א), וכמות הקרוטנואידים בפרחים ירדה ל- 60% מרמת השיא שנצפתה ביום 2 (איור 24ב). לעומת זאת הפרחים שהודגרו בתנאי חמצן נמוך היו ביום 4 בעלי גוון צהוב חזק (איור 24א) ורמת הקרוטנואידים בהם הייתה דומה לרמתם ביום 2 (איור 24ב). ביום 9 פרחי הביקורת היו חסרי צבע צהוב ונראו לבנים לגמרי (איור 24א), ורמת הקרוטנואידים בפרחים אלו הייתה אפסית (איור 24ב). לעומתם, הפרחים שהודגרו באווירת החמצן הנמוך היו עדיין צהובים ביום 9 (איור 24א), ותכולת הקרוטנואידים שלהם הייתה קרובה לרמת השיא של פרחי הביקורת ביום 2 באגרטל (איור 24ב). תוצאה זו מצביעה על כך שהתהליכים המעורבים בפירוק הקרוטנואידים בעלי הכותרת של ורדים מזן 'פריסקו' עוכבו בתנאי חמצן נמוך. מכיוון שחלבוני CCD מזרזים את תהליך חימצון הקרוטנואידים, שובטו הגנים המקודדים לחלבונים אלו מעלי כותרת של ורדים, ובוצע מעקב אחר ביטויים במהלך חיי האגרטל עם טיפול ב-MJ ובלעדיו, כמפורט בסעיפים הבאים.



**איור 24: השפעת הדגרה באווירה מעוטת חמצן על מופע הפרחים (א') ועל תכולת כלל הקרוטנואידים (ב') בעלי הכותרת של פרחי הזן 'פריסקו'.**

פרחים קטופים הוצבו בחדר התצפית למשך 24 שעות בתמיסת כלורין אורגני ולאחר מכן הודגרו באגרסלים בתאי אווירה מבוקרת באור פלואורסצנטי רציף ב- 20 מ"צ בתנאי חמצן נמוך (2%) או בתנאי חמצן אטמוספריים (20%) כביקורת, למשך 9 ימים. הפרחים צולמו לאחר 4 ו- 9 ימים (א'). הקרוטנואידים הופקו מעלי כותרת מספר 5-7 בימים שונים במהלך ההדגרה, וכומתו בספקטרופוטומטר באורך גל של 441 ננומטר (ב'). הנתונים מייצגים ממוצעים של שש חזרות ± שגיאות תקן.

#### 2.5.ד. שיבוט מקטעים מהגנים *RhCCD1* ו- *RhCCD4* ומיקום החלבונים של גנים אלה בתא

מקטעי הגנים *RhCCD1* ו- *RhCCD4* אותרו ב- cDNA מעלי כותרת של פרחי 'פריסקו' בריאקציית PCR עם תחלים שתוכננו על בסיס ההומולוגיה לגנים אלו מצמחים אחרים. תוצרי הריאקציה שובטו והמקטעים נרשמו במאגר הגנים של NCBI: *RhCCD1* - GQ150681 ו- *RhCCD4* - GQ150680 (*Rosa hybrida*). במקביל לעבודתנו, פורסמו במאגר הגנים גם הרצפים המלאים של הגנים *RdCCD1* ו- *RdCCD4* מפרחי *Rosa damascena*. הרצפים שפורסמו שימשו לתכנון תחלים נוספים לריצוף אזורי קצה 5' של הגנים בזן 'פריסקו'. ההומולוגיה בין הרצפים המתורגמים מהזן 'פריסקו' (*Rosa hybrida*) לגנים המקבילים מ- *Rosa damascena* הייתה גבוהה מאד בשני המקטעים (איור 25). גם ההומולוגיה בין הגנים משני סוגי הוורדים השונים לבין ארבידופסיס הייתה גבוהה. כאמור בסקירת הספרות, החלבון AtCCD4 אותר בפלסטוגלובולות של כלורופלסטים מעלי ארבידופסיס (Ytterberg et al., 2006). אמנם באיור 25 נראה שב- CCD4 ההומולוגיה בקצה 5' בין הוורדים לארבידופסיס היא נמוכה יחסית לשאר חלקי החלבון, אך ניתוח ממוחשב של הרצפים מ'פריסקו' ומארבידופסיס (Emanuelsson et al., 2007) חזה, שגם החלבון *RhCCD4* מכיל

פפטיד מוביל לכלורופלסטים (טבלה 5). מאחר ובעלי הכותרת אין כלורופלסטים, מוצע שמיקומו התאי של RhCCD4 בעלי הכותרת של פרחי ורדים הוא בכרומופלסטים. אותו ניתוח חזה שאורך הפפטיד המוביל בורדים הוא 74 חומצות אמינו לעומת 34 בארבידופסיס. בשונה מ-RhCCD4, ניתוח הרצף של RhCCD1 העלה שחלבון זה אינו מכיל פפטיד מוביל (טבלה 5).

## RhCCD1

	10	20	30	40	50	60	70
<i>Rosa hybrida cv. Frisco</i>	MAEVVEKRHDDDDVKEKLSNGIVVVPNPKPSKGVSTSLVDTLRKLI AKLMYDSSQPHH-LAGNFAPVIEET						
<i>Rosa damascena</i>	MAEVVEKRHDDDDVKEKLSNGIVVVPNPKPSKGVSTSLVDTVKELIVKLMYDSSQPHHYLAGNFAPVIEET						
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MAEKLSD-----GSSITISVHPRPSKGFSSKLLDLLERLVKLMHDA SLELHYLSGNFAPIRDET						
	80	90	100	110	120	130	140
<i>Rosa hybrida cv. Frisco</i>	ASTKDLHVIGHLPDCLNGEFVRVDPNPKFGPVAGYHWFDDGXIHGMRIKDGKATYVSRVYVKT SRLMQEE						
<i>Rosa damascena</i>	PPTKDLHVIGHLPDCLNGEFVRVGNPKFAPVAGYHWFDDGMIHGMRIKDGKATYVSRVYVKT SRLKQEE						
<i>Arabidopsis thaliana</i>	PPVKDLPVHGFLECLNGEFVRVGNPKFDAVAGYHWFDDGMIHGVRIKDGKATYVSRVYVKT SRLKQEE						
	150	160	170	180	190	200	210
<i>Rosa hybrida cv. Frisco</i>	YFGGAKFMKVGDLKGLFGLLMVNMQLRAKLVLDLSYGHGTGNTAFV-----						
<i>Rosa damascena</i>	YFGGAKFMKVGDLKGLFGLLMVYMQQLRAKLVLDLSYGHGTGNTAFVYHHGKLLALS EGDKPYVLKVLE						
<i>Arabidopsis thaliana</i>	FFGAAKFMKI GDLKGF FGLLMVNVQQLR TKLKI LDNTYGNGTANTALVYHHGKLLALQ EADKPYVIKVLE						

## RhCCD4

	10	20	30	40	50	60	70
<i>Rosa hybrida cv. Frisco</i>	MDALSSS-FLSTLPTRSSTTAAPKLTPTKSLDISSVRIEERPTTQTPPKTTAPQFLPKQTPPPP--SYSS						
<i>Rosa damascena</i>	MDALSSS-FLSTLPTRSSTTAAPKLTPTKSLNIISSVRIEERPTTQTPPKTTTPQPPKQTPPPPPSYSS						
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MDSVSSSSFLSSTFSLHHSLLRRRSSPTLLRINS AVVEERSPITNPSDNDRRKNPKTLHNRNTNHTLVS						
	80	90	100	110	120	130	140
<i>Rosa hybrida cv. Frisco</i>	PPPTKPNAPALPAVIFNLFDDFINNFVDPVRSVNPQALSGNFAPVT-ELPPTQCQVIKRLITLRSRR						
<i>Rosa damascena</i>	PPPTKPNAPALPAVIFNLFDDFINNFVDPVRSVDPKQALSGNFAPVT-ELPPTQCQVIKGS LPSALDGDG						
<i>Arabidopsis thaliana</i>	SPPKLRPEMTLATALETTVEDEVINTFTDPPSRPSVDPKHLVSDNFAPVLDLPPPTDCEI LHGTLPLSLNG						
	150	160	170	180	190	200	210
<i>Rosa hybrida cv. Frisco</i>	RFTSRNGPQPSVTS PRGPHYHLFDGDGMLHSIR-----						
<i>Rosa damascena</i>	AYI-RNGPNP-QYLP RGPYHLFDGDGMLHSIRISQGRAVLCSR FVKTYKYTV ERDAGFLLPNVFSGFNG						
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AYI-RNGPNP-QFLPRGPYHLFDGDGMLHAIKLHNGKATLCSRYVKTYKYNV EKQTGAPVMPNVFSGFNG						

### איור 25: שיבוט מקטעי הגנים *RhCCD1* ו-*RhCCD4*

תחלים לגנים *RhCCD1*, ו-*RhCCD4* תוכננו על בסיס הומולוגיה לצמחים אחרים ושימשו בריאקציית PCR עם cDNA template מעלי כותרת של פרחי הזן 'פריסקו'. תוצרי הריאקציה שובטו, רוצפו והרצפים המתורגמים הושוו לרצפי החלבונים המקבילים מ-*Rosa damascena* ו-*Arabidopsis thaliana*.

**טבלה 5:** ניתוח ממוחשב של רצף חומצות האמינו בחלבונים *RhCCD1*, *RhCCD4*, *AtNCED4* לחיזוי של קיום פפטיד מוביל לכלורופלסטים.

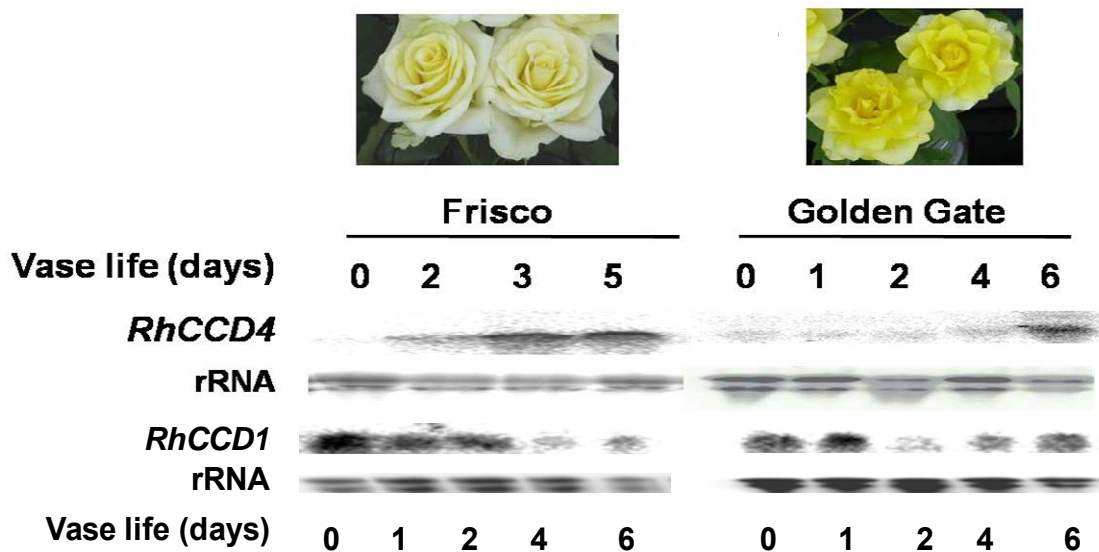
קבוצה של 90 חומצות אמינו מהקצה '5 של הרצפים המתורגמים של הגנים *RhCCD1*, *RhCCD4*, *AtNCED4* הוזנה לתוכנת הניתוח transitP (Emanuelsson et al., 2007), המחשבת את הסיכוי לקיומו של פפטיד מוביל להכוונת החלבון לאתרים שונים בתא: לכלורופלסטים (cTP), למיטוכונדריה (mTP), אל מחוץ לתא (SP), או אף אחת מהאפשרויות הנ"ל (other). תחזית מיקום החלבון (location) נקבעת על פי האתר שקיבל את הציון הגבוה ביותר. אמינות התחזית (RC) בסולם של 1-5 נקבעה על פי היחס בין המיקום בעל הציון הגבוה ביותר לבין המיקום שדורג שני:  $1 = \text{יחס} < 0.8$ ,  $2 = 0.8 < \text{יחס} < 0.6$ . המספר המשוער של חומצות האמינו אשר מרכיבות את הפפטיד המוביל מצויין בעמודה TP len. האות C בעמודה Location מציינת שהחלבונים מכילים פפטיד מוביל לכלורופלסט.

שם	אורך	פפטיד מוביל לכלורופלסטים	פפטיד מוביל למיטוכונדריה	אל מחוץ לתא	אחר	מיקום	אמינות התחזית	אורך הפפטיד המוביל
Name	Length	cTP	mTP	SP	Other	Location	RC	TP len
AtNCED4	90	0.944	0.133	0.054	0.008	C	1	34
RhCCD4	90	0.928	0.068	0.07	0.101	C	1	74
RhCCD1	90	0.176	0.052	0.049	0.922	-	2	-

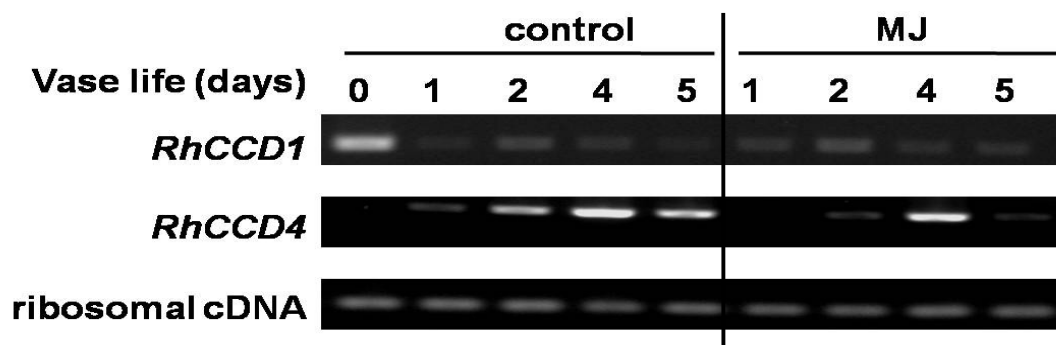
### 3.5.ד. שינויים בביטוי הגנים *RhCCD1* ו-*RhCCD4* בזנים 'פריסקו' ו'גולדן גייט' במהלך חיי האגרטל והשפעת הטיפול ב-MJ על ביטויים

בפרחי חרצית (*Chrysanthemum morifolium*) הגן ההומולוגי, *CmCCD4a*, נמצא אחראי לפירוק מואץ של הקרוטנואידים ולהלבנת עלי הכותרת (Ohmiya et al., 2006). לאור נתונים אלו שיערנו ש-*RhCCD4* מזרז את פירוק הקרוטנואידים בכרומופלסטים שבעלי הכותרת של פרחי 'פריסקו'. ביטוי הגן *RhCCD4* נבדק באנליזת Northern בשני הזנים 'פריסקו' ו'גולדן גייט' הנבדלים זה מזה בתהליך פירוק הקרוטנואידים ודהיית הצבע. בזן 'פריסקו' החל מהיום השני, שבו גם מתחילה דהיית הצבע, עלתה רמת ביטוי הגן והוא נשאר ברמת ביטוי גבוהה עד ליום החמישי. בזן 'גולדן גייט' המאחר לדהות, *RhCCD4* נותר ברמת ביטוי בסיסית עד ליום 5 והעלייה ברמתו התרחשה רק ביום 6 (איור 26). אנליזה מקבילה נערכה לגן *RhCCD1*. בשני הזנים רמת הביטוי של *RhCCD1* הייתה גבוהה ביותר בתחילת חיי האגרטל. בזן 'פריסקו' ביטוי הגן הלך ונחלש מיום 0 לאורך התקופה הנבדקת, ואילו בזן 'גולדן גייט' רמה גבוהה של ביטוי הגן הייתה ביום 1 ועלייה נוספת בביטוי הגן חלה אחרי יום 2 (איור 26). תוצאה זו מצביעה על כך שאין התאמה בין ביטוי הגן *RhCCD1* למהלך התפרקות הקרוטנואידים בעלי הכותרת, כפי שתואר בסעיף 1.1.ד ובאיור 5. בהמשך, נבחנה השפעת הטיפול ב-MJ על רמת ביטוי הגנים *RhCCD1* ו-*RhCCD4* בעלי הכותרת של פרחי 'פריסקו' לאורך חיי האגרטל (איור 27). אנליזת sqRT-PCR בוצעה ל-cDNA שבודד מעלי הכותרת בימים 0, 1, 2, 4, 5 לחיי האגרטל. בפרחי הביקורת התקבלו התוצאות הצפויות מאנליזת ה-Northern: בימים 0-1 רמת ביטוי הגן *RhCCD4* הייתה אפסית עד חלשה ביותר, אך רמת ביטוי עלתה ביום 2 והגיעה לשיאה ביום 4. ביום 5 ביטוי הגן

נחלש מעט יחסית לרמת השיא, אך עדיין נותר ברמה גבוהה יותר מביטוי ביום 2. לעומת זאת, בפרחים המטופלים ב-MJ רמת ביטוי הגן *RhCCD4* הייתה נמוכה בהרבה מזו שבפרחי הביקורת במהלך כל חיי האגרטל: בימים 0-2 רמת ביטוי הגן הייתה אפסית עד חלשה ביותר. ביטוי הגן *RhCCD4* בפרחים המטופלים הגיע לשיאו ביום 4, אך גם ביום זה הביטוי היה נמוך יותר בהשוואה לביטוי בפרחי הביקורת, וביום 5 ביטוי הגן ירד שוב לרמה אפסית (איור 27). התוצאות מציעות שהטיפול ב-MJ עיכב את פירוק הקרוטנואידים על ידי הורדת ביטוי הגן *RhCCD4*. גם באנליזה המקבילה שבוצעה לגן *RhCCD1* התקבלו התוצאות הצפויות מאנליזת ה-Northern: בפרחי הביקורת רמת ביטוי הגן הייתה בשיאה ביום 0, ולוותה לאחר מכן בירידה חדה ברמת הביטוי בימים 2-5. בגן זה, בניגוד ל-*RhCCD4*, לטיפול ב-MJ לא הייתה השפעה על רמת הביטוי. לאחרונה פורסם שהחלבון RdCCD4 שבודד מוורדים *Rosa damascena*, זרז *in vitro* פירוק של הקרוטנואיד 8'-apo-β-caroten-8'-al (Huang et al., 2009). לאור זאת, התוצאות דלעיל תומכות באפשרות שפירוק הקרוטנואידים בכרומופלסטידות, המוביל לדהיית עלי הכותרת, מזורז כנראה על ידי האנזים RhCCD4 ולא על ידי RhCCD1.



**איור 26.** ביטוי הגנים *RhCCD1* ו-*RhCCD4* בעלי כותרת של פרחי הזנים 'פריסקו' ו'גולדן גייט' במהלך חיי האגרטל. דגימות RNA 20 µg הופקו במועדים שונים במהלך חיי האגרטל מעלי כותרת של פרחים מזן 'פריסקו' ומזן 'גולדן גייט'. דגימות ה-RNA הוספגו בממברנות טעונות חיובית והודגרו עם סמן רדיואקטיבי לגן *RhCCD4* או לגן *RhCCD1*. בתחתית האיור מוצג צילום UV של ה-rRNA בתום ההרצה בג'ל עם אתידיום ברומיד לפני הספגה בממברנה והדגרה עם הסמנים.



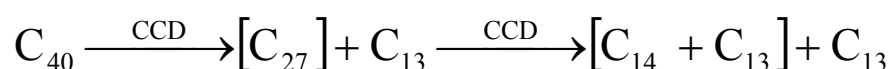
**איור 27:** השפעת הטיפול ב-MJ על ביטוי הגנים *RhCCD1* ו-*RhCCD4* בעלי כותרת של פרחי הזן 'פריסקו' במהלך 5 ימים באגרטל.

התחלים סונתזו על פי הרצף של מקטעי הגנים *RhCCD1* ו-*RhCCD4* אשר בודדו מפרחי ורדים מהזן 'פריסקו'. ביטוי הגן נבדק בעלי כותרת מספר 5-8 במועדים שונים במהלך חיי האגרטל באמצעות אנליזת sqRT-PCR בשיטות שתוארו לעיל. מוצגות תוצאות מייצגות של ניסוי אחד לכל גן מתוך ארבע חזרות ביולוגיות.

#### 4.5.ד. איפיון 'peak 1' כתוצר הפירוק החימצוני של violaxanthin

בוורדים תוארו שני תוצרי פירוק של violaxanthin ע"י CCD: האחד בגודל  $C_{27}$  המכונה sinensiaxanthin, ותוצר פירוק נוסף בגודל  $C_{14}$  המכונה rosafluene (Eugster and Märki-Fischer, 1991). על פי המשוער התוצרים התקבלו מהתגובה המתוארת בנוסחה 1:

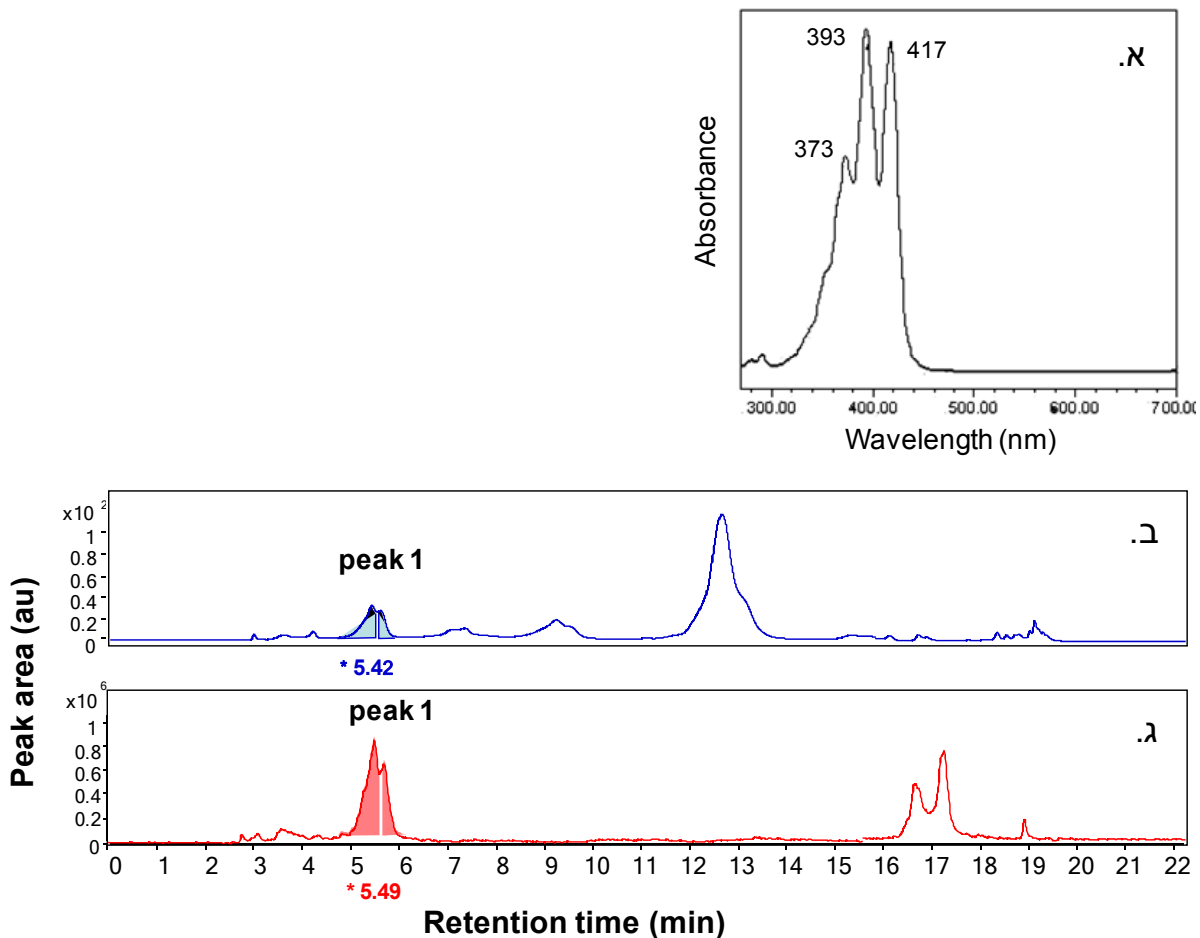
נוסחה 1:



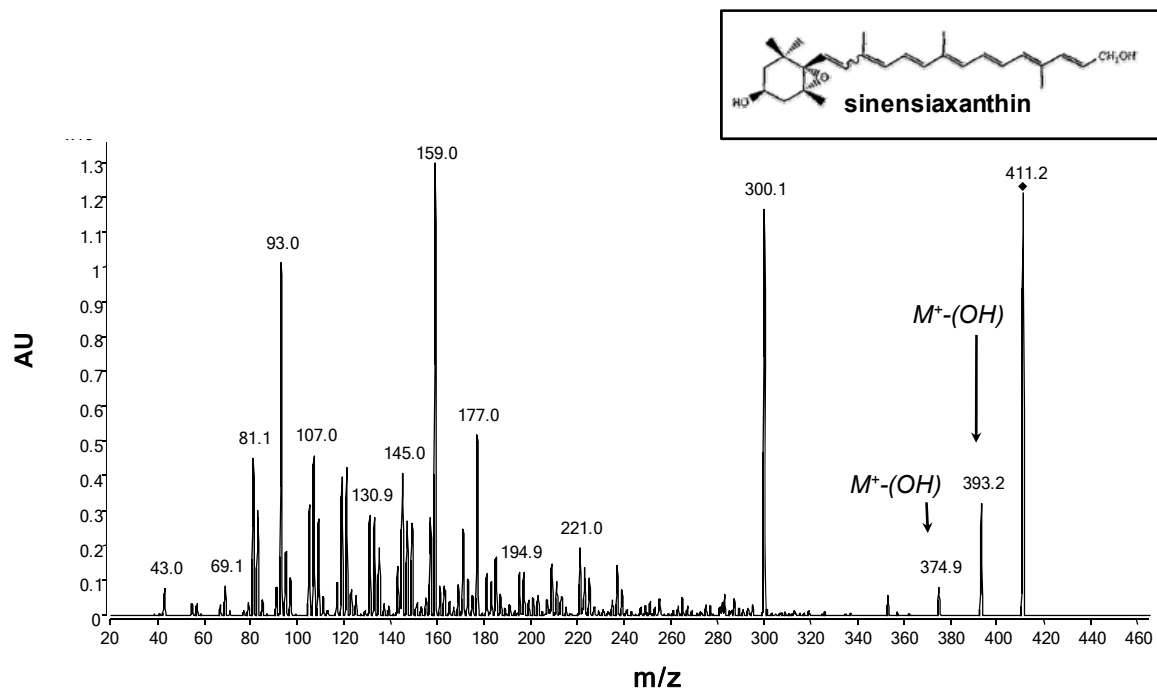
באנליזת הפרדת הקרוטנואידים התגלה החומר 'peak 1' אשר הצטבר במהלך חיי האגרטל של פרחי הזן 'פריסקו' במגמה הפוכה להתפרקות הקרוטנואידים (איורים 13, 14) ואשר הטיפול ב-MJ מעכב את הצטברותו (איור A15). שיערנו שחומר זה הוא תוצר פירוק של קרוטנואידים, בפרט של violaxanthin, המהווה את הקרוטנואיד העיקרי בפרחי הזן 'פריסקו' (איור 14).

על מנת לברר האם 'peak 1', שאותר באנליזת HPLC של הקרוטנואידים (איור 13), אכן מזוהה כמולקולה sinensiaxanthin, נבדק ספקטרום הבליעה שלו. התוצאות המוצגות באיור 28 מראות, שספקטרום הבליעה של החומר 'peak 1' הוא בעל שלושה שיאי בליעה, האופייניים לספקטרום הבליעה של קרוטנואידים, באורכי גל 393, 373, 417 ננומטר. שיאים אלו הם כמעט זהים לשיאי הבליעה באורכי גל 393, 373, 418 ננומטר שדווחו בספרות עבור sinensiaxanthin (Eugster and Märki-Fischer, 1991). בנוסף, מיצוי הקרוטנואידים שהופרד באותם תנאים עבר אנליזה במכשיר LC-MS, והתקבלו כרומטוגרמות עם גלאי UV ועם גלאי מסות. החומר 'peak 1' מופיע על גבי

הכרומטוגרמה עם גלאי UV באורך גל של 393 ננומטר בזמן של 5.42 דקות (איור 28ב). בכרומטוגרמת יינון המולוקולות (extracted ion chromatogram) נמצא, שמסת היינון של החומר 'peak 1' היא  $m/z = 411$  (איור 28ג). מסה זו זהה למסת היינון המחושבת של המולקולה sinensiaxanthin. בנוסף, ביינון שני (LC/MS-MS) נמצא, שלחומר זה יש שתי קבוצות הידרוקסיל, כצפוי מהמבנה המתואר של sinensiaxanthin (איור 29). תוצאות אלו מחזקות את ההשערה שהחומר 'peak 1' הוא אכן המולקולה sinensiaxanthin, תוצר הפירוק של violaxanthin. בכרומטוגרמה של כלל הקרוטנואידים לא נמצא כל חומר במסת היינון הצפויה למולקולה rosafluene ( $m/z = 221$ ) (התוצאות אינן מוצגות).



**איור 28. ספקטרום הבליעה של החומר 'peak 1' (א'), ואנליזת LC/MS לכלל הקרוטנואידים שבודדו מעלי כותרת של פרחי הזן 'פריסקו', המראה כרומטוגרמת UV (ב') וכרומטוגרמת מסות (ג') עבור המיצוי.**  
 החומר 'peak 1' שזוהה באנליזת HPLC המוצגת באיור 13 נסרק לגבי ספקטרום הבליעה שלו בטווח אורכי הגל של 300-500 ננומטר (א'). הקרוטנואידים מוצו מעלי כותרת מספר 5-7 של פרחי 'פריסקו' ביום 4, עברו הפרדה בקולונת C18 Spherisorb ואנליזה בגלאי UV באורך גל של 393 ננומטר (ב') ובגלאי מסה Agilent 6410 במסת היינון (מסה/מטען) המחושבת למולקולה sinensiaxanthin כערך של 411 (ג'). המספרים המצויינים בכוכבית מתחת לפיקים מציינים את מועדי הדחיקה (rt) של יציאת החומר 'peak 1' מהקולונה, לפי סוג הגלאי.



**איור 29: ספקטרום המסות של החומר 'peak 1' שבודד מעלי כותרת של הזן 'פריסקו', ושהתקבל ביינון שני באנליזה של LC/MS-MS.**

ספקטרום המסות שהתקבל מ- electrospray של החומר המופיע בזמן  $R_t = 5.3-5.7$  בכרומטוגרמה המובאת באיור 28. לאיור מצורף מבנה המולקולה sinensiaxanthin (Eugster and Märki-Fischer, 1991), ומסומנים בחץ תוצרי הפירוק האופייניים למולקולה בעלת מסת יינון של 411 שמכילה שתי קבוצות הידרוקסיל, כצפוי במקרה של sinensiaxanthin.



## ד.5.5. הרכב הנדיפים מעלי הכותרת של הזן 'פריסקו' במהלך פירוק הקרוטנואידים והשפעת הטיפול ב-MJ על הרכבם

בהמשך לזיהוי של C27 כ-*sinensianthin*, הוחלט לנסות ולאתר גם את המולקולה המשלימה בגודל C13 המתקבלת מפירוק *violaxanthin* על פי התגובה המתוארת בנוסחה 1. מולקולה זו עשויה להיות נדיפה (Eugster and Märki-Fischer, 1991); וההנחה הייתה שאם אכן מתקבלות מולקולות נדיפות מהפירוק הזה, הן יצטברו במקביל להצטברות של *sinensianthin*. כמו כן שיערנו, שהתנדפות המולקולה מפרחי הביקורת תהיה גבוהה מאשר מפרחים מטופלים ב-MJ. לצורך בחינת ההשערה, נדיפים נאספו מפרחי הביקורת למשך 24 שעות בין יום 3 ליום 4. כמתואר באיור 10, יממה זו מתאפיינת בירידה ניכרת ברמת הקרוטנואידים של פרחי הביקורת. הנדיפים נאספו בשיטת ה-*Headspace*, מוצו מהקולונה בהקסאן והמיצוי עבר אנליזת GC-MS. מהתוצאות המסוכמות בטבלה 6 נראה שרמת הנדיפים שנאספה מפרחי הביקורת הייתה נמוכה ביותר באופן כללי, והייתה ברמה דומה לכמות הנדיפים שנאספו בעבר מפרחי 'גולדן גייט' שהיו בשלב פתיחה 3 (Shalit et al., 2004). המולקולות הנדיפות המשמעותיות ביותר שאותרו היו *3-hexanol*, *methyl benzoate*, *orcinol dimethyl ether*, ו-*phenylethyl alcohol*, אשר התנדפו במועד זה מעלי הכותרת ברמות שבין 0.1  $\mu\text{g}$  ל-0.2  $\mu\text{g}$  לפרח, בעוד ששאר המולקולות התנדפו בשיעורים נמוכים בהרבה (טבלה 6). ראויה לציון המולקולה  $\beta$ -*ionone*, המהווה תוצר פירוק של  $\beta$ -*carotene* (Lewinsohn et al., 2005), שרמתה הייתה נמוכה בהרבה מרמת הנדיפים האחרים והגיעה לרמה של כ-1 ng בלבד. לא נמצאה כל מולקולה שעשויה להיות תוצר הפירוק של *violaxanthin* או של קרוטנואידים אחרים. כמו כן, לא נמצא כל הבדל ברמת הנדיפים ובהרכבם בין פרחים מטופלים ב-MJ לבין פרחי ביקורת (טבלה 6).

אנליזה נוספת בוצעה למיצוי נדיפים מכתש של עלי כותרת. עלי כותרת של פרחי ביקורת ופרחים מטופלים ב-MJ נכתשו ביום 4, ומוצו בהקסאן. המיצוי המסונן הוזרק למכשיר GC-MS ובתום ההרצות הושוו הכרומטוגרמות של פרחי הביקורת והפרחים המטופלים. מאחר ואין ברשותנו סטנדרט למולקולה בגודל C<sub>13</sub> המתקבלת מפירוק *violaxanthin* (Eugster and Märki-Fischer, 1991), לא ניתן היה לזהות את הפיק המייצג את התוצר הזה. תחום הסריקה הורחב לכל המולקולות על גבי הכרומטוגרמה שהן בגודל המתאים למולקולה המבוקשת, אולם גם באנליזה זו לא נמצאה שום מולקולה, בגודל הצפוי או בכל גודל אחר, שהצטברה באופן שונה בפרחים מטופלים ב-MJ בהשוואה לפרחי ביקורת. סיכומו של דבר, לא נמצא תוצר פירוק של *violaxanthin* בגודל C<sub>13</sub> אשר רמתו גבוהה יותר מפרחי ביקורת מאשר בפרחים המטופלים, ולא נמצאה השפעה של הטיפול ב-MJ על הרכב הנדיפים בעלי הכותרת.

**טבלה 6: השפעת הטיפול ב-MJ על הנדיפים המופרשים מפרחי הזן 'פריסקו' במהלך היממה הרביעית של חיי האגרסל.**

נדיפים נאספו במשך 24 שעות בין יום 3 ליום 4 באגרסל מפרחי ביקורת ומפרחים מטופלים ב-MJ, והופרדו על גבי קולונה קפילרית כמתואר בפרק שיטות המחקר. הערכים בטבלה מציינים ממוצעים של ארבע חזרות לכל טיפול של משקלי הנדיפים השונים ( $\mu\text{g}$ ) לפרח ביממה  $\pm$  שגיאות תקן.

Volatile name	Volatile content	
	Control ( $\mu\text{g}$ )	MJ ( $\mu\text{g}$ )
3-hexanol	0.394 $\pm$ 0.145	0.260 $\pm$ 0.228
pinene	0.034 $\pm$ 0.003	0.040 $\pm$ 0.009
benzaldehyde	0.231 $\pm$ 0.08	0.206 $\pm$ 0.123
3-hexen-1-ol acetate	0.123 $\pm$ 0.028	0.069 $\pm$ 0.03
2-ethyl hexanol	0.079 $\pm$ 0.011	0.090 $\pm$ 0.028
benzyl alcohol	0.016 $\pm$ 0.009	0.009 $\pm$ 0.009
methyl benzoate	0.557 $\pm$ 0.08	1.182 $\pm$ 1.045
nonanal	0.015 $\pm$ 0.003	0.014 $\pm$ 0.003
phenyl ethyl alcohol	0.109 $\pm$ 0.047	0.055 $\pm$ 0.035
gerany formate	0.013 $\pm$ 0.004	0.017 $\pm$ 0.01
benzyl acetate	0.008 $\pm$ 0.002	0.007 $\pm$ 0.005
acetic acid 2-phenyl ethyl ester	0.005 $\pm$ 0.0004	0.005 $\pm$ 0.003
caryophyllene	0.199 $\pm$ 0.042	0.214 $\pm$ 0.044
carene	0.010 $\pm$ 0.002	0.011 $\pm$ 0.002
beta ionone	0.001 $\pm$ 0.0003	0.001 $\pm$ 0.0001
D-germacrene	0.002 $\pm$ 0.001	0.001 $\pm$ 0.0003
benzyl_benzoate	0.015 $\pm$ 0.01	0.004 $\pm$ 0.002
squalene	0.010 $\pm$ 0.006	0.011 $\pm$ 0.011
orcinol dimethylester	0.609 $\pm$ 0.114	0.745 $\pm$ 0.162

## ה. דיון ומסקנות

עבודה זו דנה בשינויי צבע החלים בפרחי ורדים צהובים קטופים במהלך חיי האגרטל. ורדים מזנים צהובים שונים, כדוגמת 'פריסקו' ו'גולדן גייט', מתאפיינים בשינויים בצבע עלי הכותרת לאחר הקטיף. בזנים אלו עוצמת הצבע הצהוב עלתה בתחילת פתיחת הפרחים באגרטל ובהמשך חיי האגרטל הלכה ופחתה. טיפול משולב של הטענה וריסוס בהורמון הצמחי MJ שמר על עוצמת צבע גבוהה במהלך חיי האגרטל בשני הזנים. בדיקותינו העלו, שהפיגמנטים העיקרים בשני זנים אלו הם קרוטנואידים, ושהטיפול ב-MJ הגביר את רמתם. מסלול הביסנינתזה של הקרוטנואידים אופייני בפרחים, וידועים האנזימים המשתתפים במסלול ותוצריהם השונים. כן ידוע שהקרוטנואידים ממודרים במבנים מיוחדים (פלסטוגלובולות) בכרומופלסטים, ואחד המרכיבים החשובים של הפלסטוגלובולות הוא חלבון מבני שאחראי לייצובם ולשמירת הקרוטנואידים בתוכן. בניגוד למסלול הביסנינתזה שפוענח, המידע על מסלולי הקטבוליזם של הקרוטנואידים בצמחים עודנו חלקי והנתונים הולכים ומצטברים רק בשנים האחרונות. יחד עם זאת, הצטבר מידע לגבי תהליכי חמצון אנזימטיים המעורבים בפירוק.

השפעת JA ו-MJ על יצירת צבענים ידועה בעיקר בהקשר לאנתוציאנינים, אבל ידועה גם ההשפעה של JA על יצירת טרפנים, שהם חומרי מוצא לקרוטנואידים. עד כה, לא נמצאו בספרות עדויות נוספות למעורבות של JA או MJ בעידוד יצירת קרוטנואידים בפרחים ולא למעורבותם בעיכוב הפירוק של קרוטנואידים.

הנחת העבודה העיקרית גרסה שבעלי הכותרת של ורדים קטופים מתקיימים תהליכים של יצירת קרוטנואידים ופירוקם. שינויי הצבע שחלים במהלך חיי האגרטל נובעים משינוי היחס שבין תהליכי היצירה והפירוק של הקרוטנואידים, וכתוצאה מכך צבע הפרחים דוהה. בנוסף הנחנו, שייצור הקרוטנואידים בזן 'פריסקו' מבוקר ברמה המולקולארית, ופירוקם נובע מחמצון אנזימטי שלהם באמצעות אנזים פלסטידי, ומותנה בהריסת מידור הקרוטנואידים בתוך הכרומופלסטידות. הטיפול ב-MJ מגביר את עוצמת הצבע באמצעות השפעה הן על הגברת יצירת הקרוטנואידים וייצובם בעלי הכותרת והן על עיכוב פירוקם. מטרת העבודה הייתה לבחון את ההנחה לגבי ייצור, פירוק ומידור הקרוטנואידים בפרחי ורדים צהובים במהלך חיי האגרטל, לברר היכן מתרכזת השפעת ה-MJ על תהליכים אלה ומהו אופן ההשפעה.

### ה.1. שינויים בצבע ובתכולת הקרוטנואידים של פרחי 'פריסקו' במהלך חיי האגרטל

שינוי צבע בעלי כותרת של פרחים באגרטל הוא תופעה נפוצה. במחקרים שנערכו על פרחים שונים נבחנה השפעתם של גורמים שונים כגון טמפרטורה, pH, אור, ורמת הסוכרוז על התפתחות הצבע בעלי הכותרת. אולם רובם ככולם נוגעים לפרחים המכילים פיגמנטים ממשפחת האנתוציאנינים. ככל הידוע, לא דווח על הגורמים לדהיית הצבע בפרחים שבהם הצבענים הם קרוטנואידים, לבד מדיווח על מעורבותו של האנזים CmCCD4a בהלבנת עלי הכותרת בפתיחת פרחי חרצית, 'Yellow Paragon' *Chrysanthemum morifolium* cv. (Ohmiya et al., 2006).

במהלך חיי האגרטל של פרחי ורדים מזן 'פריסקו' מתקיימים בעלי הכותרת תהליכים מנוגדים של צבירת צבע ודהייתו הנובעים מייצור קרוטנואידים ופירוקם. דהיית הצבע בפרחי 'פריסקו' החלה עוד לפני שהפרחים הגיעו לפתיחה מלאה והקדימה את איבוד הטורגור והכמישה האופייניים להזדקנות בזן זה (Van Doorn and Schröder, 1995). תופעה זו תועדה אמנם בוורדים (Mayak and Halevy, 1970), אך ללא התייחסות לגורמיה. קינטיקה של עלייה

וירידה בצבע עלי הכותרת של פרחים צהובים נצפתה בצמחים אחרים, כגון בפרחי מלפפון (Vainstein et al., 1994) וסנדרסוניה (Eason and Webster, 1995; Lewis et al., 1998). בפרחים אלו, בשונה מפרחי ורדים מהזן 'פריסקו', שיא הצטברות הקרוטנואידים היה בשלב הפתיחה המלאה ודהיית הצבע החלה לאחר שלב זה במקביל לכמישת הפרחים. תוצאות העבודה הנוכחית מראות, שתהליכי הייצור והפירוק של הקרוטנואידים נפרדים זה מזה במשך חיי האגרטל ואינם מתקיימים במשולב. בניסויים שהוצגו באיורים 10-12 יום 2 ציין את מועד המעבר שבו נפסק ייצור הקרוטנואידים ופירוקם התחיל. בעבודה הוצגו ראיות לכך שהצטברות הקרוטנואידים בפרחי הביקורת נפסקה ביום 2, שכן כמות הקרוטנואידים ביום 6 של פרחי ביקורת ופרחים שטופלו ביום 2 ב-NF (NF2), החוסם את יצירת הקרוטנואידים, הייתה זהה הן בדור האמצעי והן בדור החיצוני (איור 12). בעבודה הוצגו גם ראיות לכך שבמים 0-2 לא התפרקו קרוטנואידים בעלי הכותרת החיצוניים של ורדים מזן 'פריסקו', שכן בפרחים שטופלו ביום הקטיפ ב-NF (NF0), כמות הקרוטנואידים ירדה רק לאחר יום 2. יחד עם זאת, יש להדגיש שלמרות שייצור הקרוטנואידים נעצר ביום 2, חלק מהגנים המקודדים לאנזימים במסלול הביוסנתזה של הקרוטנואידים המשיכו להתבטא בפרחי הביקורת גם לאחר יום 2 (איור 18). ייתכן שבגלל ירידה ברמת המידור ועלייה ברמתו של RhCCD4 הקרוטנואידים החדשים שנוצרים לאחר יום 2 מתפרקים במהירות ואינם מצטברים בעלי הכותרת. תופעה דומה דווחה בחרצית הלבנה *Chrysanthemum morifolium*: גנים לביוסנתזה של קרוטנואידים התבטאו בעלי הכותרת גם בשלבי התפתחות מאוחרים בהם הפרחים הצהובים היו כבר לבנים לגמרי. החוקרים הסיקו שייצור הקרוטנואידים נמשך בעלי הכותרת, אך הם אינם מצטברים ברקמה זו אלא מפורקים במהירות באמצעות האנזים CmCCD4a (Ohmiya et al., 2008). עלי הכותרת בדורים השונים של פרח הורד נמצאים בשלבים התפתחותיים שונים. העלים בדור החיצוני מקדימים להיפתח, הם גדולים יותר (התוצאות אינן מוצגות) וביום 2 הכילו קרוטנואידים רבים יותר (איור 12). תוצאות אלו הן בהתאמה לדיווחים קודמים (Evans and Reid, 1986). גם בהמשך חיי האגרטל עלי הכותרת בדור החיצוני מקדימים לאבד טורגור ולכמוש. בזני ורדים אחדים דווח, שבשלב הזדקנות מתקדמים עלי הכותרת נשרו, בעוד שבזן 'פריסקו' עלי הכותרת נשרו רק לאחר כחודש מפתחת הפרח (Van Doorn and Schröder, 1995). גם תהליכי דהיית הצבע ופירוק הקרוטנואידים בעלי הכותרת שבדור החיצוני היו מוגברים יותר מאשר הדהייה והפירוק בדור האמצעי. אמנם הדהייה הקדימה את הכמישה ונראה שהיא איננה חלק מתהליך ההזדקנות, אך ברור שהיא אינה מנותקת משאר התהליכים שמתקיימים בפרח והיא תלויה בשלב ההתפתחותי של עלי הכותרת.

## ה. הגברת הצבע ותכולת הקרוטנואידים בזן 'פריסקו' ובזני ורדים נוספים על ידי הטיפול ב-MJ

טיפולים משולבים של ריסוס והטענה ב-MJ שניתנו לפרחים הקטופים העצימו את הצבע הצהוב ועיכבו את הדהייה האופיינית לפרחים אלו במהלך חיי האגרטל (איורים 5-8). השפעה דומה של MJ בהעצמת הצבע הצהוב תועדה בפירות מנגו (González-Aguilar et al., 2001) ובתרבות תאי BY-2 של צמחי טבק (Goossens et al., 2003). בשני המקרים האלו העצמת הצבע אובחנה אמנם, אך גורמיה לא נדונו לעומק והיא לא יוחסה ישירות להגברת כמות הקרוטנואידים ו/או לעיכוב פירוקם. טיפולי MJ עוקבים בפרחי הזן 'פריסקו' העצימו את תופעת ההגברה של הצבע הצהוב (איור 6). לא מצאנו בספרות התייחסות לטיפולים עוקבים נוספים ב-MJ.

השפעת הטיפולים ב-MJ נבחנה גם בזני ורדים נוספים. באופן כללי ניתן לומר, שעיקר ההשפעה על הצבע ניכרה בזני ורדים שמכילים בעלי הכותרת קרוטנואידים ופחות השפעה ניכרה בזנים שמכילים בעלי הכותרת אנתוציאנינים (איורים 7, 8). תוצאה זו מעניינת מכיוון שבמערכות אחרות נמצא ש-MJ גרם לעלייה ברמת

האנתוציאנינים. כך בפרחי פטוניה בהם MJ הגביר את הצבע על ידי הגברת הפלבנואידים (Tamari et al., 1995), ובתפוחי עץ מזן 'Fuji' טיפולי MJ הגבירו את הצבע האדום בקליפה על ידי הגברת רמת האנתוציאנינים (Rudell et al., 2002).

בהמשך נבחנה תכולת הקרוטנואידים בעלי הכותרת של הזן 'פריסקו'. לניסוי הראשון נלקחו עלי כותרת מדור ביניים המשלב את התופעות האופייניות לדור החיצוני ולדור האמצעי (עלי כותרת 5-8). בניסויים אלו בפרחי הביקורת הקרוטנואידים הגיעו לשיא הצטברותם ביום 2 ובפרחים המטופלים ב-MJ נמשכה הצטברותם עד ליום 4 (איור 9) כתוצאה משילוב בין עידוד ייצורם למניעת פירוקם.

בניסויי ההמשך, מדידת תכולת הקרוטנואידים בעלי הכותרת העלתה שהטיפול ב-MJ הגביר את תכולתם, אך לא באופן שווה בדור האמצעי ובדור החיצוני (איור 12). בנוסף, בדור הפנימי ביותר לא נמצאה השפעה לטיפול ב-MJ על תכולת הקרוטנואידים (תוצאות לא מובאות). תוצאה זו מתקבלת על הדעת מאחר ועלי הכותרת בדורים השונים נמצאים בשלבים התפתחותיים שונים וגם דפוס הדהייה הוא שונה בין הדורים. בנוסף לכך, שטח המגע של עלי הכותרת החיצוניים עם נתזי הרסס הוא גדול יותר מזה של הפנימיים. גם בהגמעה עלי הכותרת החיצוניים נפתחים קודם וקולטים תמיסה רבה יותר מאשר עלי הכותרת הפנימיים.

למרות השוני בין הדורים, בדור האמצעי השפעת הטיפול ב-MJ ניכרה כבר ביום 2 והתבטאה בתכולת קרוטנואידים מוגברת בעלי הכותרת (איורים 10, 12). ניתן להניח ש-MJ עודד את ייצור הקרוטנואידים בין יום 0 ליום 2 בדור האמצעי (איור 12). תימוכין נוספים לכך ש-MJ עודד את ייצור הקרוטנואידים ניתן למצוא גם בתוצאות אנליזת ביטוי הגנים במסלול הבייסנטזה של הקרוטנואידים: הטיפול ב-MJ הגביר את ביטוי של *Pds*, ובחלק מהניסויים גם את הביטוי של *Lcy-b* ביומיים הראשונים לחיי האגרטל (איור 18). לעומת זאת, בדור האמצעי של פרחי הביקורת לא ניכרו תהליכי הפירוק בין יום 2 ליום 6 (איור 12), ולכן בדור זה לא ניתן לומר שהטיפול ב-MJ מנע את פירוק הקרוטנואידים. מניסוי זה נראה כי ההפרש שהיה קיים ביום 6 בין תכולת הקרוטנואידים בדור האמצעי של פרחים מטופלים ב-MJ לעומת פרחי ביקורת נגרר כולו מההפרש שנוצר בין פרחים אלה כבר ביום 2. עם זאת, ייתכן שהשפעת MJ על ייצור הקרוטנואידים בדור האמצעי נמשכת גם מעבר ליום 2, שכן הטיפול הגביר את ביטויים של הגנים *Zds*, *Pds* ו-*Lcy-b* עד ליום 4 (איור 18), ובנוסף, MJ שמר על שלמות הכרומופלסטידות עד ליום 4 (איור 22).

אפשר להניח שגם בדור החיצוני השפעת הטיפול ב-MJ בימים 0-2 נובעת מהגברת ייצור הקרוטנואידים, שכן בימים אלו זהו התהליך הדומיננטי גם בעלי הכותרת של הדור החיצוני (איור 12). בדור החיצוני יום 2 מהווה את נקודת שינוי המשקל שלאחריה תהליכי הפירוק והדהייה הופכים דומיננטיים. באמצעות הטיפול ב-NF הוכח שבדור זה הטיפול ב-MJ גרם לעיכוב פירוק הקרוטנואידים, לפחות בין יום 2 ליום 6 (איור 12).

לא נמצאו דיווחים לגבי השפעות של MJ על עידוד יצירת קרוטנואידים, פרט לעבודות בתפוחי עץ מזן 'גולדן דליש' (Perez et al., 1993) ובעגבניות (Czapski and Saniewski, 1995).

### 3. שינויים בהרכב הקרוטנואידים בעלי הכותרת של פרחי ורדים במהלך חיי האגרטל והשפעת MJ על שינויים אלה

לאחר שהראינו שהטיפול ב-MJ משפיע על תכולת כלל הקרוטנואידים בעלי הכותרת, ניסינו לבחון כיצד הטיפול משפיע ספציפית על הרכב הקרוטנואידים במהלך חיי האגרטל בשני זני ורדים, 'פריסקו' ו'גולדן גייט'. באיורים 14-15 מתוארים השינויים בהרכב הקרוטנואידים בעלי הכותרת של פרחי הזן 'פריסקו' במהלך חיי האגרטל. נראה

בבירור שהקרונואידיים העיקריים בעלי הכותרת הם violaxanthin, ובמידה פחותה גם neoxanthin, המהווים יחד כ- 90% מתוך כלל הקרונואידיים (איור 14). רמתם היחסית של שאר הקרונואידיים שזוהו הייתה נמוכה בהרבה והלכה ופחתה במהלך חיי האגרסל. מהתוצאות המוצגות באיור 15 ניתן לראות שלקרונואידיים סמוכים במיקומם לאורך מסלול הביוסניתזה (איור 1) יש דפוסי הצטברות ופירוק משותפים וגם דפוס השפעתו של הטיפול ב-MJ משותף לאותם קרונואידיים: כך למשל הדמיון לגבי זוג הקרונואידיים antheraxanthin ו-zeaxanthin (איור C15, D) ולגבי הזוג violaxanthin ו-neoxanthin (איור E15, F).

על סמך איורים 14, 15 ניתן לדמות את מהלך הצטברות הקרונואידיים ופירוקם בפרחים לתנועה בתוך משפך.  $\beta$ -carotene נמצא באזור ההזנה של המשפך ו-violaxanthin, שנמצא במורד מסלול הביוסניתזה של הקרונואידיים, מצטבר בתחתית המשפך (איור 1). הפסקת ייצור הקרונואידיים בעלי הכותרת ביום 2 גורמת לכך שהתנועה לאורך המשפך הולכת ונחלשת בין יום 2 ליום 4, דבר המתבטא בהקטנת רמתם היחסית של  $\beta$ -carotene, zeaxanthin ו-antheraxanthin. בנוסף לכך, החל מיום 2 מתחילה "דליפה" של violaxanthin ו-neoxanthin מאזור ההצטברות בתחתית המשפך, הנובעת מפירוקם. דבר זה מתבטא בהגדלת רמתו היחסית של peak 1 (איור A15) על חשבון הקטנת רמתם היחסית של הקרונואידיים האלו. יש להדגיש שהתוצאות משקפות תמונת steady-state של מצב הקרונואידיים בארבע נקודות בדיקה במהלך התהליך השלם. התהליך המתואר מתחיל לפני מועד הבדיקה הראשון ביום 0 ונמשך גם לאחר מועד הבדיקה האחרון, ביום 6.

כל הקרונואידיים שזוהו בזן 'פריסקו' נמצאו גם בזני ורדים אחרים (Eugster and Märki-Fischer, 1991), אך ככל הידוע לנו הקינטיקה של השינויים בהרכבם בעלי הכותרת לאחר הקטיף לא נדונה עד כה. הרכב הקרונואידיים בזן 'פריסקו' דומה להרכב שנמצא על ידי Hirschberg וחוב' בעלי כותרת של פרחים מזן 'גולדן גייט' (איור 16), והסיבה להבדלי הגוון הצהוב בין שני הזנים (איור 5א, ב') נובעת מיחסים שונים בין הקרונואידיים שלהם. כך למשל, הצבע הכהה יותר בזן 'גולדן גייט' עשוי לנבוע מרמה יחסית גבוהה של קרונואידיים כתומים, כגון הקרונואיד  $\beta$ -carotene לעומת רמה יחסית נמוכה של קרונואיד זה בזן 'פריסקו'.

שינויים בהרכב הקרונואידיים במהלך פתיחת פרחים נצפו גם בחרצית צהובה, *Chrysanthemum morifolium* 'Yellow Paragon' cv. הקרונואידיים הגיעו לשיא תכולתם בפרחים שהגיעו לפתיחה מלאה, אך התכולה היחסית של lutein, שהיה הקרונואיד העיקרי בשלבים הראשונים של הפתיחה, ירדה עם הגעת הפרחים לפתיחה מלאה (Kishimoto and Ohmiya, 2006).

על פי מודל המשפך שהוצע לעיל, השפעת הטיפול ב-MJ מתקיימת הן בראש המשפך, שכן MJ הגביר את הייצור של  $\beta$ -carotene (איור B15), והן בתחתיתו, שכן MJ מנע את ה"דליפה" על ידי עיכוב הפירוק של violaxanthin (איור E15). בבחינת השפעת הטיפול ב-MJ על כל קרונואיד בנפרד נראה, שהשפעת הטיפול אינה מובהקת ביום 2 אלא ביום 4 (איור 15). הסיבה לכך היא שבאנליזה הזו נבחנו עליו כותרת שנמצאים בין הדור החיצוני לדור האמצעי (עלי כותרת 5-8), ולכן ההשפעה המובהקת של הטיפול ב-MJ שהתקבלה על כלל הקרונואידיים בדור האמצעי ביום 2 (איור 12ב) מוסכה.

#### ה.4. השפעת הטיפול ב-MJ על גנים במסלול הביוסנתזה של הקרוטנואידים בעלי הכותרת של פרחי הזן 'פריסקו' במהלך חיי האגרטל

השפעת הטיפול ב-MJ על גנים המקודדים לאנזימים במסלול הביוסנתזה של קרוטנואידים מתאימה ככלל למודל שהוצע, שכן הטיפול ב-MJ הגביר את הביטוי של הגנים *Zds*, *Pds* ו-*Lcy-b* בימים 2-4 (איור 18), וגרם להמשך ייצור  $\beta$ -carotene גם לאחר יום 2 (איור B15) ולהמשך הזרימה לאורך מסלול הביוסנתזה. יחד עם זאת, קשה לייחס את הגברת ייצור הקרוטנואידים להגברת ביטויים של גנים אלו לבדם, שכן *Zds*, *Pds* ו-*Lcy-b* מזרזים שלבי ביניים במסלול הביוסנתזה (איור 1). מהתוצאות לא ניתן לדעת מהו הקרוטנואיד הראשון המוגבר בעקבות הטיפול ב-MJ, זה אשר מהווה את "מקור ההזנה של המשפך". מקובל להתייחס לפעילות האנזים *Psy* כנקודת הבקרה המחייבת במסלול הביוסנתזה של הקרוטנואידים (Hirschberg, 2001). אי לכך, ניתן היה להחשיב את ה-phytoene כ"מקור ההזנה של המשפך". בפועל, תוצאות האנליזה מצביעות על תמונה מורכבת יותר, שכן השפעת הטיפול ב-MJ בהגברת ביטויים של הגן *Psy* והגן הבא אחריו במסלול, *Pds*, מתקיימת ביומיים הראשונים לחיי האגרטל בלבד ולא בהמשך חיי האגרטל (איור 18). ייתכן שהטיפול ב-MJ השרה את הגברת ייצור הקרוטנואידים גם בשלבים מוקדמים יותר מאלו שנבדקו, כגון באחד משלבי מסלול ייצור מולקולת הטרפן בעלת חמשת הפחמנים, isopentenyl diphosphate. למשל, בהבשלת פירות עגבנייה הוצע, שפעילות האנזים הראשון במסלול זה, 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, עשויה להיות שלב בקרה של ייצור קרוטנואידים (Lois et al., 2000).

מעורבותם של JA או MJ בהגברת קרוטנואידים בצמחים שונים נדונה בסקירת הספרות (Perez et al., 1993; Czapski and Saniewski, 1995). בכל המקרים שהובאו לא דווח שמנגנון הבקרה של הגברת הקרוטנואידים הוא הגברת הסינתזה. האפשרות ש-JA מעורב בבקרה של ביטוי הגנים במסלול הביוסנתזה של הקרוטנואידים הוזכרה בעבר רק בעבודה שבה נבחנה ההשפעה של יישום קדמים של חומרים מחמצנים (ROS progenitors) על דיסקיות פירות פלפל, ונמצא שהם הגבירו את ביטויים של גנים לביוסנתזה של קרוטנואידים (Bouvier et al., 1998).

#### ה.5. תפקיד החלבון RhCHRC במידור הקרוטנואידים בפרחי הזן 'פריסקו'

שתי ספריות הפחתה נבנו בשלב מוקדם במחקר במטרה למצוא גנים מוקדמים המושרים כתוצאה מהטיפול ב-MJ. להוציא את הגן *RhCHRC*, הגנים אשר נמצאו בספרייה אינם קשורים ישירות למסלול יצירת הצבע ולא לפירוקו (טבלה 4). *CHRC* הוא חלבון מבני המשתתף באריזת הקרוטנואידים במבנים המכונים פלסטוגלובולות בתוך הפלסטידות (Vainstein et al., 1994). בפרחי הביקורת של הזן 'פריסקו' ביטוי הגן *RhCHRC* הגיע לשיאו ביום 1 (איור 21א), ורמת החלבון הגיעה לשיאה ביום 2 (איור 21ב). תוצאה זו מתאימה לדפוס הצטברות הקרוטנואידים בעלי הכותרת. גם בפרחי מלפפון דווח שקיימת חפיפה בין ביטוי הגן *CsCHRC* והצטברות החלבון לבין מהלך הצטברות הקרוטנואידים (Smirra et al., 1993). רמת החלבון *RhCHRC* בראשית חיי האגרטל התאימה גם לתוצאות מאנליזת מיקרוסקופ האלקטרונים לפיהן בין יום 0 ליום 2 הפלסטוגלובולות נוצרות ומצטברות בכרומופלסטים (איור 22א). באנליזת ה-Western עשינו שימוש בנוגדן כנגד חלבון ה-*CHRC* מפרחי מלפפון. מעניין לציין שהנוגדן הגיב בצורה טובה בוורדים למרות שבאנליזת מיקרוסקופ האלקטרונים נראה שהכרומופלסטידות בפרחי 'פריסקו' מכילות פלסטוגלובולות ולא fibrils כמו במלפפון או בפלפל (Deruere et al., 1994; Prebeg et al., 2006). ככלל,

הכרומופלסטידות בפרחי הזן 'פריסקו' הן בעלות מבנה המזכיר את זה שתואר בתאי מזופיל של פירות מנגו מבשילים (Vasquez-Caicedo et al., 2006). ביום 0 לחיי האגרטל, כמו בשלב טרום ההבשלה בפירות מנגו, גרגירי העמילן תפסו את רוב נפח הכרומופלסטידה, כאשר הפלסטוגלובולות היו צבורות רק בשוליים (איור 22א). עם התקדמות ההבשלה בפירות מנגו הכרומופלסטים התמלאו בפלסטוגלובולות, בעוד שגודלם ומספרם של גרגירי העמילן פחת. גם בפרחי הזן 'פריסקו' בהמשך חיי האגרטל הקרוטנואידים הצטברו בעלי הכותרת והכרומופלסטידות התמלאו בפלסטוגלובולות על חשבון ההפחתה בגרגירי העמילן. לכן, החל מיום 2 לא ניתן היה להבחין כלל בגרגירי עמילן בכרומופלסטידות של פרחי 'פריסקו' (איור 22ב). ההתפרקות המהירה של גרגירי העמילן בזמן פתיחת פרחי ורדים נדונה בספרות והיא יוחסה לפעילות עמילאזות. נראה, שלסוכרים שמתקבלים מפירוק העמילן יש תפקיד בפתיחת פרחי ורדים (Hammond, 1982; Evans and Reid, 1986; Evans and Reid, 1988; Van Doorn and Van Meeteren, 2003).

בדומה להצטברות הקרוטנואידים ביומיים הראשונים, ביטוי הגן *RhCHRC* ורמת החלבון שלו לאחר יום 2 מתאימים אף הם למהלך דהייט הצבע ופירוק הקרוטנואידים: פירוק הקרוטנואידים מתחיל ביום 2 ורמת ביטוי הגן *RhCHRC* הולכת ויורדת לאחר יום 1 (איור 21א). רמת החלבון לאחר יום 1 הייתה נמוכה ובהמשך חיי האגרטל היא אף ירדה עוד יותר (איור 21ב). לעומת זאת, הירידה במספר הפלסטוגלובולות בפרחי הביקורת נצפתה רק לאחר יום 4 (איור 22).

ביטוי הגן *RhCHRC* הוגבר עד ליום 4 ורמת החלבון הוגברה למשך כל התקופה הנבדקת, בהשפעת הטיפול ב-MJ (איור 21), כאשר במקביל גם מספר הפלסטוגלובולות וצפיפותן עלו בעקבות הטיפול ב-MJ (איור 22). תוצאה זו תואמת את השפעת הטיפול ב-MJ על תכולת הקרוטנואידים בעלי הכותרת במועדים אלה (איור 9). למיטב ידיעתנו, זהו הדיווח הראשון המראה את הגברת ביטוי הגן *CHRC* או החלבון שלו וכן את הגברת מספר הפלסטוגלובולות וצפיפותן בהשפעת MJ. האנליזות במיקרוסקופ האלקטרוני אמנם מוסיפות מימד מבני להשפעת MJ על הצטברות הקרוטנואידים, אך מהתוצאות שהתקבלו לא ניתן לקבוע אם הטיפול ב-MJ הגביר ועודד יצירה נוספת של פלסטוגלובולות או רק מנע את פירוקן של פלסטוגלובולות קיימות בכרומופלסטידות.

מעבר לפלסטוגלובולות, נראה שקיים גם קשר בין עוצמת הצבע בעלי הכותרת לבין צפיפות החומר (electron density) ושלמות הממברנות של הכרומופלסטים. תופעה זו מודגשת במיוחד בהשוואה בין הכרומופלסטידות שבבסיס עלה כותרת ביום 4 לבין אלו שבחלקו העליון של אותו עלה (איור 23), וכן בהשוואה בין מצב הכרומופלסטידות של פרחים מטופלים ופרחי ביקורת ביום 6 לחיי האגרטל (איור 22א). עם זאת, יש להדגיש שהתוצאות שהתקבלו במיקרוסקופ האלקטרוני מהוות עדות תומכת בלבד שעל פיה ניתן להצביע על מגמה, ולא הוכחה כמותית. בכל החזרות שבחנו נצפו גם כרומופלסטידות שאינן מתאימות לשלב ההתפתחותי של העלה או לטיפול ב-MJ. יכולות להיות לכך מספר סיבות: 1. ייתכן שבדוגמאות השונות נצפו שכבות תאים שונות, כגון רקמת אפידרמיס, מזודרמיס ואנדודרמיס. במנגו למשל, נראה הבדל בין צורת הכרומופלסטידות בשכבות השונות (Vasquez-Caicedo et al., 2006). מתצפיות ראשוניות שנערכו על עלי הכותרת של פרחי 'פריסקו' במיקרוסקופ אור עלה, שבכל שכבות התאים קיימות כרומופלסטידות ושצורתן אכן שונה בין התאים השונים (התוצאות אינן מוצגות בעבודה). 2. בפלפל ומלפפון הפלסטוגלובולות ממשיכות להתפתח ונוצרים מהם מבני ה-fibrils (Deruere et al., 1994; Prebeg et al., 2006). במנגו בשלב הבשלה מתקדם נוצרים tubules בכרומופלסטידות, שלצברים שלהן יש צורה פחות ברורה מאשר ל-fibrils (Vasquez-Caicedo et al., 2006). ייתכן, שבדומה לכך גם בורדים מזן 'פריסקו' נוצרים מבנים משניים מהפלסטוגלובולות, אשר לא זוהו באנליזת מיקרוסקופ האלקטרוני.



## ה.6. השפעת הטיפול ב-MJ ונוכחות החלבון RhCHRC בעלי הכותרת על מנגנוני ההגנה מפני פתוגנים

כפי שתואר בסקירת הספרות, מלבד מידור הקרוטנוואידים חלבוני CHRC משתתפים גם בתגובת הצמח בהגנה כנגד עקות שונות (Laizet et al., 2004). הגברת ביטוי של הגן *RhCHRC* בעקבות הטיפול ב-MJ עולה בקנה אחד עם תפקידו של החלבון CHRC בהתמודדות עם עקות, שכן ההורמון JA מעורב בתגובות הגנה בצמח כנגד טווח רחב של פתוגנים (Thaler et al., 2004). יתרה מזאת, בעלי עגבנייה בהם הושתק ביטוי הגן *CHRC* עלתה רמת הרגישות לפטרייה *Botrytis cinerea* (Leitner-Dagan et al., 2006), ובוורדים טיפול ב-MJ הגביר את עמידות הפרחים לאותה פטרייה (Meir et al., 1998). זאת ועוד, בעת הדבקה בפטרייה *Botrytis* מתרחשת בצמח התפרצות חמצונית (oxidative burst) שגורמת לתמותת הרקמה (Govrin and Levine, 2000), ובצמחי עגבנייה עמידים כנגד *Botrytis* הבחינו החוקרים ברמה מוגברת של  $H_2O_2$  (Asselbergh et al., 2007). כפי שתואר בסקירת הספרות, JA ידוע כהורמון המעורב בתגובות כנגד עקות חמצון (Rey et al., 2000; Laizet et al., 2004). אכן, בספריית ההפחתה שביצענו אף נמצא שהגן המקודד לאנזים האנטי חמצוני Superoxide Dismutase (SOD), ההופך את יון הסופר אוקסיד לחמצן ו- $H_2O_2$ , מוגבר בעקבות הטיפול ב-MJ (טבלה 4, איור 20ב). מתוך הדוגמאות האלו ניתן לשער, שהגברת עמידותם של ורדים קטופים כנגד הפטרייה *Botrytis* באמצעות הטיפול ב-MJ (Meir et al., 1998) נבעה כנראה מהתמודדות הצמח עם העקה החמצונית בעת ההדבקה באמצעות חלבון ה-CHRC והאנזים האנטי חמצוני SOD. בנוסף, יש לציין שבספריית ההפחתה אותרו גנים נוספים שהוגברו ע"י הטיפול ב-MJ ושאינם קשורים לעקה חמצונית, כגון *PGIP* (טבלה 4, איור 20ב), המעורב בתגובת הצמח כנגד בוטריטיס (Joubert et al., 2006). כך ש-MJ משרה מנגנונים שונים כנגד פתוגנים.

קשר נוסף בין MJ ובקרת עקות וקרוטנוואידים ניתן למצוא בדיווחים לגבי fibrillin. בעלי תפוח אדמה הצטבר החלבון fibrillin בתגובה לעקת חמצון (Langenkamper et al., 2001). בארבידופסיס דווח שביטוי הגנים ל-*Fibrillin* מבוקר על ידי ABA (Yang et al., 2006), ובמלפפון נמצא שביטוי החלבון מוגבר על ידי ג'ברלין (Vishnevetsky et al., 1997). ממצאים אלה מחזקים את הקשר האפשרי בין ABA וג'ברלין, המסונתזים במסלול הקרוטנוואידים, לבין התמודדות הצמח עם עקות ועידוד ייצור הקרוטנוואידים ע"י MJ, שיש לו כנראה תפקיד בבקרתם.

## ה.7. אפיון הגנים לאנזימי חמצון של הקרוטנוואידים בעלי הכותרת

באנליזות הכימיות שביצעו Eugster ו-Märki-Fischer לפיגמנטים של פרחי ורדים נמצאו תוצרי פירוק של קרוטנוואידים (Eugster and Märki-Fischer, 1991). על סמך הממצאים הם שיערו את מהלך הפירוק, אולם בשעתו לא ניתן היה לדון בתהליך האנזימטי משום שמשפחת חלבוני CCD טרם התגלתה. בשנים שלאחר מכן נמצאו עדויות בצמחים רבים שקרוטנוואידים מתפרקים בתהליכי חמצון אנזימטיים (Schwartz et al., 2001; Camara and Bouvier, 2004). בדומה לכך, גם בעבודה הנוכחית הראנו שהדגרת פרחי הזן 'פריסקו' באווירה מבוקרת עם 2% חמצן מנעה כמעט לחלוטין את פירוק הקרוטנוואידים בעלי הכותרת במשך 9 ימים (איור 24), עדות לכך שתהליכי חמצון מעורבים בפירוק הקרוטנוואידים. בעקבות כך נבחנה הימצאותם של גנים ממשפחת CCD בעלי הכותרת של פרחי הזן 'פריסקו' וגולדן גייט'.

## ה.1.7. הגן *RhCCD1*

מקטע מהגן *RhCCD1* אותר ב-RNA שהופק מעלי הכותרת של פרחי הזן 'פריסקו' וגולדן גייט'. ביטוי של הגן בעלי הכותרת של שני הזנים הלך וירד במהלך חיי האגרטל החל מיום 0 (איור 26). הביטוי הנמוך של הגן *RhCCD1* במשך רוב חיי האגרטל רומז שהאנזים RhCCD1 הוא בעל רמת פעילות בסיסית בלבד בעלי הכותרת בימים אלה. יתרה מזאת – ביטוי לא השתנה בעקבות הטיפול ב-MJ (איור 27). תוצאות אלו לא התאימו למהלך פירוק הקרוטנואידים ולעצירת הפירוק בעקבות הטיפול ב-MJ (איור 9), והן רומזות ש-RhCCD1 אינו האנזים שמזרז את תהליך פירוק הקרוטנואידים ודהיית צבע עלי הכותרת בפרחי הזן 'פריסקו'.

אחת הסיבות לכך יכולה להיות שחלבון ה-RhCCD1 ממוקם בציטוזול, כפי ששיערו החוקרים שחקרו את החלבון בארבידופסיס (Tan et al., 2003), בעגבניה (Simkin et al., 2004a) ובצמחים נוספים. אכן, כך עלה מהאנליזה הממוחשבת שביצענו עבור אזור קצה 5' של הגן *RhCCD1* ששובט מפרחי הזן 'פריסקו' (טבלה 5). מיקומו הציטוזולי של החלבון מקשה אף הוא על ההנחה שזהו האנזים שמזרז את תגובת פירוק הקרוטנואידים בעלי הכותרת, אפילו אם מיקומו הוא בסמוך למעטפת החיצונית של הכרומופלסט, כפי ששיערו החוקרים, שכן על מנת שתתרחש תגובה אנזימטית יש צורך במגע ישיר בין האנזים לקרוטנואיד, ואילו הקרוטנואידים האגורים בכרומופלסטידות בתוך פלסטוגלובולות ומוגנים ע"י כך מפני פירוק ציטוזולי.

בצמחים רבים ובניסויים *in vitro* נמצא ש-CCD1 זרז פירוק קרוטנואידים ליצירת נדיפים חומרי טעם וריח. בעגבניה ובאבטיח כמותו של התוצר  $\beta$ -ionone בפרי הייתה נמוכה ב-2-3 סדרי גודל מזה של הקרוטנואיד  $\beta$ -carotene, אשר ממנו הוא נגזר (Lewinsohn et al., 2005). כמות ה- $\beta$ -ionone שהתנדף מפרי העגבניה נמדדה בפיקוגרמים בודדים (Simkin et al., 2004a). באנליזת הנדיפים מעלי הכותרת של פרחי הזן 'פריסקו' נמצא שהכמות שנמדדה הייתה 1 ננוגרם (טבלה 6). כמות זו נמוכה בארבעה סדרי גודל מכמות הקרוטנואידים ברקמה באותו זמן. שיעור פירוק נמוך שכזה אינו מתאים לפעילות הפירוק המאסיבית המתרחשת בעלי הכותרת של הזן 'פריסקו' במהלך חיי האגרטל (איור 14). אילו היה RhCCD1 האנזים העיקרי שמזרז את הפירוק המאסיבי והמואץ של הקרוטנואידים בעלי הכותרת ניתן היה לצפות שהפרחים יפיצו ריח עז. בפועל, הזן 'פריסקו' הוא זן שאינו ריחני וכמות הנדיפים שבו נמוכה מאד גם בימים שבהם מתרחש פירוק מואץ של הקרוטנואידים (טבלה 6). טיעונים אלו מחזקים את ההשערה ש-RhCCD1 אינו האנזים שמזרז את דהיית הצבע בעלי הכותרת. נראה שפעילותו של RhCCD1 בעלי הכותרת מכוונת לפירוק קרוטנואידים שונים אשר "חמקו" אל מחוץ לכרומופלסטידות, או שהיא מתקיימת בתוכן של הכרומופלסטידות אשר איבדו את שלמותן ומיועדות לפירוק. השערה זו מתיישבת עם דיווחים בספרות על כך ש-CCD1 מזרז את פירוקם של מגוון קרוטנואידים שונים (Schwartz et al., 2001).

## ה.2.7. הגן *RhCCD4*

לעומת *RhCCD1*, ביטוי הגן *RhCCD4* התאים למהלך פירוק הקרוטנואידים בזן 'פריסקו' וגם בזן 'גולדן גייט' (איורים 26, 27). בנוסף, רמת הביטוי של הגן ירדה משמעותית בעקבות הטיפול ב-MJ (איור 27). תוצאות אלו תומכות בהשערה ש-RhCCD4 הוא האנזים שמזרז את פירוק violaxanthin בכרומופלסטים ושפעילותו בעלי הכותרת מזרזת את דהיית הצבע. להשערה זו יש תמיכה בספרות: השתקת הגן *CmCCD4* בפרחי חרצית לבנים *Chrysanthemum moriflorum* גרמה להצהבת הפרחים ושימרה את רמת הקרוטנואידים המקורית בעלי הכותרת (Ohmiya et al., 2006, 2008). גם מיקומו התאי המחושב של החלבון מתאים להשערה: אנליזה ממוחשבת של אזור קצה 5' של הגן *RhCCD4* המשובט העלתה שהחלבון המתורגם RhCCD4 מכיל פפטיד מוביל לכלורופלסטים (טבלה

5). תוצאה דומה התקבלה מניתוח ממוחשב של הגנים ההומולוגים בארבידופסיס (Tan et al., 2003) בפרחי חרצית (Ohmiya et al., 2006) ובזעפרן (Rubio et al., 2008). מאחר ובעלי הכותרת המפותחים אין כלורופלסטים, נראה שמיקומו של RhCCD4 הוא בכרומופלסטים. ברצף המתורגם של *RhCCD4* נמצאים חלק מהמוטיבים המאפיינים פפטיד מוביל לכלורופלסטים (cTP) (Bruce, 2000; Emanuelsson et al., 2007): החומצה האמינית אלנין נמצאת בסמיכות למתיונין הראשון, אם כי לא בצמידות אליו, והחומצה פרולין נמצאת כ- 10 חומצות אמינו אחריה בשרשרת. עשרת חומצות האמינו אינן טעונות, כמקובל ב-cTP. האזור המרכזי בפפטיד המוביל עשיר בחומצות אמינו סרין ותראונין. חומצות אלו מכילות קבוצת הידרוקסיל וסידורן בשרשרת מקנה את תכונת האמפיפיות באחד הצדדים במבנה השניוני של הפפטיד (Bruce, 2000). אורכם של פפטידים מובילים מסוג cTP יכול לנוע בין 20 ל- 100 חומצות אמינו בחלבונים שונים. כך למשל אורכו המחושב של הפפטיד המוביל באנזים ההומולוגי AtNCE4, אשר אותר בפלסטוגלובולות של כלורופלסטים בעלי ארבידופסיס (Ytterberg et al., 2006), הוא 34 חומצות אמינו, ואורכו המחושב של הפפטיד המוביל ב-RhCCD4 מפרחי 'פריסקו' הוא 74 חומצות אמינו (טבלה 5). אף על פי כן, קשה להצביע במדויק על התאמה בין המבנה הראשוני של RhCCD4 לבין מבנה קלאסי של cTP, שכן ב-RhCCD4 קשה לאתר את המוטיב השלישי המאפיין cTP, שהוא אזור מועשר בחומצת אמינו ארגינין קרוב לקצה ה-C terminal של הפפטיד.

#### 8. זיהוי 'peak 1' כתוצר הפירוק של violaxanthin המזורז על ידי האנזים RhCCD4

באנליזות הכימיות של הקרוטנואידים נראה שבמהלך חיי האגרטל במקביל להתפרקות הקרוטנואידים הלך והצטבר חומר שכונה 'Peak 1' (איורים 13-15). תבנית ספקטרום הבליעה של החומר (איור 28א') הייתה דומה לספקטרום הבליעה האופייני לקרוטנואידים. מאחר והקרוטנואיד העיקרי בעלי הכותרת הוא violaxanthin (איור 14), שיערנו שהחומר המצטבר הוא תוצר פירוק של violaxanthin. בספרות תואר מבנה החומר sinensioxanthin, שהוא תוצר פירוק בעל 27 פחמנים של violaxanthin בעלי כותרת של ורדים (Eugster and Märki-Fischer, 1991). ספקטרום הבליעה של 'peak 1' היה אכן זהה לזה של sinensioxanthin (איור 28א'). באנליזת mass-spectrum עלה שהמסה של החומר 'peak 1' היא זהה ל-sinensioxanthin (איור 28ג'), וכמו כן בכרומוטוגרמת תוצרי היינון של המולקולה נמצאו מסות יינון של 393.2 ו- 374.9 (איור 29), הצפויות להתקבל מפירוק שתי קבוצות ההידרוקסיל של sinensioxanthin. הצטברותו של החומר 'peak 1' בפרחי הזן 'פריסקו' (איור A15) היוותה תמונת ראי להתפרקות violaxanthin (איור E15), והצטברות החומר בפרחים שטופלו ב-MJ הייתה מעוכבת ונמוכה יותר מאשר בפרחי הביקורת (איור A15). מכלל תוצאות אלו הסקנו ש-'peak 1' הוא אכן החומר sinensioxanthin, ואנו מציעים שיצירת חומר זה מזורזת על ידי RhCCD4 בכרומופלסטידות שבעלי הכותרת, ושהטיפול ב-MJ עיכב את הצטברות החומר על ידי עיכוב פעולת האנזים RhCCD4.

לאחרונה דווח שהאנזימים CsCCD4a ו-CsCCD4b מזעפן מסוגלים לזרז פירוק של  $\beta$ -carotene לתוצר הנדיף  $\beta$ -ionone. החוקרים הציעו שזהו תוצר הפעילות העיקרי שלהם בעלים שבפרחי זעפרן (Rubio et al., 2008). נראה כי זו איננה התגובה שמתקיימת בעלי הכותרת של פרחי 'פריסקו', שכן  $\beta$ -carotene הינה מולקולה משנית בעלי הכותרת (איור 14). כמו כן באנליזות הנדיפים שערכנו, כמות המולקולה  $\beta$ -ionone שאותרה בעלי הכותרת הייתה מזערית ולא

ניכר כל הבדל בכמותה בין פרחי ביקורת לפרחים מטופלים ב-MJ (טבלה 6). תוצאה דומה פורסמה בתקופה האחרונה בפרחי *Rosa damascena* ובהתאם לכך שיערו החוקרים שהחלבון RdCCD4 בפרחי *Rosa damascena* אינו מזרז *in vivo* את יצירת  $\beta$ -ionone (Huang et al., 2009). באותו מחקר ציינו החוקרים שתפקידו הביולוגי של CCD4 בוורדים עדיין אינו ידוע. על רקע אמירה זו חשיבותן של התוצאות שהוצגו בעבודה זו מקבלות משנה תוקף.

## ה.9. תהליך פירוק הקרוטנואידים – מודלים והוכחות

מחקרם של Eugster ו-Märki-Fischer לא עסק באנזימים שמפרקים קרוטנואידים בעלי הכותרת אלא התמקד בתוצרים בלבד. מלבד sinensianthrin הם מצאו תוצרים נדיפים בעלי 13 פחמנים ( $C_{13}$ ) שנגזרו מקצוות מולקולות של קרוטנואידים שונים, אך לא את אלו של violaxanthin ו-neoxanthin. בנוסף, הם איתרו בוורדים שונים את המולקולה rosafluene שהיא בעלת 14 פחמנים (Eugster and Märki-Fischer, 1991). על סמך ממצאיהם הם ניסחו את תגובת פירוק הקרוטנואידים בעלי כותרת של ורדים שהובאה בסקירת הספרות ובפרק התוצאות (נוסחה 1). תוצאות עבודה זו תומכות בהשערתם ומחברות בין ממצאי האנליזות הכימיות שהם ביצעו לבין הנתונים המצטברים בשנים האחרונות אודות תפקידם של חלבוני CCD כמזרזי תגובות חמצון של קרוטנואידים. יחד עם זאת, התמונה עודנה אינה שלמה, שכן על פי התגובה המוצעת, צפוי היה להימצא גם תוצר הפירוק של violaxanthin בגודל של 13 פחמנים. אולם מולקולה זו, אף שאופיינה על ידי Eugster ו-Märki-Fischer, לא אותרה על ידם בעלי הכותרת של הוורדים שנחקרו על ידם, וגם לא על ידינו באנליזות GC-MS שביצענו לנדיפים המופרשים מפרחי 'פריסקו' ולמיצוי הנדיפים מעלי הכותרת (טבלה 6). ייתכן שתוצר הפירוק של violaxanthin בגודל 13 פחמנים עובר מודיפיקציות בדומה לתוצרי פירוק של קרוטנואידים אחרים כגון xanthoxin שנוצר בכרומופלסטידות ומובל לציטוזול, שם הוא עובר תהליכי חמצון וחיזור במסלול יצירת ההורמון ABA (Seo and Koshiha, 2002), או בדומה לפירוק קרוטנואידים המושרה על ידי מיקוריזה בשורשים. במקרה זה נגזרות של cyclohexenone, התוצר בעל 13 הפחמנים, עוברים גליקוזילציה ומידור בוקואולה (Fester et al., 2002).

כפי שתואר בסקירת הספרות, האנזימים CCD7 ו-CCD8 מזרזים פירוק קרוטנואידים בפלסטידות בשורשי ארבידופסיס ותוצר הפירוק, strigolactone, מובל במעלה הצמח ומהווה מולקולת סיגנל המדכאת פריצת ענפים לטרליים (Schwartz et al., 2004; Snowden et al., 2005; Gomez-Roldan et al., 2008). ייתכן שתהליך דומה מתקיים גם בעלי הכותרת, ושל תוצר הפירוק הנדון יש תפקיד ביולוגי. האפשרות הזו לא נבחנה בעבודה, אך היא עשויה לספק הסבר לאי איתורו של תוצר הפירוק של violaxanthin בגודל 13 פחמנים

ממצאים שפורסמו לאחרונה (Floss et al., 2008) הניבו זווית ראייה חדשה על התגובה המזורזת באמצעות האנזים CCD1: השתקת הגן *MtCCD1* בשורשי אספסת המאוכלסים במיקוריזה גרמה לעלייה ברמתה של מולקולה בגודל 27 פחמנים על חשבון ירידה חדה ברמתה של מולקולה בת 14 פחמנים. החוקרים הסיקו שהסובסטרט *in vivo* של CCD1 אינה מולקולת הקרוטנואיד בעלת 40 פחמנים ( $C_{40}$ ) אלא תוצר הפירוק הראשוני שלה – מולקולה בעלת 27 פחמנים ( $C_{27}$ ) אשר נגזרה מהקרוטנואיד השלם. בהתייחס למיקום התאי של CCD1 בציטוזול, תיארו החוקרים את פירוק הקרוטנואידים בשורשי אספסת כתהליך דו-שלבי: השלב הראשון מתרחש בתוך הפלסטידה ומזורז על ידי אנזים CCD פלסטידי. בשלב זה נחתך הקרוטנואיד בין פחמן 9 ל-10 באחד הקצוות ומתקבל תוצר בעל 27 פחמנים. בשלב השני תוצר הפירוק בעל 27 הפחמנים מובל אל הציטוזול שם הוא עובר חיתוך נוסף המזורז על ידי האנזים

CCD1. בכך אימצו החוקרים את המודל של Eugster ו-Märki-Fischer. כאמור, המודל הזה תקף גם לגבי התוצאות שהצגנו בעלי הכותרת של ורדים מזן 'פריסקו', אך החידה בנוגע למוצא התוצר בעל 13 הפחמנים נותרת בעינה.

## ה.10. סיכום

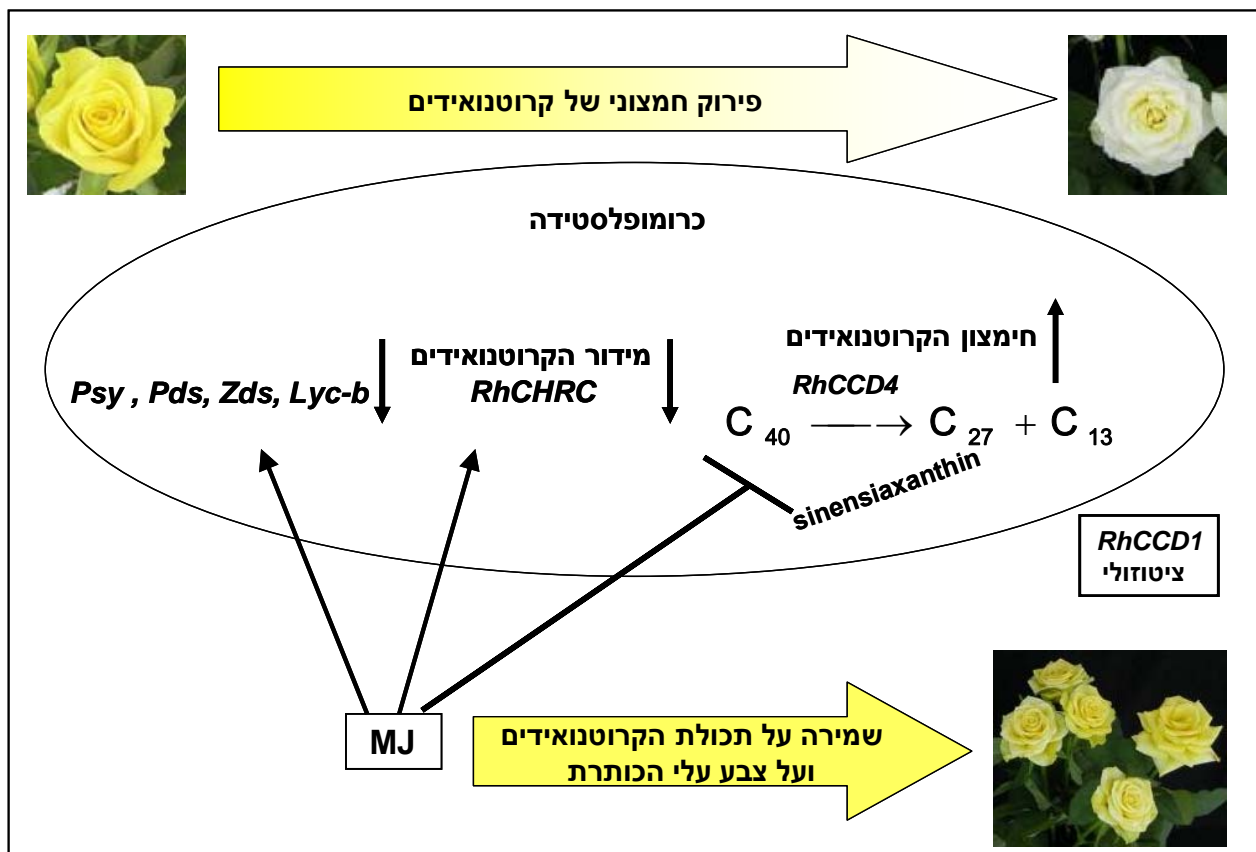
מחקר זה שופך אור על המנגנונים התאיים האחראים לתהליך דהיית הצבע בפרחי ורדים קטופים המכילים פיגמנטים קרוטנואידים בעלי הכותרת. מוצע, שפירוק הקרוטנואידים בפרחים נובע משילוב של שני תהליכים קטבוליים שמתקיימים בתאים שבעלי הכותרת במהלך חיי האגרטל. התהליך האחד הוא פירוק אנזימטי תוך-פלסטידי של הקרוטנואידים בעלי הכותרת: בפרחים מזן 'פריסקו' הקסנטופיל violaxanthin הוא המולקולה העיקרית התורמת לצבע הצהוב בעלי הכותרת. מולקולה זו ממודרת בפלסטוגלובולות שבכרומופלסטים ומחומצנת באמצעות האנזים RhCCD4 לקבלת התוצר sinensianxanthin בגודל של 27 פחמנים. האנזים RhCCD4 ממוקם בכרומופלסטים, וייתכן שמיקומו התוך-פלסטידי הוא בפלסטוגלובולות עצמן.

תהליך זה מתרחש במשולב עם תהליך קטבולי נוסף של פירוק המבנים הפנימיים בכרומופלסטידות. הפירוק התבטא בהקטנת צפיפות החומר שבכרומופלסטידות, בירידה ברמת החלבון RhCHRC ובביטוי הגן במקודד לו, בירידה מקבילה במספר הפלסטוגלובולות ובצפיפותן, ובהמשך חיי האגרטל גם בהרס הממברנה של הכרומופלסט. גם הגן *CCD1* נמצא בעלי הכותרת, אולם אנו משערים שתרומתו לדהיית הצבע בעלי הכותרת משנית, עקב מיקומו הציטוזולי. באיור 30 מתואר מודל המסכם את מנגנון פירוק הקרוטנואידים בעלי הכותרת ועיכוב פירוקם באמצעות הטיפול ב-MJ בהסתמך על הספרות ותוצאות המחקר הנוכחי.

מצאנו שריסוס והטענת הפרחים ב-MJ עיכב את דהיית הצבע בפרחי ורדים צהובים. הטיפול ב-MJ הפעיל במשולב מנגנונים שונים לשמירת עוצמת הצבע בעלי הכותרת כמפורט להלן:

1. הטיפול עודד יצירה של הקרוטנואידים בעלי הכותרת והשרה ביטוי מוגבר של הגנים במסלול יצירת הקרוטנואידים - *Pds* ו-*Zds*, ובחלק מהניסויים גם של *Psy* ו-*Lcy-b*.
2. הטיפול שיפר את מידור הקרוטנואידים על ידי הגברת רמת החלבון RhCHRC וביטוי הגן המקודד לו, וכן על ידי הגדלת מספר הפלסטוגלובולות בכרומופלסטים ושמירה על מבנה יציב יותר שלהם.
3. הטיפול הוריד את רמת ביטוי הגן *RhCCD4* הפלסטידי המקודד לחלבון שמזרז את פירוק הקרוטנואידים בעלי הכותרת. במקביל, הטיפול עיכב את הצטברות ה-*sinensianxanthin* שהוא תוצר הפירוק של *violaxanthin*.

מחקר זה מראה לראשונה השפעה מובהקת של MJ על מנגנון מידור הקרוטנואידים בכרומופלסטידות בעלי כותרת של פרחים, וכן על הגברת רמת הביטוי של גנים במסלול הביוסנתזה של קרוטנואידים, לאחר שמרבית ההשפעות של MJ על פיגמנטים התייחסו לאנתוציאנינים. המחקר תורם ידע חדש לדיון המדעי המתקיים בשנים האחרונות באשר לאופן פעילותם של האנזימים CCD1 הממוקם בציטוזול ו-CCD4 הממוקם בפלסטידות, ומציג מסלול פירוק חמצוני של קרוטנואידים בעלי כותרת של פרחים, כולל זיהוי לראשונה של המולקולה *sinensianxanthin* כאחד מתוצרי הפירוק במסלול זה.



**איור 30:** מודל המציג את המנגנונים המעורבים בדהיית הצבע בעלי הכותרת של פרחי ורדים מזן 'פריסקו' במהלך חיי האגרטל ואת ההשפעות של MJ על התהליך.

דהיית הפרחים נובעת מעצירת סינתזת הקרוטנואידים, מחמצון הקרוטנואידים המזורז באמצעות האנזים הפלסטידי *RhCCD4*, ומירידה ברמת החלבון המבני *RhCHRC* שמובילה להפחתה במספר הפלסטוגלובולות והרס מידור הקרוטנואידים בכרומופלסט. האנזים הפלסטידי *RhCCD4* מחמצן את הקרוטנואיד *violaxanthin* בן 40 פחמנים למולקולה בת 27 פחמנים שזוהתה כ- *sinensiaxanthin*, ולמולקולה בת 13 פחמנים שלא אותרה. טיפול ב-MJ מעכב את דהיית הצבע ושומר על רמת קרוטנואידים גבוהה יותר במהלך חיי האגרטל באמצעות הגברת סינתזת הקרוטנואידים, הגברת רמת החלבון *RhCHRC* ורמת הביטוי של הגן המקודד לו, והורדת רמת הביטוי של הגן המקודד לאנזים המחמצן, *RhCCD4*. האנזים הציטוזולי *RhCCD1* אינו משתתף בתהליך דהיית הצבע ואינו מושפע מ-MJ.

## ג. ביבליוגרפיה

- Asselbergh B, Curvers K, Franca SC, Audenaert K, Vuylsteke M, Van Breusegem F, Hofte M** (2007) Resistance to *Botrytis cinerea* in *sitiens*, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiol.* **144**: 1863-1877
- Bartely GE, Scolnik PA** (1995) Plant carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell* **7**: 1027-1038
- Booker J, Aldridge M, Wills S, McCarty D, Klee H, Leyser O** (2004) MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Curr. Biol.* **14**: 1232-1238
- Bossert A, Belin J, M.** (1994) Synthesis of  $\beta$ -ionone in an aldehyde/xanthin oxidase/ $\beta$ -carotene system involving free radical formation. *Biotech. Progress* **10**: 129-236
- Bouvier F, Backhaus RA, Camara B** (1998) Induction and control of chromoplast-specific carotenoid genes by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **273**: 30651-30659
- Bouvier F, Suire C, Mutterer J, Camara B** (2003) Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: Identification of the carotenoid dioxygenase *CsCCD* and *CsZCD* genes involved in Crocus secondary metabolite biogenesis. *Plant Cell* **15**: 47-62
- Bruce DB** (2000) Chloroplast transit peptides: Structure, function and evolution. *Trends Cell Biol.* **10**: 440-447
- Camara B, Bouvier F** (2004) Oxidative remodeling of plastid carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* **430**: 16-21
- Caris-Veyrat C, Schmid A, Carail M, Bohm V** (2003) Cleavage products of lycopene produced by *in vitro* oxidations: Characterization and mechanisms of formation. *J. Agri. Food Chem.* **51**: 7318-7325
- Clydesdale FM** (1978) Colorimetry - methodology and application. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **10**: 243-302
- Czapski J, Saniewski M** (1995) The effect of methyl jasmonate vapor on some characteristics of fruit ripening, carotenoids and tomatin changes in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Acta Agrobot.* **48**: 27-35
- Dafny-Yelin M, Guterman I, Menda I, Ovadis M, Shalit M, Pichersky E, Zamir D, Lewinsohn E, Adam Z, Weiss D, Vainstein A** (2005) Flower proteome: changes in protein spectrum during the advanced stages of rose petal development. *Planta* **222**: 37-46
- Deruere J, Romer S, d'Harlingue A, Backhaus RA, Kuntz M, Camara B** (1994) Fibril assembly and carotenoid over-accumulation in chromoplast: A model for supra-molecular lipoprotein structures. *Plant Cell* **6**: 119-133
- Eason JR, Webster D** (1995) Development and senescence of *Sandersonia aurantiaca* (Hook.) flowers. *Sci. Hort.* **63**: 113-121
- Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H** (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. *Nat. Protoc.* **2**: 953-971
- Eugster HC, Märki-Fischer E** (1991) The chemistry of rose pigments. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**: 654-672
- Evans RY, Reid MS** (1986) Control of petal expansion during diurnal opening of roses. *Acta Hort.* **181**: 55-63
- Evans RY, Reid MS** (1988) Changes in carbohydrates and osmotic potential during rhythmic expansion of rose petals. *J. Am. Hort. Sci.* **113**: 884-888
- Farmer EE, Johnson RR, Ryan CA** (1992) Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiol.* **98**: 995-1002.
- Fester T, Hause B, Schmidt D, Halfmann K, Schmidt J, Wray V, Hause G, Strack D**

- (2002) Occurrence and localization of apocarotenoids in arbuscular mycorrhizal plant roots. *Plant Cell Physiol.* **43**: 256-265
- Fleischman P, Studer K, Winterhalter P** (2002) Partial purification and kinetic characterization of a carotenoid cleavage enzyme from Quince Fruit (*Cydonia oblonga*). *J. Agric. Food Chem.* **50**: 1677-1680
- Fleischmann P, Watanabe N, Winterhalter P** (2003) Enzymatic carotenoid cleavage in star fruit (*Averrhoa carambola*). *Phytochem.* **63**: 133-137
- Floss DS, Schliemann W, Schmidt J, Strack D, Walter MH** (2008) RNA interference-mediated repression of *MtCCD1* in mycorrhizal Roots of *Medicago truncatula* causes accumulation of C27 apocarotenoids, shedding light on the functional role of CCD1. *Plant Physiol.* **148**: 1267-1282
- Galpaz N, Ronen G, Khalfa Z, Zamir D, Hirschberg J** (2006) A chromoplast-specific carotenoid biosynthesis pathway is revealed by cloning of the tomato white-flower locus. *Plant Cell* **18**: 1947-1960
- Gasic K, Hernandez A, Korban SS** (2004) RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Mol. Biol. Rep.* **22**: 437a-437g
- Gillet B, Beyly A, Peltier G, Rey P** (1998) Molecular characterization of CDSP 34, a chloroplastic protein induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants, and regulation of *CDSP34* expression by ABA and high illumination. *Plant J.* **16**: 257-262
- Girault T, François J, Rogniaux H, Pascal S, Delrot S, Coutos-Thévenot P, Gomès E** (2008) Exogenous application of a lipid transfer protein-jasmonic acid complex induces protection of grapevine towards infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol. Biochem.* **46**: 140-149
- Glick A, Philosoph-Hadas S, Vainstein A, Tadmor Y, Meir A, Meir S** (2007) Methyl jasmonate enhances color and carotenoid content of yellow-pigmented cut rose flowers. *Acta Hort.* **755**: 243-250
- Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer PB, Puech-Pagès V, Dun EA, Pillot JP, Letisse F, Matusova R, Danoun S, Portais JC, Bouwmeester H, Bécard G, Beveridge CA, Rameau C, Rochange SF** (2008) Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* **455**:176-177.
- González-Aguilar GA, Wang CY, Buta JG** (2001) Methyl jasmonate reduces chilling injury symptoms and enhances color development of Kent mangoes. *J. Sci. Food Agric.* **81**: 1244 - 1249
- Goossens A, Hakkinen ST, Laakso I, Seppanen-Laakso T, Biondi S, De Sutter V, Lammertyn F, Nuutila A, Soderlund H, Zabeau M, Inze D, Oksman-Caldentey KM** (2003) A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 8595-8600
- Govrin EM, Levine A** (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.* **10**:751-757
- Grotewold E** (2006) The Genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 761-780
- Guterman I, Shalit M, Menda N, Piestun D, Dafny-Yelin M, Shalev G, Bar E, Davydov O, Ovadis M, Emanuel M, Wang J, Adam Z, Pichersky E, Lewinsohn E, Zamir D, Vainstein A, Weiss D** (2002) Rose scent: Genomics approach to discovering novel floral fragrance-related genes. *Plant Cell* **14**: 2325-2338
- Hammond JBW** (1982) Changes in amylase activity during rose bud opening. *Sci. Hort.* **16**: 283-289
- He Y, Fukushige H, Hildebrand DF, Gan S** (2002) Evidence supporting a role of jasmonic acid in Arabidopsis leaf senescence. *Plant Physiol.* **128**: 876-884



- Hirschberg J** (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 208-210
- Hornero M** (2000) Xanthophyll esterification accompanying carotenoid over-accumulation in chromoplast of *Capsicum annuum* ripening fruits is a constitutive process and useful for ripeness index. *J. Agri. Food Chem.* **48**: 1617-1622
- Howe. G A** (2004) The roles of hormones in defense against insects and disease - jasmonates. In: *Plant Hormones* (Davies, P.J. Ed.), Kluwer Academic Publishers. pp. 610-634
- Huang FC, Molnár P, Schwab W** (2009) Cloning and functional characterization of carotenoid cleavage dioxygenase 4 genes. *J. Exp. Bot.* **60**: 3011-3022
- Jarillo JA, Capel J, Leyva A, Martínez-Zapater JM, Salinas J** (1994) Two related low-temperature-inducible genes of Arabidopsis encode proteins showing high homology to 14-3-3 proteins, a family of putative kinase regulators. *Plant Mol. Biol.* **4**: 693-704.
- Jilani A, Kar S, Bose S, Tripathy BC** (1996) Regulation of the carotenoid content and chloroplast development by levulinic acid. *Physiol. Plant.* **96**: 139-145
- Joubert DA, Slaughter AR, Kemp G, Becker JV, Krooshof GH, Bergmann C, Benen J, Pretorius IS, Vivier MA** (2006) The grapevine polygalacturonase-inhibiting protein (VvPGIP1) reduces *Botrytis cinerea* susceptibility in transgenic tobacco and differentially inhibits fungal polygalacturonases. *Transgenic Res.* **6**: 687-702.
- Kim HJ, Fonseca JM, Choi JH, Kubota C** (2007) Effect of methyl jasmonate on phenolic compounds and carotenoids of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Agric Food Chem.* **55**: 10366-10372
- Kim HUK, Wu SSH, Ratnayake C, Huang AHC** (2001) *Brassica rapa* has three genes that encode proteins associated with different neutral lipids in plastids of specific tissues. *Plant Physiol.* **126**: 330-341
- Kishimoto S, Ohmiya A** (2006) Regulation of carotenoid biosynthesis in petals and leaves of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) *Physiol. Plant.* **128**: 436-447
- Kovac M, Ravnkar M** (1994) The effect of jasmonic acid on the photosynthetic pigments of potato plants grown *in vitro*. *Plant Sci.* **103**: 11-17
- Laizet Y, Pontier D, Mache R, Kuntz M** (2004) Subfamily organization and phylogenetic origin of genes encoding plastid lipid-associated proteins of the fibrillin type. *J. Genome Sci. Technol.* **3**: 19-28
- Langenkämper G, Manac'h N, Broin M, Cuiñé S, Becuwe N, Kuntz M, Rey P** (2001) Accumulation of plastid lipid-associated proteins (fibrillin/CDSP34) upon oxidative stress, ageing and biotic stress in Solanaceae and in response to drought in other species. *J. Exp. Bot.* **52**: 1545-1554
- Leitner-Dagan Y, Ovadis M, Shklarman E, Elad Y, Rav David D, Vainstein A** (2006) Expression and functional analyses of the plastid lipid-associated protein CHRC suggests its role in chromoplastogenesis and stress. *Plant Physiol.* **142**: 233-244
- Lewinsohn E, Sitrit Y, Bar E, Azulay Y, Meir A, Zamir D, Tadmor Y** (2005) Carotenoid pigmentation affects the volatile composition of tomato and watermelon fruits, as revealed by comparative genetic analyses. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 3142-3148
- Lewis DH, Bloor SJ, Schwinn KE** (1998) Flavonoid and carotenoid pigments in flower tissue of *Sandersonia aurantiaca* (Hook.) *Sci. Hort.* **72**: 179-192
- Li L, Paolillo DJ, Parthasarathy MV, DiMuzio EM, Garvin DF** (2001) A novel gene mutation that confers abnormal patterns of  $\beta$ -carotene accumulation in cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis). *Plant J.* **18**: 651- 662
- Lois LM, Rodríguez-Concepción M, Gallego F, Campos N, Boronat A** (2000) Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: Regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J.* **22**: 503-513
- Lorenzo O, Piqueras R, Sanchez-Serrano JJ, Solano R** (2003) ETHYLENE RESPONSE

- FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* **15**: 165-178
- Lu S, Li L** (2008) Carotenoid metabolism: Biosynthesis, regulation, and beyond. *J Integr. Plant Biol.* **50**: 778-785
- Mahalingam R, Gomez-Buitrago A, Eckardt N, Shah N, Guevara-Garcia A, Day P, Raina R, Fedoroff N** (2003) Characterizing the stress/defense transcriptome of Arabidopsis. *Genome Biol.* **4**: R20
- Mahattanatawee K, Rouseff RL, Valim F, Naim M** (2005) Identification and aroma impact of norisoprenoids in orange juice. *J Agric Food Chem.* **2**: 393-397
- Manac'h N, Kuntz M** (1999) Stress induction of a nuclear gene encoding for a plastid protein is mediated by photo-oxidative events. *Plant Physiol. Biochem.* **37**: 859-868
- Martin D, Tholl D, Gershenzon J, Bohlmann J** (2002) Methyl jasmonate induces traumatic resin ducts, terpenoid resin biosynthesis, and terpenoid accumulation in developing xylem of Norway spruce stems. *Plant Physiol* **129**: 1003-1018
- Mayak S, Halevy AH** (1970) Cytokinin activity in rose petals and its relation to senescence. *Plant Physiol.* **46**: 497-499
- Meir S, Droby S, Davidson H, Alsevia S, Cohen L, Horev B, Philosoph-Hadas S** (1998) Suppression of Botrytis rot in cut rose flowers induced by postharvest application of methyl jasmonate. *Postharvest Biol. Technol.* **13**: 235-243
- Ohmiya A, Kishimoto S, Aida R, Yoshioka S, Sumitomo K** (2006) Carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4a) contributes to white color formation in *Chrysanthemum* petals. *Plant Physiol.* **142**: 1193-1201
- Ohmiya A, Kishimoto S, Aida R, Yoshioka S** (2008) Cut flowers and flower color - Biosynthesis and degradation of carotenoids in *Chrysanthemum* petals. In: Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology (Teixeira da Silva J.A., Ed.) Global Science Books Vol. 5: 85- 90
- Perez AG, Sanz C, Olias R, Olias JM** (1997) Effect of methyl jasmonate on *in vitro* strawberry ripening. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 3733-3737
- Perez AG, Sanz C, Richardson DG, Olias JM** (1993) Methyl jasmonate vapor promotes  $\beta$ -carotene synthesis and chlorophyll degradation in golden delicious apple peel. *J. Plant Growth Regul.* **12**: 163-167
- Porat R, Borochoy A, Halevy AH** (1993) Enhancement of petunia and dendrobium flower senescence by jasmonic acid methyl ester is via the promotion of ethylene production. *Plant Growth Regul.* **13**: 297-301
- Pozueta-Romero J, Rafia F, Houlm G, Cheniclet C, Carde JP, Schantz ML, Schantz R** (1997) A ubiquitous plant housekeeping gene, PAP, encodes a major protein component of bell pepper chromoplasts. *Plant Physiol.* **115**: 1185-1194
- Prebeg T, Ljubešić N, Wrisher M** (2006) Differentiation of chromoplasts in *Cucumis sativus* petals. *Intl. J. Plant Sci.* **167**: 437-445
- Rao MV, Lee H, Creelman RA, Mullet JE, Davis KR** (2000) Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *Plant Cell* **12**: 1633-1646
- Rey P, Gillet B, Romer S, Eymery F, Massimino J, Peltier G, Kuntz M** (2000) Over-expression of a pepper plastid lipid-associated protein in tobacco leads to changes in plastid ultrastructure and plant development upon stress. *Plant J.* **21**: 483-494
- Rockholm DC, Yamamoto HY** (1996) Violaxanthin de-epoxidase. *Plant Physiol.* **110**: 697-703
- Rodriguez Milla MA, Maurer A, Rodriguez Huete A, Gustafson JP** (2003) Glutathione peroxidase genes in Arabidopsis are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways. *Plant J.* **36**: 602-615
- Ronen G, Cohen M, Zamir D, Hirschberg J** (1999) Regulation of carotenoid biosynthesis

- during tomato fruit development: Expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. *Plant J.* **17**: 341-351.
- Rubio A, Rambla JL, Santaella M, Gomez MD, Orzaez D, Granell A, Gomez-Gomez L** (2008) Cytosolic and plastoglobule-targeted carotenoid dioxygenases from *Crocus sativus* are both involved in  $\beta$ -ionone release. *J. Biol. Chem.* **283**: 24816-24825
- Rudell DR, Mattheis JP, Fan X, Fellman JK** (2002) Methyl jasmonate enhances anthocyanin accumulation and modified production of phenolics and pigments in 'Fuji' apples. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **127**: 435-441
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM** (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 11655–11660
- Schwartz SH, Qin X, Loewen MC** (2004) The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. *J. Biol. Chem.* **279**: 46940-46945
- Schwartz SH, Qin X, Zeevaart JAD** (2001) Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. *J. Biol. Chem.* **276**: 25208-25211
- Schwartz SH, Tan BC, Gage DA, Zeevaart JAD, McCarty DR** (1997) Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of Maize. *Science* **276**: 1872-1874
- Seo M, Koshiba T** (2002) Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.* **7**: 41-48
- Shalit M, Shafir S, Larkov O, Bar E, Kaslassi D, Adam Z, Zamir D, Vainstein A, Weiss D, Ravid U, Lewinsohn E** (2004) Volatile compounds emitted by rose cultivars: Fragrance perception by man and honeybees. *Israel J. Plant Sci.* **52**: 245-255
- Simkin AJ, Breitenbach J, Kuntz M, Sandmann G** (2000) *In vitro* and *in situ* inhibition of carotenoid biosynthesis in *Capsicum annuum* by bleaching herbicides. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 4676-4680
- Simkin AJ, Schwartz SH, Auldrige M, Taylor MG, Klee HJ.** (2004a) The tomato *carotenoid cleavage dioxygenase 1* genes contribute to the formation of the flavor volatiles  $\beta$ -ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *Plant J.* **40**: 882-892
- Simkin AJ, Underwood BA, Auldrige M, Loucas HM, Shibuya K, Schmelz E, Clark DG, Klee HJ** (2004b) Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of  $\beta$ -Ionone, a fragrance volatile of petunia flowers. *Plant Physiol.* **136**: 3504-3514
- Smirra I, Halevy AH, Vainstein A** (1993) Isolation and characterization of a chromoplast-specific carotenoid-associated protein from *Cucumis sativus* corollas. *Plant Physiol.* **102**: 491-496
- Snowden KC, Simkin AJ, Janssen BJ, Templeton KR, Loucas HM, Simons JL, Karunairatnam S, Gleave AP, Clark DG, Klee HJ** (2005) The *Decreased apical dominance1/Petunia hybrida* *CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8* gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development. *Plant Cell* **17**: 746-759
- Tamari G, Borochoy A, Atzorn R, Weiss D** (1995) Methyl jasmonate induces pigmentation and flavonoid gene expression in petunia corollas: A possible role in wound response. *Physiol. Plant.* **94**: 45-50
- Tan BC, Joseph LM, Deng WT, Liu L, Li QB, Cline K, McCarty DR** (2003) Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family. *Plant J.* **35**: 44-56

- Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A** (2008) Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J.* **54**: 733-749
- Taylor M, Ramsay G**, (2005) Carotenoid biosynthesis in plant storage organs: recent advances and prospects for improving plant food quality. *Physiol. Plant.* **124**: 143-151
- Thaler JS, Owen B, Higgins VJ** (2004) The role of jasmonate response in plant susceptibility to diverse pathogens with a range of lifestyles. *Plant Physiol.* **135**: 530-538
- Thomma BPHJ, Eggermont K, Broekaert WF, Cammue BPA** (2000) Disease development of several fungi on *Arabidopsis* can be reduced by treatment with methyl jasmonate. *Plant Physiol. Biochem.* **38**: 421-427
- Tilney-Basset RAE** (1989) The diversity of the structure and function of higher plant plastids. In: *Physiology, Biochemistry, and Genetics of Nongreen Plastids - Current Topics in Plant Physiology: The American Society of Plant Physiologists* (Boyer CT, Shanon JC, Hardison RC Eds.) **2**: 1-13
- Tuominen H, Overmyer K, Keinänen M, Kollist H, Kangasjärvi J** (2004) Mutual antagonism of ethylene and jasmonic acid regulates ozone-induced spreading cell death in *Arabidopsis*. *Plant J.* **39**: 59-69
- Vainstein A, Halevy AH, Smirra I, Vishnevetsky M** (1994) Chromoplast biogenesis in *Cucumis sativus* corollas. *Plant Physiol.* **104**: 321-326
- Van Doorn WG, Schröder C** (1995) The abscission of rose petals. *Ann. Bot.* **76**: 539-544
- Van Doorn WG, Van Meeteren U** (2003) Flower opening and closure: a review. *J. Exp. Bot.* **54**: 1801-1812.
- Vasquez-Cacedo AL, Heller A, Neidhart S, Carle R** (2006) Chromoplast morphology and  $\beta$ -carotene accumulation during postharvest ripening of mango cv. 'Tommy Atkins'. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 5769-5776
- Vishnevetsky M, Ovadis M, Itzhaki H, Levy M, Libal-weksler Y, Adam Z, Vainstein A** (1996) Molecular cloning of a carotenoid-associated protein from *Cucumis sativus* corollas: Homologous genes involved in carotenoid sequestration in plants. *Plant J.* **10**: 1111-1118
- Vishnevetsky M, Ovadis M, Itzhaki H, Vainstein A** (1997) CHRC, encoding a chromoplast-specific carotenoid-associated protein, is an early gibberellic acid-responsive gene. *J. Biol. Chem.* **272**: 24747-24750
- Vishnevetsky M, Ovadis M, Vainstein A** (1999) Molecular mechanisms underlying carotenogenesis in the chromoplast: multilevel regulation of carotenoid-associated genes. *Plant J.* **20**: 423-431
- Vishnevetsky M, Ovadis M, Vainstein A** (1999) Carotenoid sequestration in plants: the role of carotenoid-associated proteins. *Trends Plant Sci.* **4**: 232-235
- Walter MH, Floss DS, Hans J, Fester T, Strack D** (2007) Apocarotenoid biosynthesis in arbuscular mycorrhizal roots: Contributions from methylerythritol phosphate pathway isogenes and tools for its manipulation. *Phytochem.* **68**: 130-138
- Wasternack C** (2007) Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.* **100**: 681-697
- Wellburn AR** (1994) The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* **144**: 307-313
- Wu Z, Robinson DS, Hughes RK, Casey R, Hardy D, West SI** (1999) Co-oxidation of  $\beta$ -carotene catalyzed by soybean and recombinant pea lipoxygenases *J. Agric. Food Chem.* **47**: 4899-4906
- Yang Y, Sulpice R, Himmelbach A, Meinhard M, Christmann A, Grill E** (2006) Fibrillin expression is regulated by abscisic acid response regulators and is involved in abscisic acid-mediated photoprotection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 6061-6066

**Ytterberg AJ, Peltier JB, van Wijk KJ** (2006) Protein profiling of plastoglobules in chloroplasts and chromoplasts. A surprising site for differential accumulation of metabolic enzymes. *Plant Physiol.* **140**: 984-997

## ז. נספח - רשימת פרסומים

### ז.1. מאמרים:

- Glick, A.**, Philosoph-Hadas, S., Vainstein, A., Meir, A., Tadmor, Y. and Meir, S. 2007. Methyl jasmonate enhances color and carotenoid content of yellow-pigmented cut rose flowers. *Acta Hort.* 755: 243-250.
- Meir, S., Kochanek, B., **Glick, A.**, Lers, A., Salim, S., Burd, S., Weiss, D. and Philosoph-Hadas, S. (2010). Reduced petal pigmentation in *Lisianthus* cut flowers under low light conditions is mediated via decreased expression of anthocyanin biosynthesis genes. *Acta Hort.* (In press).

### ז.2. תקצירים של הרצאות או פוסטרים בכנסים:

- Glick, A.**, Philosoph-Hadas, S., Vainstein, A., Weiss, D., Tadmor, Y., Droby, S. and Meir, S. (2006). Methyl jasmonate treatment postpones color fading in yellow-pigmented cut rose flowers. Abstract in The Annual Meeting of the Israeli Society of Plant Sciences, Rehovot, Israel. p. 30-31. (Poster presentation).
- Glick, A.**, Philosoph-Hadas, S., Vainstein, A., Tadmor, Y., Meir, A., and Meir, S. (2007). Delay of carotenoids degradation in petals of cut roses by methyl jasmonate is associated with expression inhibition of carotenoid cleavage dioxygenase (*CCD*) genes. Abstract in The Annual Meeting of the Israeli Society of Plant Sciences, Rehovot, Israel. p. 25.
- Glick, A.**, Philosoph-Hadas, S., Vainstein, A., Tadmor, Y., Meir, A., and Meir, S. (2007). Methyl jasmonate delays the oxidation-mediated carotenoid degradation in petals of yellow-pigmented cut roses, and inhibits gene expression of a carotenoid cleavage dioxygenase (*CCD*). Abstract in the Proceedings of the 19th Meeting of the International Plant Growth Substances Association (IPGSA), Puerto Vallarta, Mexico, p. 75. (Poster presentation).
- Glick, A.**, Philosoph-Hadas, S., Vainstein, A., Meir, A., Tadmor, Y. and Meir, S. (2007). Retention of carotenoid content in petals of yellow-pigmented cut roses by methyl jasmonate: physiological and molecular characterization. Abstract and lecture in the International Conference on Quality Management in Supply Chain of Ornamentals (QMSCO 2007), Bangkok, Thailand.
- Glick, A.**, Philosoph-Hadas, S., Vainstein, A., Kachanovski, D., Meir, A., Tadmor, Y. and Meir, S. (2008). Methyl jasmonate retains carotenoid content in yellow-pigmented cut roses by delaying carotenoid degradation and stabilizing the carotenoids in the petals. Lecture in COST 924 Workshop on Plant Growth Regulators, Harvest Time and Commodity Quality, Bet-Dagan, Israel.

## Abstract

Various yellow-pigmented cut rose (*Rosa hybrida*) cultivars such as 'Frisco' and 'Golden Gate', show color fading during their vase life. The petal color intensity of these cultivars increased during the first two days of vase life and gradually decreased thereafter. A combined spray and pulse application of methyl jasmonate (MJ) to the cut roses retained their petal color intensity throughout vase life. Pigment analysis revealed that the major pigments of these rose cultivars are carotenoids, and that the MJ treatment increased their content.

Our research hypothesis postulates that the biosynthesis and degradation processes of carotenoids occur in parallel in the petals of cut roses during vase life. Therefore, the color changes obtained during vase life result from changes in the dominance of the biosynthesis and degradation processes, leading to color fading. Additionally, we have assumed that the carotenoid biosynthesis in 'Frisco' flowers is regulated at the molecular level, and that they are degraded via oxidative processes, catalyzed by a plastidic enzyme. Carotenoid degradation depends also on the destruction of the carotenoid sequestration inside the chromoplasts. We assumed that MJ treatment enhances petal color by increasing carotenoid biosynthesis and stability in the petals, as well as by inhibiting their oxidative degradation.

The following research objectives were outlined in order to examine the hypotheses:

1. Characterization of the carotenoid content and composition in petals of yellow-pigmented 'Frisco' and 'Golden Gate' roses, and examining the effect of MJ treatment on these parameters.
2. Examining the expression of genes encoding enzymes of the carotenoid biosynthesis pathway in petals of yellow-pigmented roses during vase life, and the effect of MJ treatment on their expression.
3. Isolation of additional genes related to carotenoid stability and degradation, whose expression is modified in response to the MJ treatment, and examining the relation between these changes and enhanced petal color.
4. Examining the hypothesis that fading of color in yellow-pigmented roses during vase life is derived from carotenoid degradation via their enzymatic oxidation in the chromoplasts, and that MJ treatment delayed these processes.

Preliminary experiments showed that the carotenoids accumulated in control 'Frisco' flowers until the second day of vase life and decreased later on, while in MJ-treated flowers the carotenoids continued to accumulate until day four. Using norflurazon (NF), an inhibitor of carotenoid biosynthesis, we were able to separate the biosynthesis and degradation processes.

We showed that MJ treatment increased flower color in 'Frisco' petals both by enhancing carotenoid biosynthesis and by delaying their degradation in the different flower whorls. A similar effect of MJ in enhancing total carotenoid content was obtained also with 'Golden Gate' flowers.

The carotenoid extracts from 'Frisco' flower petals were separated by HPLC and their components were identified. The major carotenoids in the petals were identified as violaxanthin and neoxanthin, which comprised about 85% of the total carotenoid content in the petals. Additionally, at early stages of vase life, we found a variety of other carotenoids, which gradually decreased at advanced stages of vase life. This degradation was accompanied by a parallel accumulation of an unidentified product designated as 'peak 1' according to its early appearance in the chromatogram. MJ treatment increased the total carotenoid content in the flowers, but did not change the relative proportions among the different carotenoid components. In contrast, MJ treatment had an opposite effect on 'peak 1' and it delayed its accumulation in the petals.

In order to examine the changes occurring in carotenoid biosynthesis during vase life, we have assayed the expression pattern of several carotenoid biosynthesis genes in petals of control and MJ-treated 'Frisco' flowers. For this purpose, segments of the genes *Phytoene Desaturase (Pds)* and *Lycopene Cyclase (Lcy-b)* were cloned from petals of 'Frisco' flowers.

The  $\zeta$ -*Carotene Desaturase (Zds)* was the gene most affected by MJ treatment. The treatment extended its expression during vase life compared to control flowers. MJ treatment also enhanced the expression of *Pds* at early stages of vase life. The effect of MJ treatment on transcript levels of *Pds* and *Lcy* was not definite, since an increase in the expression level of these genes in response to the MJ treatment was obtained only in several tests.

Two subtraction libraries were constructed from MJ-treated vs. non-treated 'Frisco' flowers in order to isolate genes related to carotenoid stability and degradation with increased expression during the first 24 and 48 h following the MJ treatment. A total of 74 segments with increased expression in response to MJ were isolated from the two libraries, but Northern blot analyses performed for 28 of them resulted only in minor differences between MJ-treated and untreated flowers. Nonetheless, further analyses of the subtraction library confirmed that MJ treatment increased the expression of a gene encoding for the Chromoplast Protein C (CHRC), associated with carotenoid sequestration into the plastoglobules of the chromoplasts. Semi-quantitative RT-PCR analysis revealed that MJ treatment increased the expression level of the *CHRC* gene during most of the vase life. Additionally, a Western blot analysis revealed that starting from day 2, MJ treatment increased the protein level of CHRC in the flowers, while in



control flowers the protein level decreased between days 4 and 5 of vase life. Regarding these results, we have used electron microscopy analysis to examine the internal structures of the chromoplasts in the petals of 'Frisco' flowers during vase life. The results showed that starting from day 2, the MJ-treated flowers contained a significantly higher amount of plastoglobules in the chromoplasts. Additionally, chromoplasts sampled at day 4 from the faded top petal region, were completely degraded, while chromoplasts sampled from the colored base region of the petal, remained intact. These results further imply the positive correlation between high carotenoid content and intense yellow color, and between the integrity of petal chromoplasts and the number of their plastoglobules.

Incubation of cut 'Frisco' flowers in a low (2%) oxygen atmosphere significantly retained petal color and carotenoid levels for 9 days. This indicates that oxidative processes are involved in carotenoid degradation, possibly via the Carotenoid Cleavage Dioxygenase (CCD) enzyme. Therefore, we have cloned from 'Frisco' roses segments of two *CCD* genes - *RhCCD1* and *RhCCD4*. A bioinformatic analysis of the translated protein sequences of these two genes predicted that a chromoplast transit peptide is present in RhCCD4 but not in RhCCD1, which therefore seems to be located in the cytosol.

The expression of these two genes was examined by Northern blot analysis in the two rose cultivars 'Frisco' and 'Golden gate', which differ in their rate of color fading and petal carotenoid degradation. The results showed a high correlation between the expression pattern of *RhCCD4* and the rate of petal carotenoid degradation in both cultivars. In 'Frisco', the expression level of *RhCCD4* increased at day 2, parallel to the starting point of the petal color fading, and was sustained at a high level until day 5. In 'Golden Gate' flowers fading started at the end of the vase life, as the expression level of *RhCCd4* was basal until day 5 and it began to increase only at day 6. Unlike this clear correlation, the expression pattern of *RhCCD1* did not match the color fading pattern of both cultivars. In addition, MJ treatment reduced the expression level of *RhCCD4* but not that of *RhCCD1*. Taken together, these results support the hypotheses that RhCCD4 catalyses carotenoid degradation in 'Frisco' petals, resulting in color fading, and that MJ treatment delayed color fading by decreasing the expression of its gene.

Regarding these results, we hypothesized that the compound 'peak1', which was found in the HPLC analysis and whose level increased during the vase life, is the product of a carotenoid oxidation reaction catalyzed by RhCCD4. An LC/MS analysis performed on the carotenoid extract from 'Frisco' petals revealed that 'peak1' has the same carbon number (C<sub>27</sub>), the same ionic mass and it includes two hydroxyl groups in his structure as sinensiaxanthin, which was formerly identified as the degradation product of violaxanthin, Therefore, it is

suggested that 'peak 1' is the product of the degradation reaction of violaxanthin, which occurs in chromoplasts of 'Frisco' petals and is catalyzed by RhCCD4.

The second product expected from this cleavage reaction is a C13 volatile molecule. We hypothesized that higher amounts of such a molecule would be emitted from control flowers than from MJ-treated flowers. However, the molecule could not be identified neither in GCMS analyses performed to volatiles emitted from 'Frisco' flowers, nor to volatile extracts obtained from crushed petals.

### **Summary and Conclusions:**

This research sheds light on the cellular mechanisms involved in the color fading of cut rose flowers containing carotenoid pigments in the petals. Our results suggest that the carotenoid degradation in the petals during vase life is controlled by two combined catabolic processes: An enzymatic carotenoid degradation reaction occurring inside the chromoplasts, in which violaxanthin, the major carotenoid in 'Frisco' petals sequestered into plastoglobules inside the chromoplast, is oxidized by RhCCD4 to produce the C27 apocarotenoid, sinensiaxanthin. This reaction is combined with a second catabolic process - the degradation of internal structures of the chromoplasts. This degradation is manifested in decreased density and number of plastoglobules, accompanied by a parallel decrease in the level of the structural protein, RhCHC, and the reduced expression level of its gene transcript. At advanced stages of vase life, the chromoplast membranes are finally destroyed. The *RhCCD1* gene, which was also found to be located in the petals, does not seem to be involved in the color fading process because it is presumably located in the cytosol.

A combined pulse and spray MJ application to the cut flowers increased the yellow color in 'Frisco' flowers during vase life via the following mechanisms: By up-regulation of carotenoid biosynthesis genes, by increasing the plastoglobules in which the carotenoids are sequestered, by increasing the level of the structural protein, RhCHRC and down-regulation of *RhCCD4* which encodes an enzyme that catalyzes carotenoid oxidation in the chromoplasts.

Our research is the first report that demonstrates a significant effect of MJ on the carotenoid sequestration mechanism in petal chromoplasts, and on increasing the expression level of different genes encoding key enzymes of the carotenoid biosynthesis pathway. The present research also presents new evidence to the scientific debate of the last years, regarding the mode of action of the cytosolic CCD1 enzyme and the plastidic CCD4 enzyme, by demonstrating a carotenoid oxidative degradation pathway, including the identification of one of its products.

D.5.1. Effect of Low-Oxygen Atmosphere Incubation on Carotenoid Degradation	55
D.5.2. Cloning <i>RhCCD1</i> and <i>RhCCD4</i> Gene Segments and Prediction of their Cellular Localization	58
D.5.3. Changes in <i>RhCCD1</i> and <i>RhCCD4</i> Gene Expression during Vase Life in ‘Frisco’ and ‘Golden Gate’ Roses and Effect of MJ Treatment on their Expression	58
D.5.4. Characterizing of ‘Peak 1’ as an Oxidative Degradation Product of Violaxanthin	60
D.5.5. The Volatile Composition of ‘Frisco’ Petals during Carotenoid Degradation and Effect of MJ Treatment on this Composition	63
<b>E. DISCUSSION AND CONCLUSIONS</b>	65
<b>E.1.</b> Changes in Color and Carotenoid Content of ‘Frisco’ Roses during Vase Life	65
<b>E.2.</b> Enhancement of Color and Carotenoid Content in ‘Frisco’ and Other Rose Cultivars by MJ Treatment	65
<b>E.3.</b> Changes in Carotenoid Composition in Rose Petals during Vase Life and Effect of MJ Treatment on these Changes	67
<b>E.4.</b> Effect of MJ Treatment on Expression of Genes of the Carotenoid Biosynthesis Pathway in ‘Frisco’ Petals during Vase Life	69
<b>E.5.</b> The Role of RhCHRC Protein in Carotenoid Sequestration in ‘Frisco’ Petals	69
<b>E.6.</b> Effect of MJ Treatment and the Presence of RhCHRC Protein in Flower Petals on Pathogen-Defense Mechanisms	72
<b>E.7.</b> Characterization of the Carotenoid Oxidative Enzymes in Rose Petals	72
E.7.1. <i>RhCCD1</i>	73
E.7.2. <i>RhCCD4</i>	73
<b>E.8.</b> Identification of ‘Peak 1’ as a Degradation Product of Violaxanthin Catalyzed by the <i>RhCCD4</i> Enzyme	74
<b>E.9.</b> The Carotenoid Degradation Process - Models and Evidence	75
<b>E.10.</b> Summary	76
<b>F. BIBLIOGRAPHY</b>	77
<b>G. APPENDIX – LIST OF PUBLICATIONS</b>	84
<b>G.1.</b> Articles	84
<b>G.2.</b> Abstracts of Lectures or Posters in Conferences	84
<b>ENGLISH ABSTRACT</b>	I

D.1.1. Changes in the Color Appearance of ‘Frisco’ and ‘Golden Gate’ Rose Cultivars during Vase Life and Effects of MJ Treatment	25
D.1.2. Identification of the Yellow Pigment in ‘Frisco’ and ‘Golden Gate’ Roses	25
D.1.3. Effect of MJ Treatment on Color Appearance of Various Rose Cultivars during Vase Life	25
D.1.4. Effect of MJ Treatment on Changes in Flower Diameter and Weight of ‘Frisco’ Roses during Vase Life	26
<b>D.2.</b> Changes in the Carotenoid Content and Composition in Petals of ‘Frisco’ and ‘Golden Gate’ Roses during Vase Life and the Effect of MJ Treatment on these Changes	31
D.2.1. Changes in the Carotenoid Content of ‘Frisco’ Roses and the Effect of MJ Treatment on these Changes	31
D.2.2. Changes in the Carotenoid Composition of ‘Frisco’ Roses during Vase Life and the Effect of MJ Treatment on these Changes	36
D.2.3. Changes in the Carotenoid Content and Composition of ‘Golden Gate’ Roses during Vase Life and the Effect of MJ Treatment on these Changes	41
<b>D.3.</b> Changes in Expression of Genes of the Carotenoid Biosynthesis Pathway in Rose Petals and Effect of MJ Treatment on their Expression during Vase Life	43
D.3.1. Identification and Cloning of Genes Encoding Enzymes of the Carotenoid Biosynthesis Pathway in Roses	43
D.3.2. Changes in the Expression of Genes of the Carotenoid Biosynthesis Pathway in Rose Petals and Effect of MJ Treatment on their Expression during Vase Life	43
<b>D.4.</b> Changes in Carotenoid Sequestration in Petal Chromoplasts during Vase Life and Effect of MJ Treatment on their Sequestration	46
D.4.1. Analysis of MJ-induced Genes From a Subtraction Library	46
D.4.2. Changes in the Expression Pattern of the <i>RhCHRC</i> Gene and Protein Level in ‘Frisco’ Petals during Vase Life and Effect of MJ Treatment on these Changes	49
D.4.3. Changes in the Chromoplast Structure of ‘Frisco’ Petals and Effect of MJ Treatment on their Structure	51
<b>D.5.</b> Characterization of Oxidative Processes Involved in Carotenoid Degradation in ‘Frisco’ Petals and Analysis of the Effect of MJ Treatment on these Processes	55

## Table of Contents

<b>A. ABSTRACT IN HEBREW</b>	i
<b>LIST OF ABBREVIATIONS</b>	1
<b>B. INTRODUCTION</b>	3
<b>B.1.</b> Presentation of the Research Subject	3
<b>B.2.</b> Pigments in Flowers and Fruit	3
<b>B.3.</b> Carotenoids in Plants	3
<b>B.4.</b> The Carotenoid Biosynthesis Pathway	4
<b>B.5.</b> Regulation of Carotenoid Biosynthesis	4
<b>B.6.</b> Carotenoid Biosynthesis and the Role of Fibrillin Proteins	6
<b>B.7.</b> Carotenoid Degradation Pathways and Characterizations of Degradation Products	8
<b>B.8.</b> Pigments, Color Changes and Carotenoid Degradation in Roses	11
<b>B.9.</b> Plant Responses to Jasmonic Acid or Methyl Jasmonate and their effect on Carotenoids	13
<b>B.10.</b> The Research Hypothesis	14
<b>B.11.</b> Research Goals	14
<b>C. METHODOLOGY</b>	16
<b>C.1.</b> Plant Treatments	16
<b>C.2.</b> Measurements of Color Intensity	16
<b>C.3.</b> Identification of the Pigment Type in Rose Petals	17
<b>C.4.</b> Carotenoid Extraction and Concentration Determination	18
<b>C.5.</b> Carotenoid Chromatography and Identification	18
<b>C.6.</b> LC/MS Analysis	19
<b>C.7.</b> Molecular Procedures	19
<b>C.8.</b> Protein Analyses: Extraction, Quantification, Electrophoresis and Western Blot Analysis of RhCHRC Protein	22
<b>C.9.</b> Analysis of the Volatiles Composition in 'Frisco' Roses	23
<b>C.10.</b> Electron Microscopy Procedures	23
<b>D. RESULTS</b>	25
<b>D.1.</b> Petal Appearance of Cut Roses During Vase Life and Effect of MJ Treatment on their Appearance	25

This work was carried out under the supervision of:

**Dr. Shimon Meir**

Department of Postharvest Science of Fresh Produce

Agricultural Research Organization (ARO)

The Volcani Center

**Prof. Alexander Vainstein**

The Robert H. Smith Institute of Plant Sciences and Genetics in Agriculture

The Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment

The Hebrew University of Jerusalem

**Synthesis and Degradation of  
Carotenoids in Cut Rose Petals During  
Vase Life, and Characterization of the  
Effect of Methyl Jasmonate Treatment  
on these Processes**

**Thesis submitted for the degree of  
“Doctor of Philosophy”**

**By  
Alon Glick**

**Submitted to the Senate of the Hebrew University of Jerusalem  
December, 2009**