

**מעורבות β גלוקוזידאזות בפירוק אנטוציאנינים בפרחי
צמח הברונפלסיה**

עבודת גמר

**מוגשת לפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה של
האוניברסיטה העברית בירושלים
לשם קבלת תואר "מוסמך במדעי החקלאות"**

מאת

רעיה ליברמן

אוקטובר 2010

רחובות

תשרי תשע"א

עבודה זו נעשתה בהדרכת

ד"ר מיכל אורן-שמיר

המכון למדעי הצמח, המחלקה לפרחים, מרכז וולקני

ופרופ' דוד וייס

המחלקה למטעים וצמחי נוי,

הפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה

תקציר העבודה

אנטוציאנינים הינם מטבוליטים שניוניים השייכים לקבוצת הפלבנואידים והם האחראים למגוון פיגמנטים סגולים, אדומים וכחולים בעולם הצומח. אנטוציאנינים מצטברים בואקואולות, בעיקר בתאי האפידרמיס בפרחים, בפירות ובעלווה. בשל החשיבות המסחרית הגבוהה של צבע התוצרת החקלאית ואף בשל יכולתם לשמש כנוגדי חמצון טבעיים, מסלולי הביוסינטזה של אנטוציאנינים בפרחים ובפירות נחקרו ואופיינו בהרחבה, בעוד פירוק אנטוציאנינים זכה להתייחסות מועטה ונלמד בעיקר במחקרים העוסקים במיצי פירות וביין. הבנת תהליך הפירוק בצמח השלם, תאפשר הגברת פיגמנטציה בגידולים שונים.

ממחקרים שנעשו אודות תהליך הפירוק במיצי פירות, פירות מעובדים וביין עולה כי פירוק אנזימטי של אנטוציאנינים מתרחש במערכות אלו. נמצאו מספר קבוצות אנזימים המעורבות בתהליך הפירוק האנזימטי ובהן: β גלוקוזידאזות (anthocyanases), פרוקסידאזות ופוליפנול-אוקסידאזות. אחד המודלים המוצעים לתהליך הפירוק הינו תהליך דו שלבי הכולל את הסרת השיירים הסוכריים המתמירים את מולקולת האנטוציאנין על ידי אנזימים ממשפחת ה- β גלוקוזידאז, מה שמעלה את אפיניות האנזימים המחמצנים למולקולת האנטוציאנין. בעקבות תהליך זה נחשפת המולקולה לחמצון על ידי אנזימים ממשפחות הפרוקסידאז והפוליפנול-אוקסידאז.

פרחי צמח הברונפליסיה נבחרו לשמש כמערכת מודל ללימוד תהליך הפירוק בצמח השלם בשל מספר סיבות ובהן: שינוי הצבע המהיר המתרחש בפרחים אשר ביום פתיחתם הינם סגולים כהים ותוך שלושה ימים מלבינים כליל. נמצא כי שינוי צבע זה מתרחש כתוצאה מפירוק האנטוציאנין בפרחים. פירוק זה מתרחש אף בפרחים מנותקים מן הצמח מיום פתיחתם הטבולים בתמיסת סוכרוז. השתייכות צמח הברונפליסיה למשפחת הסולניים מהווה יתרון משמעותי בשל האפשרות להשוואת רצפים מול צמחים המשתייכים למשפחה ואשר הידע לגביהם נרחב הרבה יותר כדוגמת פטוניה, טבק ועגבניה.

תוך הסתמכות על הידע הקיים אודות תהליך הפירוק *in vitro* ועל המודל הדו-שלבי המתואר, עבודה זו התמקדה בבחינת מעורבותם של אנזימים ממשפחת ה- β גלוקוזידאז בתהליך הפירוק האנזימטי של אנטוציאנינים בפרחי הברונפליסיה.

ניסויים ראשוניים שנערכו עסקו בבחינת פעילות כללית של אנזימים ממשפחת ה- β גלוקוזידאז בשלבי התפתחות שונים של הפרח והשפעת עיכוב פעילות אנזימים ממשפחה זו על תהליך הפירוק. תוצאות ניסויים אלו הצביעו על כך שישנם שינויים ברמות הפעילות האנזימטית הכללית של אנזימי משפחת ה- β גלוקוזידאז וכי עיכוב פעילות אנזימים אלה גורם לעיכוב תהליך הפירוק. תוצאות אלה מצביעות על מעורבות אפשרית של אנזימי משפחת ה- β גלוקוזידאז בתהליך פירוק האנטוציאנין. משפחה רחבה זו מכילה מאות גנים, הנבדלים בהתמחותם בהידרוליזה של מולקולות סוכר שונות ובזיהוי אגליקונים מותמרים שונים. מכאן עלה הצורך בהתמקדות בתת משפחה ספציפית מתוך משפחה נרחבת זו. מכיוון שהאנטוציאנינים בפרחי ברונפליסיה מותמרים בדו סוכרים הוחלט לשים דגש על תת משפחת (GH1) Glycosyl Hydrolase family 1,

המתמחה בהידרוליזה של התמרות דו סוכריות. רצף הגן *GHI* המשתייך לתת משפחה זו בודד מפרחי הברונפלסיה ומעורבותו האפשרית בתהליך הפירוק נבחנה בשיטות שונות.

ראשית, נבדק פרופיל הביטוי של הגן בזמן התפתחות הפרח ופירוק האנטוציאנינים. נמצא כי ישנם שינויים ברמות הביטוי של הגן במקביל לתהליך הפירוק. ביטוי גבוה במיוחד של הגן נמצא מספר שעות לפני פתיחת הפרח, וביטוי נמשך לאורך כל תהליך הפירוק. בהמשך, רצף הגן תורגם ונמצא כי ברצף קיים סיגנל הפרשה כמצופה מחלבון אשר מעורב בתהליך פירוק האנטוציאנינים הנשלחים לואקואולה. בעקבות מציאת סיגנל זה נעשתה עבודה ראשונית לבחינת מידורו התוך תאי של החלבון *GHI*, אשר תוצאותיה עדיין אינן חד משמעיות.

על מנת לבחון השפעת ביטוי ביתר של הגן בצמח השלם ובשל הקושי הקיים בהתמרת צמח הברונפלסיה, נערכו הניסויים במספר מערכות מודל צמחיות המשתייכות למשפחת הסולניים. ראשית, נעשתה טרנספורמציה קבועה של פלסמיד המכיל את רצף הגן לתרבית תאי טבק BY-2 אשר הוזנו בפלבנואידים בעלי התמרות סוכריות שונות. ממיצוי והפרדת הפלבנואידים מתאים אלו לא נמצאה השפעה של ביטוי הגן על מבנה הפלבנואידים ורמת הגליקוזילציה שלהם. כמו כן, נעשתה טרנספורמציה חולפת של אותו פלסמיד לפרחי פטוניה ולעלי צמחי טבק טרנסגניים המבטאים ביתר את הגן *PAPI*, מה שגורם לביוסניטזה מוגברת של אנטוציאנינים בצמחים אלה. בניסויים אלו נבדקו שני פרמטרים: הרכב וכמות האנטוציאנינים ברקמה המותמרת. מבחינת הרכב האנטוציאנינים השונים מתוך סך האנטוציאנינים נראו הבדלים קלים. בפרמטר השני שנבדק, כמות האנטוציאנינים ביחס למשקל הרקמה, נמצא כי בפרחים ובעלי הטבק המבטאים ביתר את הגן *GHI* כמות האנטוציאנינים הכוללת נמוכה מזו שבפרחי ובעלי הביקורת. לסיכום, תוצאות עבודה זו מצביעות על סבירות גבוהה למעורבות של אנזימים ממשפחת ה- β גלוקוזידאז בתהליך פירוק האנטוציאנין ועל האפשרות כי אנזים ספציפי, *GHI*, משחק תפקיד בתהליך הפירוק. על מנת להוכיח זאת חד משמעית יש צורך ביצירת צמחים טרנסגניים המבטאים ביתר את הגן או אשר ביטוי מושתק בהם ולבחון את ההשפעות על תהליך פירוק האנטוציאנין. כמו כן, במסגרת עבודה זו נמשך פיתוח מערכות רגנרציה וטרנספורמציה של צמח הברונפלסיה אשר ישמשו להמשך בחינת מעורבות גנים שונים בתהליך הפירוק בצמח זה.

	תוכן עניינים
1	תוכן עניינים
3	רשימת קיצורים
5	1. מבוא
5	1.1 אנטוציאנינים בצמחים
6	1.2 מסלול הביוסינטזה של אנטוציאנינים
7	1.3 שילוח האנטוציאנין לואקואולה והצטברותו
8	1.4 פירוק אנטוציאנינים בצמח השלם
10	1.4.1 פירוק אנזימטי של אנטוציאנינים
11	1.4.2 β גלוקוזידאזות מתת משפחת (GH1) Glycosyl Hydrolase Family 1
12	1.5 הברונפלסיה כצמח מודל ללימוד תהליך פירוק אנטוציאנין <i>in vivo</i>
14	מטרות העבודה
15	2. שיטות וחומרים
15	2.1 גידול צמחים, תרביות תאים ואיסוף חומר ביולוגי
15	2.1.1 צמחי ברונפלסיה (<i>Brunfelsia calycina</i>)
15	2.1.2 צמחי טבק (<i>Nicotiana tabacum</i>)
15	2.1.3 צמחי פטוניה (<i>Petunia hybrida</i>)
15	2.1.4 תרביות תאי טבק (<i>Nicotiana tabacum</i>) Bright Yellow 2 (BY-2) tobacco
15	2.2 טיפול בתמיסת D-gluconic acid (מעכב פעילות β גלוקוזידאז) בפרחים מנותקים
16	2.3 מיצוי, קביעת ריכוז ואפיון אנטוציאנינים בפרחי ברונפלסיה, פרחי פטוניה וטבק
16	2.3.1 אפיון אנטוציאנינים באמצעות אנליזת HPLC
16	2.4 בידוד וריצוף הגן
16	2.4.1 הפקת Total RNA
17	2.4.2 הפקת mRNA מ-Total RNA
17	2.4.3 הכנת cDNA
17	2.4.4 תכנון תחלים ל-PCR (Polymerase Chain Reaction)
17	2.4.5 ריאקציות ה-PCR וניקוי התוצרים מגיל אגרוז
18	2.4.5.1 הכנת גיל אגרוז
18	2.4.5.2 הפקת DNA מגיל אגרוז
18	2.4.6 שיבוט לוקטור pGem-T easy לסריקת תוצרי PCR
18	2.4.7 הפקת DNA פלסמידי מחיידקים
18	2.4.8 קביעת רצף
19	2.5 ריבוי תוצרי ה-PCR
19	2.5.1 הכנת חיידקים אלקטרו קומפטנטים

19	2.6 ריאקציות Real-Time PCR
20	2.7 בניית קונסטרקט לביטוי ביתר של הגן <i>GHI</i> שבודד מצמח הברונפלסיה
21	2.8 טרנספורמציה לצמחי טבק ופטוניה
21	2.8.1 טרנספורמציה חולפת באמצעות אינפילטרציה (הזרקה)
21	2.8.2 טרנספורמציה קבועה לתאי טבק
22	2.9 בדיקת מיקום תוך תאי של החלבון <i>GHI</i>
22	2.9.1 בניית קונסטרקט לבדיקת מיקום תוך תאי של החלבון <i>GHI</i>
22	2.9.2 טרנספורמציה חולפת לפרוטופלסטים מתאי מזופיל של צמחי טבק
23	2.10 מיקרוסקופיה קונפוקלית
23	2.11 אפיון תוצרי פעילות אנזימטית של האנזים <i>GHI</i>
24	2.12 מיצוי וקביעת ריכוז חלבונים מפרחי ברונפלסיה
24	2.13 מדידת פעילות β גלוקוזידאזות
25	3. תוצאות
25	3.1 מעורבות גנים ממשפחת ה- β גלוקוזידאז בפירוק אנטוציאנינים
25	3.1.1 בחינת השפעת עיכוב פעילות β גלוקוזידאזות בפרחי ברונפלסיה על תהליך הפירוק
27	3.1.2 בדיקת פעילות אנזימטית של חלבונים ממשפחת ה- β גלוקוזידאז
29	3.2 בחירת תת משפחה ספציפית ממשפחת ה- β גלוקוזידאז
29	3.2.1 ריצוף הגן <i>GHI</i>
30	3.2.2 בדיקת הימצאות סיגנל להפרשה ברצף החלבון <i>GHI</i>
32	3.2.3 בחינת פרופיל השעתוק של הגן <i>GHI</i> על ידי Real Time PCR
33	3.2.4 קביעת המידור התוך תאי של החלבון <i>GHI</i>
34	3.2.5 בדיקת השפעת ביטוי ביתר של הגן <i>GHI</i>
34	3.2.5.1 בדיקת ביטוי במערכת תאי טבק BY-2
37	3.2.5.2 טרנספורמציה חולפת לפרחי פטוניה
38	3.2.5.3 טרנספורמציה חולפת לצמחי טבק המבטאים ביתר את הגן <i>PAPI</i>
40	3.3 פיתוח מערכת רגנרציה של צמח הברונפלסיה
41	4. דיון ומסקנות
41	4.1 הברונפלסיה כצמח מודל לבחינת תהליך פירוק אנטוציאנינים בצמח השלם
42	4.2 מעורבות אנזימי β גלוקוזידאז בתהליך פירוק האנטוציאנין בפרחי ברונפלסיה
44	4.3 אפיון מעורבות האנזים <i>GHI</i> בתהליך פירוק אנטוציאנין
47	4.4 סיכום, מסקנות ומחקר עתידי
49	5. רשימת ספרות
58	נספח I - המאמר: Shoot regeneration from leaf explants of <i>Brunfelsia calycina</i>

3GT	flavonoid 3-glucosyltransferase
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Ac	acetosyringone
ANS	anthocyanidin synthase
AVIs	anthocyanic vacuolar inclusions
BA	benzyladenine
bHLH	basic-helix-loop-helix
<i>B. calycina</i>	<i>Brunfelsia calycina</i>
BY-2	bright yellow 2 tobacco
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
CFP	cyan fluorescent protein
CHI	chalcone isomerase
CHS	chalcone synthase
ddH ₂ O	double distilled water
Dp	delphinidin
DFR	dihydroflavonol 4-reductase
Dglu	D gluconic acid
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	dioxide nucleotide tri phosphate
DTT	dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylene diamine tetra acetic acid
ESTs	expressed sequence tags
EtBr	ethidium bromide
F3'5'H	flavonoid 3'5'-hydroxylase
F3H	flavanone 3-hydroxylase
F3'H	flavonoid 3'-hydroxylase
FLS	flavonol synthase
GCMS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
GFP	green fluorescent protein
GH1	glycosyl hydrolase family 1

GST	glutathione S-transferase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IAA	indole-3-acetic acid
IBA	indole-3-butyric acid
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LCMS	liquid chromatography-mass spectrometry
LT	ligandin transporter
MATE	multidrug and toxic compound extrusion
MS	mass spectrometry
MS	Murashige and Skoog media
MU	4-Methylumbelliferone
MUGlc	4-Methylumbelliferyl- β -D-glucoside
Mv	malvidin
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
O.D	optical density
PCR	polymerase chain reaction
PAP 1	production of anthocyanin pigments 1
<i>P. hybrida</i>	<i>Petunia hybrida</i>
Pt	petunidin
POD	peroxidase
PPO	polyphenol oxidase
PVCs	pre-vacuolar compartments
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RNA	ribonucleic acid
RPM	revolutions per minute
TLC	thin layer chromatography
WT	wild type
TAE	Tris-HCl, acetic acid, EDTA
THC	Tetrahydroxychalcone

1. מבוא

בעולם הצומח קיים מגוון פיגמנטים אשר להם השפעה ניכרת על צבע הפרי והפרח. הצבע הינו מרכיב איכות משמעותי בתוצרת חקלאית כמו פירות, ירקות, צמחי נוי ופרחי קטיפה ועל כן ישנה חשיבות מסחרית גבוהה לצבע המוצר. בשל החשיבות הכלכלית של צבע הפרי/פרח נעשים בשנים האחרונות מחקרים רבים העוסקים בשימור, יציבות והעשרת פיגמנטים בתוצרת החקלאית לאורך זמן. אנטוציאנינים הינם הקבוצה הגדולה והמגוונת ביותר של פיגמנטים בצמחים. אנטוציאנינים הינם מטבוליטים שניוניים השייכים לקבוצת הפלבנואידים והם האחראים לפיגמנטים סגולים, אדומים וכחולים בפרחים, פירות ועלווה (Mol *et al.* 1998). לאנטוציאנינים ערך נוסף מלבד תרומתם לצבע התוצרת החקלאית. ישנה גם התעניינות רבה באנטוציאנינים בשל יכולתם לשמש כנוגדי חמצון טבעיים, הנמדדת על פי יכולתם לספוג רדיקלי חמצן. ענבים (Wang *et al.* 1996), אוכמניות, פטל ודובדבן ידועים כמכילים רמות גבוהות של אנטוציאנינים ועל כן יכולתם כנוגדי חמצון גבוהה בהשוואה לפירות וירקות אחרים (Wang *et al.* 1997). בשל חשיבותם הרבה מסלולי הביוסינטזה של אנטוציאנינים בפרחים ובפירות נחקרו ואופיינו בהרחבה (Holton and Cornish, 1995; Winkel-Shirley, 2001; Grotewold, 2006) בעוד פירוק אנטוציאנינים זכה להתייחסות מועטה ונלמד בעיקר במחקרים העוסקים במיצי פירות וביין. הבנת תהליך הפירוק בצמח השלם, תסייע למניעת דהיית צבע ותאפשר הגברת פיגמנטציה בגידולים שונים.

1.1 אנטוציאנינים בצמחים

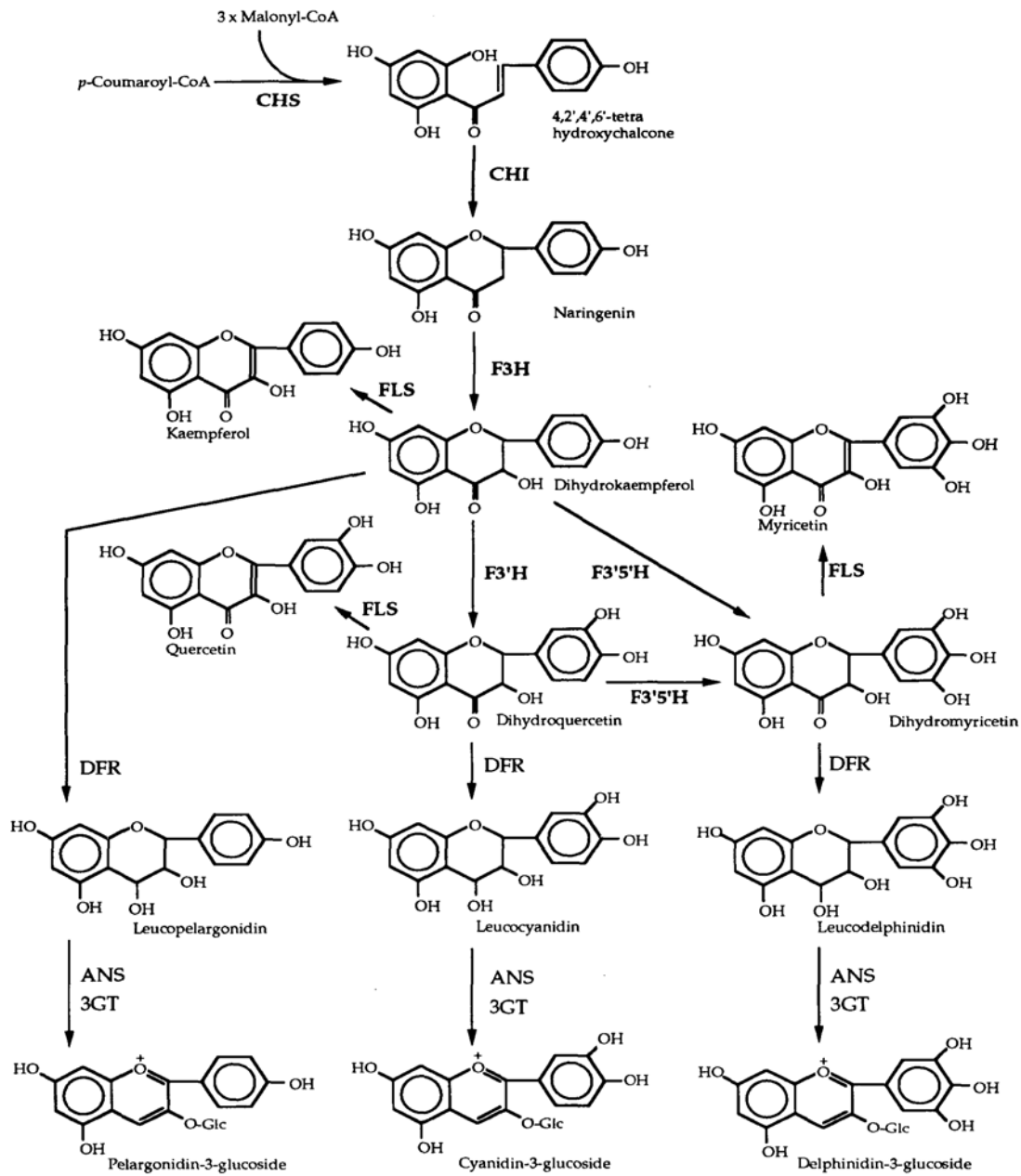
אנטוציאנינים הינן מולקולות פוליפנוליות הנמצאות במגוון רב של צמחים ומקורן הינו במסלול ה-phenylpropanoid. ניתן למצוא את האנטוציאנינים בפירות, ירקות, צמחי נוי ופרחים. האנטוציאנינים הינם פנולים מסיסים במים ומהווים חלק מקבוצה גדולה ונפוצה יותר של פלבנואידים צמחיים. מולקולות האנטוציאנין בנויות משלד של שתי טבעות ארומטיות המחוברות על ידי שלושה פחמנים (C6-C3-C6) ומשמשות כתורמות אלקטרוניים ומימנים. על בסיס שלד זה, הנקרא אנטוציאנידין, יכולות להתרחש התמרות אשר יקבעו את שיוכה של מולקולת הפיגמנט. בטבע קיימים 19 אנטוציאנידינים השונים זה מזה במספר ובמיקום קבוצות ההידרוקסיל והמתיל המתמירות את השלד הבסיסי מתוכם שישה נפוצים בעולם הצמחים: פלרגונידין, ציאנידין, פאונידין, דלפינין, פטונידין ומלבידין (Tanaka *et al.* 2008a). כל אנטוציאנידין יכול לעבור התמרה על ידי קבוצות גליקוזיל, שיירי אציל ארומטיים או אליפטיים, בעמדות שונות על המולקולה. על כן, ניתן למצוא בטבע מגוון רב של מולקולות אנטוציאנין השונות זו מזו בגוניהן וביציבותן (Goto, 1987). מולקולות אלה מצטברות בואקואלת התא ויציבותן וגוניהן מושפעים מתנאי תוך הואקואולה כגון: pH, קופיגמנטציה עם פלבנואידים נוספים ויצירת קומפלקסים עם יוני מתכות שונים (Mazza and Miniati 1993; Tanaka *et al.* 2008a). אנטוציאנינים ממוקמים בעיקר ברקמת האפידרמיס אך גם ברקמת המזופיל הספוגית בעלים, בפירות ובאיברי אגירה תת קרקעיים כדוגמת בטטה (Sugawara *et al.* 2008; Hughes *et al.* 2007). ייצורם והצטברותם של פיגמנטים אלו ממלאים בטבע תפקיד חשוב במשיכת מאביקים ומפיצי זרעים וכן בהגנה מפני קרינת UV (Holton and Cornish, 1995; Winkel-Shirley, 2001; Davies, 2004; Grotewold, 2006).

1.2 מסלול הביוסינטזה של אנטוציאנינים

מסלול הביוסינטזה של אנטוציאנינים נחקר רבות ואופיין (Winkel-Shirley, 2001; Holton and Cornish, 1995; Grotewold, 2006). תהליך הביוסינטזה מתרחש בציטוזול (Tanaka *et al.* 2008a). הוצע כי האנזימים המשתתפים בתהליך הביוסינטזה משתייכים לקומפלקס סופר-מולקולרי (מטבולון), דרך אינטראקציות בין חלבונים המעוגנים לרשתית אנדופלסמטית, דרך אנזימי ציטוכרום p450 המהווים חלק מן הקומפלקס (Grotewold, 2006; Winkel, 2004; Zhang *et al.* 2006). באיור 1 מתואר תהליך הביוסינטזה המתחיל באנזים Chalcone synthase (CHS). תפקיד CHS הוא דחיסת מולקולת 4-Comaroyl CoA שמקורה במסלול ה-Phenylpropanoids עם שלוש מולקולות Malonyl CoA שמקורן במסלול ביוסינטזת חומצות השומן ליצירת מולקולת (THC) Tetrahydrochalcone, הפלבנואיד הראשון במסלול שצבעו צהבהב. מולקולת ה-THC עוברת איזומריזציה בטבעת C על ידי האנזים Chalcone isomerase (CHI) ליצירת מולקולת Naringenin חסרת הצבע. האנזים Flavanone 3-hydroxylase (F3H) מבצע הידרוקסילציה של טבעת B ליצירת 3 מולקולות Dihydroflavonols. האנזימים הבאים ומכאן מבצעים הידרוקסילציות נוספות על טבעת B ומשפיעים וקובעים את צבעו והם Flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) ו-Flavonoid 3'5'-hydroxylase (F3'5'H). המשך המסלול משותף לכל ה-Dihydroflavonols וכולל בתוכו תהליכים של דהידרדציה ע"י Dihydroflavonol-4-reductase (DFR), אוקסידציה ע"י Anthocyanidin synthase (ANS) ולבסוף הוספת סוכרים ע"י Flavonoid-3-glucosyltransferase (3GT) ליצירת האנטוציאנין היציב. לא כל מולקולות ה-dihydroflavonols הופכים לאנטוציאנינים. חלקן, הופכות למולקולות Flavonols חסרות צבע בעזרת האנזים flavonol synthase (FLS).

בקרת הביוסינטזה של אנטוציאנינים נחקרה אף היא לעומק ונמצא שהיא נעשית על ידי פקטורי שעתוק מסוג basic-helix-loop-helix (bHLH), העוברים אינטרקציה עם פקטורי שעתוק ממשפחת ה-MYB מקבוצת R2R3 ועם חלבוני WD40 על מנת להפעיל גנים ממסלול הביוסינטזה של האנטוציאנינים (Allan *et al.* 2008; Tanaka *et al.* 2008a). במחקרים רבים נעשה שימוש בצמחים טרנסגניים בעלי רמות גבוהות של אנטוציאנינים בפרחים, עלווה או בפרי בשל מניפולציות שנעשו ברמות הביטוי של גנים המבקרים את מסלול ביוסינטזת האנטוציאנינים (Ben Zvi *et al.* 2008; Bradley *et al.* 2000; Butelli *et al.* 2008; Tanaka *et al.* 2008b).

איור 1: מסלול הביוסינטזה של הפלבונולים והאנטוציאנינים (Holton and Cornish, 1995)



1.3 שילוח האנטוציאנין לואקואולה והצטברות

אנטוציאנינים מהווים את אחת מקבוצות המטבוליטים השניוניים עבורם קיים מידע על מיקומם התוך תאי, תהליך הביוסינטזה שלהם ודרך שילוח התוצרים לאתר ההצטברות (Zhang *et al.* 2006). עם יצירתם, מועברים האנטוציאנינים מן הציטוזול אל הוואקואולה, סביבה חומצית בה אנטוציאנינים יכולים להצטבר לרמות גבוהות, ובה ניתן לראות את צבעיהם הבוהקים (Kitamura, 2006). המידור לואקואולה בעלת ה-pH החומצי חיוני למניעת חמצון האנטוציאנינים ולפעילותם כפיגמנטים (Marrs *et al.* 1995). (Verweij *et al.* 2008). במינים שונים נמצא כי קיימים מספר מסלולי שילוח של פלבנואידים לואקואולה

אשר רק חלקם משמשים לשילוח אנטוציאנינים. מסלול אפשרי ראשון שהוצע הינו מסלול ה- Ligandin Transporter (LT) (Grotewold and Davies, 2008) המבוסס על פעילות אנזימי משפחת ה-Glutathione S-transferase (GST) המוגדרים כאנזימי מטבוליזם שניוני (Dixon *et al.* 2010) ואשר חלקם נמצאו חיוניים לצורך הפרשת אנטוציאנינים אל הוואקואולה (Marrs *et al.* 1995; Alfenito *et al.* 1998; Larsen *et al.* 2003; Dixon *et al.* 2010) דרך מסלול ה- multidrug and toxic compound extrusion (MATE), מערכת טרנספורטרים הממוקמים בממברנת הטונופלסט. מאנליזת מוטנטים נמצא כי Transparent Testa12 (TT12) המשתייך למשפחת חלבוני MATE, דרוש לתהליך הצטברות פרואנטוציאנידין בואקואולות תאי קליפת הזרע בארבידופסיס (Debeaujon *et al.* 2001). מנגנון שילוח שלישי המוזכר בספרות מתרחש בתיאום עם תהליך הביוגנזה של הוואקואולה ומעורבות בו גם וזיקולות. בתרבית תאי תירס בה נעשה ביטוי ביתר של פקטורי שעתוק ממסלול ביוסינטזת האנטוציאנין נמצא כי ישנה עליה בייצור וזיקולות דמויות Anthocyanic Vacuolar Inclusions (AVIs) בעלות פלורסנציה עצמית המגיעות אל הוואקואולה (Lin *et al.* 2003; Grotewold *et al.* 1998).

הצטברות אנטוציאנינים בואקואולה יכולה להתרחש במספר אופנים ובהם: תמיסה בצבע אחיד או כחלק מגופיפים תוך ואקואולריים דמויי וזיקולות המכילים פיגמנטים (Pourcel *et al.* 2009). האחרונים נמצאו במגוון צמחים ובהם גם עלי כותרת של לזיאנטוס וציפורן ונקראו Anthocyanic Vacuolar Inclusions (AVIs) (Markham *et al.* 2000). בליזיאנטוס נמצא כי אנטוציאנינים מצטברים ב-AVIs בציטופלסמה, שם ה-AVIs עוברים מידור אל מדורים פרה-ואקואולריים (PVCs) דרכם הם מועברים אל הוואקואולה המרכזית על ידי איחוי ה-PVCs עם הוואקואולה המרכזית. מקור ה-PVCs הוא ככל הנראה ברשתית האנדופלסמטית (Zhang *et al.* 2006). AVIs שנמצאו בליזיאנטוס ובבטטה הינם חסרי ממברנה אך בשניהם נמצא כי ישנם מרכיבים חלבוניים ספציפיים המעורבים בקשירה סלקטיבית של אנטוציאנינים (Nozue *et al.* 1993; Markham *et al.* 2000). בליזיאנטוס מרכיבים חלבוניים אלו מראים ספציפיות גבוהה לקשירת אנטוציאנינים וב-pH הוואקואולרי הקשר בין החלבונים לבין האנטוציאנינים הינו יציב ואלו לוכדים אותם בואקואולה (Zhang *et al.* 2006).

1.4 פירוק אנטוציאנינים בצמח השלם

ידע מולקולרי נרחב קיים על סינטזת אנטוציאנינים, אך מעט ידוע על פירוקם ברקמות צמחיות, *in vivo*, מאחר ורוב המחקר שנעשה עד היום בנושא התרכז בתהליכי פירוק במיצי פירות, פירות מעובדים ובין. פירוק אנטוציאנינים מתרחש בעיקרו בשל תהליכים כימיים, בהשפעת גורמים חיצוניים או בשל פירוק אנזימטי על ידי מספר קבוצות אנזימים ובהן: גלוקוזידאזות (anthocyanases), פרוקסידאזות ופוליפנול-אוקסידאזות (Huang, 1955; Simpson, 1976; Jiang, 2000, Zhang *et al.* 2005). הצטברות חולפת של אנטוציאנין והיעלמותו תוך כדי התפתחות הצמח או בשל שינוי בתנאי הסביבה מצביעה על כך שפירוקו מבוקר ומשופעל כאשר הינו בעל תועלת לצמח. אובדן פיגמנטציה בשל הליכי התפתחות מתרחש

במספר צמחים בעלוה צעירה ואף ברקמות הפרי והפרח. מאחר ואנטוציאנינים קולטים אור בתחום האור הנראה ובתחום ה UV, הצטברותם בעלוה צעירה ומתפתחת יכולה לשמש להגנת העלה מפני קרינה ובעיקר על המערכת הפוטוסינטטית מפני נזקי קרינת UV ומפני נזקי photoinhibition הנגרמים בשל רמות קרינה גבוהות (Steyn *et al.* 2002). בנוסף, פיגמנטים אלו הינם בעלי פעילות אנטיאוקסידנטית המגנה על התאים מפני נזקי חמצון (Winkel-Shirley, 2002). עם התבגרות העלים ויצירת שכבת שעווה המחזירה את אור השמש ומספקת הגנה לעלה מפני קרינת השמש, צבע העלה משתנה מאדום לירוק (Close *et al.* 2003). איבוד זה של הפיגמנטציה האדומה יכול לנבוע משילוב של עליה בצבירת כלורופיל תוך כדי התרחבות וגדילת העלה, הפסקת ביוסינטזת האנטוציאנין ומיהול עקב גדילה ו/או עליה בפעילות פירוק האנטוציאנין כאשר אינו נחוץ יותר להגנת העלה. דוגמאות לצמחים בעלי עלוה צעירה מאדימה המשנה צבעה לירוק נצפו בעלי צמח הקוקופלאם (*Chrysobalanus icaco*) ובעלי צמח הפוטיניה (*Photinia fraseri cv. Red Robin*) עם התבגרותם. בשני הצמחים, ישנו פירוק של אנטוציאנינים במהלך התפתחות העלים הגורם בסופו של דבר להורקת העלוה (Nissim-Levi *et al.* 2003; Oren-Shamir *et al.* 1999). בצמחי פוטיניה, ריכוז האנטוציאנינים תלוי ישירות בגיל העלה עם ריכוזים גבוהים בעלים צעירים וירידה הדרגתית בריכוז עם התפתחות העלה (כתוצאה ממיהול ופירוק) עד ריכוז אפסי בעלוה הבוגרת (Oren-Shamir *et al.* 1999). בצמחי קוקופלאם, הירידה בריכוז האנטוציאנינים עם התבגרות העלים היא בחלקה בשל מיהול הפיגמנטים ברקמה הגדלה ובחלקה בשל פירוק אנזימטי פעיל העלים (Nissim-Levi *et al.* 2003). הצטברות חולפת של אנטוציאנינים נצפתה גם ברקמת הפרי בכמה מיני צמחים. במספר קווים של פירות פלפל (*Capsicum spp.*) ישנו תהליך של צבירת אנטוציאנינים בפרי הצעיר ופירוק המתרחש עם התפתחות הפרי (Borovsky *et al.* 2004; Chaim *et al.* 2003). גם בזמן תהליך התפתחות הפרח נראים לעתים קרובות שינויים בצבע ובגוון עלי הכותרת. שינוי הצבע משמש כסיגנל למאביקים וברוב המקרים, נובע מאינדוקציה של סינטזת אנטוציאנין. בפרחי צמח *Brunfelsia calycina*, האנטוציאנין מתפרק וגורם לפרח לשנות את צבעו מסגול כהה ללבן אחרי פתיחת הפרח (Vaknin *et al.* 2005). בפרחי פטוניה נצפה פירוק מועט בשלבי התפתחות שונים (Jonsson *et al.* 1984; Dougall and Vogelien, 1987). בצמח הפטוניה אופיין המוטנט הדוהה *fa* המאבד את צבעו במהלך התפתחות הפרח (de Vlaming *et al.* 1982; Quattrocchio *et al.* 2006) אך נמצא כי שינוי צבע זה במוטנטים מסוג *fa* אינו מתרחש בשל פירוק אנטוציאנינים, אלא בשל שינוי ה pH בואקוואולה שתוצאתו הינה שינוי גוון האנטוציאנין ואובדן הפיגמנט הנראה לעין ללא שינוי בריכוז הפיגמנט.

שינוי בתנאי הסביבה הינו גורם מרכזי לשינוי בריכוז האנטוציאנינים בצמח. טמפרטורת הסביבה, רמת האור ואיכותו משפיעים על רמות הביוסינטזה והפירוק של אנטוציאנינים. הצטברות אנטוציאנינים בעלוה מתרחשת ברמות קרינה גבוהות ובפרט קרינת UV וטמפרטורת גידול נמוכה (Chalker-Scott, 1999). לרוב, תהליך זה הינו הפיך וישנה הורקה של העלוה והגבעול עם המעבר לרמות קרינה נמוכות יותר וטמפרטורה גבוהה יותר. התלות של ריכוז האנטוציאנינים בתנאי הסביבה נצפתה גם בצמחי ארבידופסיס המבטאים ביתר את פקטור השעתוק 1 Production of Anthocyanin Pigments (*PAP1*) (Rowan *et al.* 2009). צמחי הארבידופסיס המוטנטים הינם אדומים כהים בטמפרטורה של 22°C

ועוצמת אור גבוהה ($440\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) אך העברתם לתנאי טמפרטורה גבוהה (30°C) ועוצמת אור נמוכה ($150\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) גרמה להורקה. שינוי הצבע נבע גם מבקרה שלילית על רמת הסינטזה וגם מפירוק האנטוציאנינים. מתוצאות אלו עולה כי ישנם מספר מנגנונים המעורבים בבקרה הסביבתית על האנטוציאנינים. אחד ממנגנונים אלה יכול להיות פירוק מבוקר (Rowan *et al.* 2009). גם ברקמת הפרי ישנו שינוי ברמת הפיגמנטציה בתגובה לתנאי סביבה כמו טמפרטורת הגידול ועוצמת האור. עליה בטמפרטורת הגידול גורמת לפירוק אנטוציאנינים עוד לפני הקטיפה מה שגורם לירידה משמעותית בערכו השיווקי של הפרי באגסים ובתפוחים (Huysamer 1998). פירוק אנטוציאנינים מהיר נצפה גם באגסים מהזנים 'Rosemarie' ו-'Forelle', לפני הקטיפה, כאשר הפירות כוסו בשקיות אטומות לאור (Steyn *et al.* 2004).

1.4.1 פירוק אנזימטי של אנטוציאנינים

תהליכי פירוק אנזימטי של אנטוציאנינים בצמחים נחקרו בעיקר במיצי פירות וביין אך גם במספר פירות ובראשם הליצ'י. נמצא כי שלוש קבוצות אנזימים מעורבות בתהליך: גלוקוזידאזות (anthocyanases), פרוקסידאזות ופוליפנול-אוקסידאזות (Simpson, 1976; Jiang, 2000, Zhang *et al.* 2005). במחקרים רבים אודות מנגנון הפירוק בפירות וביינות אדומים מאופיין פירוק אנזימטי של אנטוציאנינים על ידי אנזימים מחמצנים מקבוצת פוליפנול-אוקסידאז (PPO). אנזימים אלו נמצאים בפלסטידות של רקמות שהינן פוטוסינטטיות ורקמות שאינן (Steffens *et al.* 1994). בנוכחות מיצויים פנוליים מקליפת הליצ'י, אנזימי ה-PPOs (Jiang, 2000) ו- β גלוקוזידאזות (Zhang *et al.* 2001) הינם בעלי יכולת לפרק את הפיגמנטים בקליפת הליצ'י *in vitro*. הוצע כי אנטוציאנינים עוברים הידרוליזה על ידי β גלוקוזידאזות ליצירת מולקולת אנטוציאנידין (Jiang, 2000) החשופה לחמצון על ידי PPOs/פרוקסידאזות כמתואר באיור 2. תוצרי חמצון פנולים, כמו 4-Methylcatechol, הנוצרים מפעילות PPOs יכולים לזרז פירוק אנטוציאנינים דרך תגובת חמצון מצומדת (Jiang *et al.* 2004) כמתואר בחלקו השמאלי של איור 2. אנזימים מקבוצת ה- β גלוקוזידאז מורידים את השיירים הסוכריים המייצבים ממולקולת האנטוציאנין ובכך חושפים את שלד המולקולה לפעילותם של האנזימים המחמצנים (Zhang *et al.* 2001). מודל נוסף שהוצע בליצ'י לפירוק אנטוציאנינים הוא חמצון ע"י אנזים ממשפחת הפרוקסידאז (Jiang *et al.* 2004) אך נמצא כי הסרת ההתמרה הסוכרית ממולקולת האנטוציאנין, ליצירת אגליקון פנולי, מהווה שלב חשוב לפני פעילות הפרוקסידאז על מולקולת האנטוציאנין (Zapata *et al.* 1995; Zhang *et al.* 2005) ומעלה את אפיניות האנזים למולקולת האנטוציאנין. ביין נמצא כי האנזים האחראי לפירוק הוא ממשפחת β גלוקוזידאז ממקור פטרייתי אשר נמצא על גבי הענבים (Rodriguez *et al.* 2004; Manzanares *et al.* 2000). בעבודות אלו נראתה ירידה בריכוז אנטוציאנינים בנוכחות שמרים מזנים שונים במקביל לעלייה בפעילות האנזים. הגן המקודד ל- β גלוקוזידאז ממקור פטרייתי שובט בעבר (Sánchez-Torres *et al.* 1998) ופירוק האנטוציאנינים ע"י האנזים המתורגם הודגם *in vitro*. בתפוזים אדומים נמצא כי אנזים ממשפחת הגלוקוזידאזות אחראי לאיבוד הצבע בציפת הפרי בשלבי ההבשלה האחרונים (Barbagallo *et al.* 2007). בניגוד למחקרים במיצי הפירות, מחקר זה נעשה על הפרי השלם. בתפוז ריכוז האנטוציאנינים בציפת הפרי עולה תוך כדי ההבשלה ומגיע לריכוז מקסימלי בפרי הבשל. פעילות האנזים הייתה ביחס

הפוך לרמת האנטוציאנין הנמדדת, ומוצע מנגנון פירוק זהה לזה שהוצע ביין. דיווח נוסף קיים על אנזימים ממשפחת ה-β גלוקוזידאז המפרקים קשרים גלוקוזידיים ומעורבים בתהליך איבוד הצבע ביין (Huang, 1955). גם בחצילים נמצא כי אנזימים ממשפחת ה-β גלוקוזידאז שבודד מקליפת הפרי הינו בעל יכולת פירוק אנטוציאנינים (Sakamura and Obata, 1961).

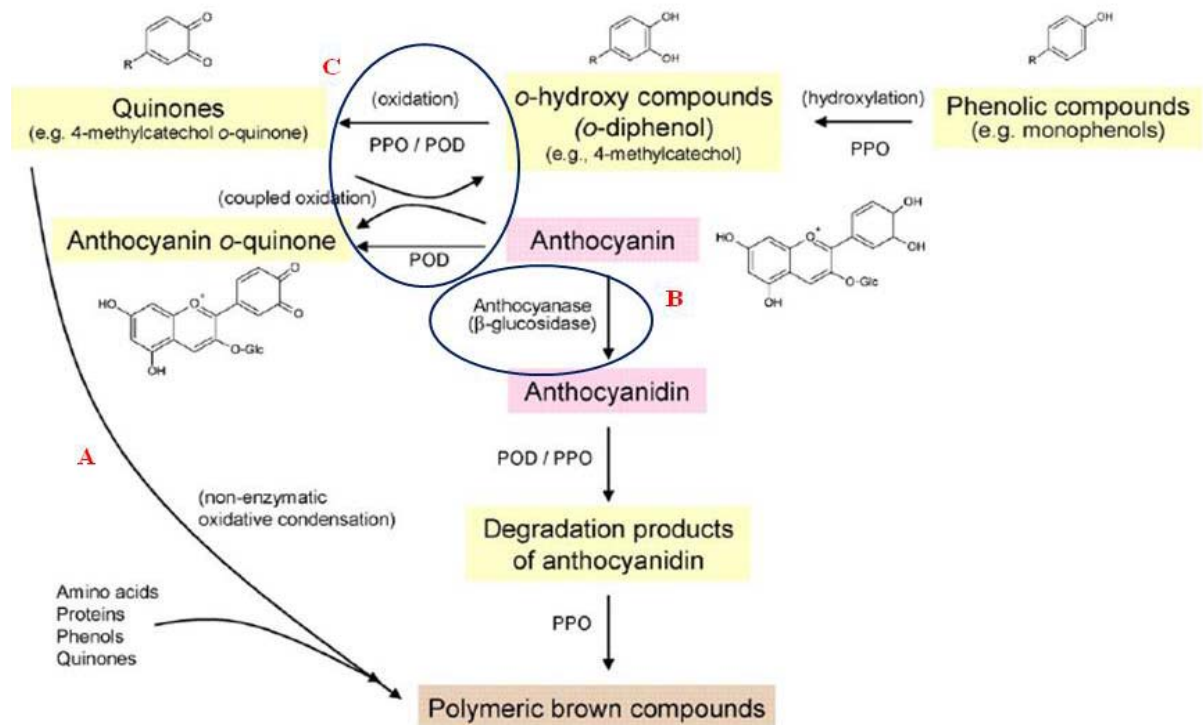
איור 2: סכמה משוערת המסכמת שלושה מנגנונים אפשריים לפירוק אנזימטי של אנטוציאנינים והשחמה במיצויי פירות (Oren-Shamir, 2009).

POD, פרוקסידאז; PPO, פוליפנול אוקסידאז. פעילות POD תלויה בנוכחות H₂O₂ בעוד שפעילות PPO תלויה בנוכחות חמצן O₂.

(A) חמצון ישיר של אנטוציאנין על ידי פרוקסידאז.

(B) פירוק דו-שלבי. הידרוליזה על ידי β גלוקוזידאז ולאחריו חמצון על ידי PPO או POD.

(C) חמצון מצומד. חמצון של אנטוציאנינים לקווינונים המתרחש במצומד לריאקציית חיזור של פנולים קווינוניים לתרכובות הפנוליות המקוריות.



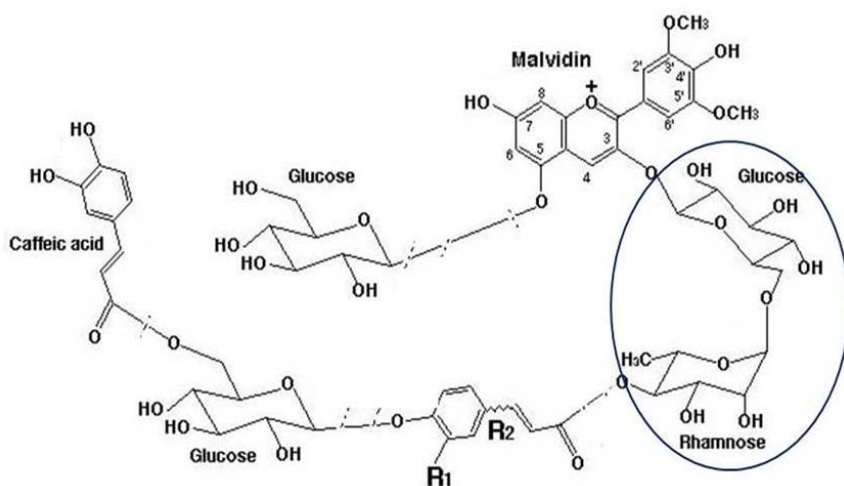
1.4.1.2 β גלוקוזידאזות מתת משפחת (GH1) Glycosyl Hydrolase Family 1

מספר רב של מטבוליטים שניוניים, אנטוציאנינים ביניהם, נאגרים בצמח בצורת β גלוקוזידים, בהם יחידת גלוקוז אחת קשורה לקבוצה הידרוקסית של מגוון אגליקונים. ה-β גלוקוזידים עוברים הידרוליזה על ידי β גלוקוזידאזות ספציפיות לשחרור האגליקונים הפעילים פיזיולוגית. במספר מקרים, כמו באנטוציאנין מסוג מלבידין (איור 3), ישנה מודיפיקציה נוספת של האגליקון על ידי מונו סכרידים כמו: גלוקוז, קסילוז, רמנוז. הגליקוזיד הדיסכרידי שנוצר עמיד לפירוק בפני גלוקוזידאזות בודדות. השערה אחת הייתה כי הפירוק נעשה בשני שלבים ועל ידי שני אנזימים. ראשית, פירוק הקשר בין שני

הגליקוזידים ולאחר מכן פירוק הקשר בין הגליקוזיד לאגליקון (Ahn *et al.* 2004). השערה נוספת היא כי תת משפחה השייכת למשפחת ה- β גלוקוזידאזות, glycosyl hydrolase family 1 (GH1), מתמחה בפירוק הקשר בין דו סוכרים לבין האגליקונים (Ahn *et al.* 2004). בצמח הסויה (*Glycine max*) נמצא כי אנזים השייך לתת המשפחה משתתף במטבוליזם של איזופלבנואידים בשורש הצמח (Suzuki *et al.* 2006). דוגמאות נוספות לאנזימים המשתייכים לתת המשפחה ומתמחים אף הם בהידרוליזה של דו סוכרים נמצאו במגוון צמחים ובהם: בעלי שיח המורן (*Viburnum furcatum* Blume) נמצא האנזים Furcatin Hydrolase (Ahn *et al.* 2004), בעלי צמח התה (*Camellia sinensis*) נמצא האנזים β -primeverosidase (Ogawa *et al.* 1997; Mizutani *et al.* 2002), בצמח הכסמת (*Fagopyrum tataricum*) נמצא האנזים Rutin (Yasuda and Nakagawa, 1994) ובענבי מוסקט אלכסנדרוני (*Vitis vinifera* cv. Muscat of Alexandria) נמצא האנזים endodiglycosidase (Gunata *et al.* 1998; Wirth *et al.* 2001).

איור 3: דוגמה לאנטוציאנין בעל שלד אנטוציאנידין מסוג מלבידין, מותמר בשיירים סוכריים ושייר של

חומצה קפאית (Ando *et al.* 1999)



מסומנת בעיגול ההתמרה על ידי מולקולת דו-סוכר, רוטינוז המורכבת מגלוקוז ורמנוז, הדומה במבנה לזו הקיימת ברוב האנטוציאנינים בפרחי הברונפליסיה (Bar-Akiva *et al.* 2010).

1.5 הברונפליסיה כצמח מודל ללימוד תהליך פירוק אנטוציאנין *in vivo*.

ברונפליסיה (*Brunfelsia calycina*) הינו שיח פורח השייך למשפחת הסולניים אשר מקורו בברזיל. בפרחי הברונפליסיה מתחיל איבוד צבע עלי הכותרת מיד לאחר פתיחתם (Vaknin *et al.* 2005; Heide, 1963). פרחי הברונפליסיה נפתחים כשצבעם סגול כהה (האנטוציאנידין העיקרי הוא מלבידין ונוספים לו פטונידין ודלפינידין) (Bar-Akiva *et al.* 2010) ובמשך חמישה ימים רמת הפיגמנט בעלי הכותרת יורדת עד הלבנה מלאה. התהליך מתרחש גם בפרחים מנותקים, בתמיסת סוכרוז מיום פתיחתם, מה שמעניק לברונפליסיה יתרון כמערכת מודל לבדיקת הפירוק. איבוד הצבע בעלה כותרת בסיום התפתחותו הוזכרה כבר בפטוניה (Jonsson *et al.* 1984), גם היא ממשפחת הסולניים, אך בברונפליסיה התהליך הוא דרמטי עד להלבנה מוחלטת והזדקנות הפרח אינה הסיבה להתרחשותו. עיכוב ההזדקנות באמצעות ציטוקינינים לא השפיע על תהליך איבוד הצבע. טיפול במעכב סינטזת חלבונים cycloheximide בימים 0 ו-1 לאחר

פתיחת עלי הכותרת גרמה לעיכוב כמעט מוחלט של איבוד הצבע, עם זאת הוספת מעכב ביום 2 לא השפיעה על התהליך. מכך ניתן להסיק שהפירוק מתבצע ע"י חלבונים המצטברים בין יום 0 ליום 2 לאחר פתיחת הפרח (Vaknin *et al.* 2005). בעקבות טיפול בחומרים מעכבי חמצון כמו DTT ו-glutathione, נראה עיכוב בפירוק הפיגמנט בפרחים מה שמרמז על מעורבות אנזימים מחמצנים בתהליך. פעילות POD נבדקה בגיל פעילות, ועלייה נראתה מיום 1 ליום 3 (שחר, 2007). הטיפול במעכב סינטזת החלבונים cycloheximide גרם לירידה משמעותית בפעילות POD, תוצאה שמסבירה את עיכוב איבוד הצבע בנוכחות מעכבי חמצון. טיפול במעכב ספציפי ל- β גלוקוזידאזות גרם לעיכוב חלקי בהעלמות הצבע מכאן ניתן להסיק שקבוצת אנזימים זו משתתפת בתהליך הפירוק בפרחי הברונפלסיה. מבנה האנטוציאנינים בפרחי הברונפלסיה נקבע באמצעות אנליזת MS ונמצא כי רובם המוחלט מותמר בדו הסוכר רוטינוז המורכב מגלוקוז ורמנוז (Bar Akiva *et al.* 2010) בדומה למתואר באיור 3. בשל אפיון מבנה האנטוציאנינים בפרחי הברונפלסיה בחרתי להתמקד בתת משפחה ספציפית ממשפחת ה- β גלוקוזידאזות המתמחה בהידרוליזה של דו סוכרים.

מטרת המחקר העיקרית:

בחינת מעורבות אנזימים ממשפחת ה- β גלוקוזידאז בתהליך פירוק אנטוציאנינים בפרחי ברונפלסיה.

המטרות הספציפיות הן:

1. בחינה מעמיקה של השפעת עיכוב פעילות β גלוקוזידאז בפרחי ברונפלסיה על תהליך פירוק הצבע.
2. בידוד גן ממשפחת ה- β גלוקוזידאז מפרחי ברונפלסיה וקביעת פרופיל הביטוי שלו בפרח בזמן פירוק הצבע.
3. בחינת פעילות הגן *GHI* שבודד מפרחי הברונפלסיה על ידי ביטוי במערכות צמחיות שונות וקביעת מעורבותו בתהליך פירוק אנטוציאנינים.
4. בחינת מיקום תוך תאי של החלבון המתורגם מן הגן שבודד על ידי יצירת חלבון מאוחה עם סמן פלורסנטי.
5. הכנת מערכות צמחיות לבחינת *in vivo* של הגנים הנבחרים והשפעתם על פירוק הצבע:
 - א. המשך פיתוח מערכת רגנרציה של ברונפלסיה.
 - ב. המשך פיתוח מערכת טרנספורמציה של ברונפלסיה.

2. שיטות וחומרים

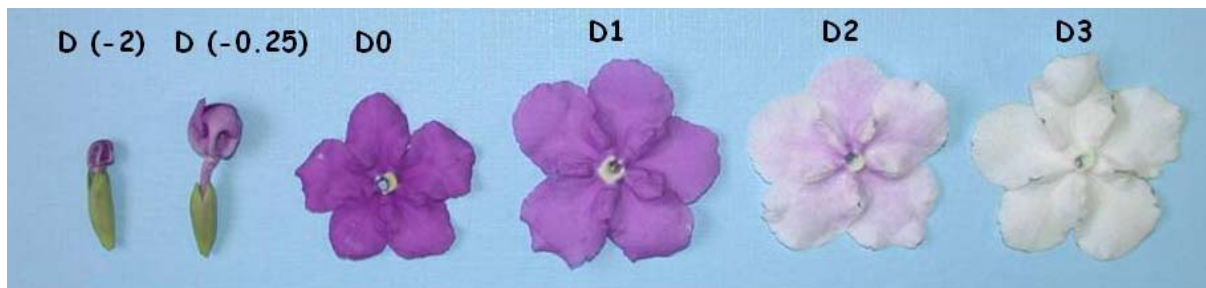
2.1 גידול צמחים, תרביות תאים ואיסוף חומר ביולוגי

2.1.1 צמחי ברונפלסיה (*Brunfelsia calycina*) גודלו בתנאי חממה מבוקרים (20°C בתנאי יום ארוך של 14 שעות אור ו- 10 שעות חושך). אינדוקציה לפריחה נעשתה בתנאי יום קצר של 10 שעות אור ו- 14 שעות חושך בתנאי טמפרטורה של $9^{\circ}\text{C}/17^{\circ}\text{C}$ (יום/לילה בהתאמה).

איסוף - פרחים נותקו מהשיח (מתחת לעלי הגביע) עם פתיחת עלי הכותרת ולפני פתיחת המאבקים, שלב אשר הוגדר כיום 0 או D0 (איור 4). בשלב זה פרחים (עלי כותרת בלבד) הוכנסו לאחסון בטמפרטורה של -80°C או הוצבו באפנדורפים המכילים תמיסת 2% סוכרוז בתוספת 40ppm TOG למשך יום, יומיים או שלושה ימים (איור 4) ואז הוקפאו.

איור 4: שלבי התפתחות של פרחי צמח הברונפלסיה

באיור פרחי ברונפלסיה בשלבי התפתחות שונים. D (-2) הינם פרחים כיומיים לפני פתיחת הפרח (פקע סגור), D (-0.25) הינם פרחים כשש שעות לפני פתיחת הפרח, D0 הינם פרחים ביום פתיחת הפרח, D1 פרחים יום לאחר פתיחת הפרח, D2 יומיים לאחר פתיחת הפרח ו- D3 פרחים כשלושה ימים לאחר פתיחת הפרח.



2.1.2 צמחי טבק (*Nicotiana tabacum*) טרנסגניים המבטאים ביתר את הגן *PAP1* (*Anthocyanin Pigment 1*) התקבלו ממעבדתו של פרופ' סשה ויינשטיין שבפקולטה לחקלאות. הצמחים גודלו בתנאי חממה מבוקרים (23°C בתנאי יום ארוך של 14 שעות אור ו- 10 שעות חושך).

2.1.3 תרבית תאי טבק (*Nicotiana tabacum*) Bright Yellow 2 (BY-2) tobacco בארלנמיירים בנפח של 100ml עבור 20ml תאים. התאים גודלו בתנאים קבועים של 28°C , בחושך, בטלטול של 70-80rpm. התאים הועברו אחת לשבוע, $400\mu\text{l}$ מהתרבית הישנה הועברו אל 20ml מצע גידול טרי.

2.2 טיפול בתמיסת D-gluconic acid (מעכב פעילות β גלוקוזידאז) בפרחים מנותקים
פרחים מנותקים עברו הגמעה וטבילה בתמיסת D-gluconic acid בריכוזים שונים. תמיסות המכילות את המעכב בריכוזים של 0.1M, 0.5M ו- 1M הוכנו על ידי המסת המעכב בתמיסת 2% סוכרוז בתוספת 40ppm TOG ובהן טופלו הפרחים החל מיום 0 או מיום 1 לאחר ניתוקם מן השיח.

2.3 מיצוי, קביעת ריכוז ואפיון אנטוציאנינים בפרחי ברונפלסיה, פרחי פטוניה ועלי טבק

הרקמה צמחית נכתשה בנוכחות חנקן נוזלי והפיגמנטים מוצו ב- 1ml של מתנול:מים:חומצה אצטית 1:5:11v/v (Markham and Ofman, 1993). קביעת ריכוז הפיגמנט נעשתה בבדיקה ספקטרוטומטרית באורך גל של 530nm במכשיר UV-2401 PC (SHIMADZU, Kyoto, Japan).

2.3.1 אפיון אנטוציאנינים באמצעות אנליזת HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

(Shimadzu, Japan). לצורך הכנת דוגמאות האנטוציאנין להרצה ב-HPLC סוננו הדוגמאות דרך 0.45µm polyvinylidene difluoride filter (Nalgene, Rochester, NY, USA). הדוגמאות הוטענו על קולונת RP-18 (Vydac 201TP54) והופרדו ב- 27°C עם התמיסות הבאות: (A) מים, pH=2.3 ו- (B) H₂O:MeCN:HOAc (107:50:40), pH=2.3.

2.4 בידוד וריצוף הגן

2.4.1 הפקת Total RNA

Total RNA הופק מפרחים מימים: 3, 2, 1, 0, -0.25, -2 על פי (Chang *et al.* 1993) בשינויים קלים: 2gr רקמת עלי כותרת נכתשה בחנקן נוזלי והועברה למבחנות צנטריפוגה (40ml). 20ml בופר מיצוי חם (65°C) שהכיל: 0.1M Tris (pH 8), 2.5mM EDTA (pH 8), 2M NaCl, 2% CTAB w/v, 0.5 µg/µl Spermidin ו- 2% mercaptoethanol v/v, 2% PVP(MW 40,000) w/v הרקמה. המבחנות עורבבו היטב והוכנסו לאמבט ב- 65°C למשך 10 דקות, אחריהן הוסף למבחנות כלורופורם/איזואמיל אלכוהול (1:24) עד צוואר המבחנה. המבחנה טולטלה וסורכזה בצנטריפוגת Sorvall (דגם RC-5B) במהירות של 10,000rpm במשך 10 דקות. הנוזל העליון נשפה והועבר למבחנה חדשה אז הוסף כלורופורם/איזואמיל אלכוהול (1:24) עד צוואר המבחנה. המבחנות טולטלו במשך 5 דקות וסורכזו במהירות של 10,000rpm במשך 10 דקות. הנוזל העליון נשפה והועבר למבחנה חדשה אז הוסף לו 1/4 נפח של 10M LiCl. המבחנות הוכנסו למשך הלילה ל-4°C. למחרת סורכזו המבחנות במשך 20 דקות במהירות של 10,000rpm. הנוזל העליון נשפך והמשקע נשמר בקרח והורחף ב- 1ml של בופר הרחפה שהכיל: 10mM Tris (pH 8), 1M NaCl, 10mM EDTA (pH 8), 10% w/v SDS. לאחר מכן, הוסף לו 1ml של כלורופורם/איזואמיל אלכוהול (1:24). הנוזל עורבב והועבר למבחנת אפנדורף של 2 מ"ל. המבחנה סורכזה במשך 5 דקות במהירות של 12,000rpm בצנטריפוגת אפנדורף שולחנית, אז נשפה הנוזל העליון והועבר למבחנת אפנדורף חדשה. לנוזל הוסף 1ml כלורופורם/איזואמיל אלכוהול (1:24), המבחנה עורבבה וסורכזה במשך 5 דקות במהירות של 12,000rpm. הנוזל העליון נשפה לתוך מבחנת אפנדורף והוסף לו אתנול (100%) ביחס של פי 2 מנפח הנוזל אשר נשפה. המבחנה הועברה לקרוור ב- 20°C למשך הלילה להשקעת ה-RNA. למחרת סורכזה המבחנה במשך 15 דקות במהירות של 14,000rpm בצנטריפוגת אפנדורף שולחנית. הנוזל העליון נשפה, הפלט יובש במשך 5 דקות והורחף ב- 20µl DDH₂O. כל התמיסות הוכנו מ-DDH₂O אשר טופלו ב-DEPC. כל החומרים סופקו ע"י סיגמה.

לאחר ההפקה טופל ה-RNA באמצעות ערכת RNase-Free DNase Set (Qiagen Inc, CA, USA) לפי הוראות היצרן על מנת לפרק שאריות DNA.

2.4.2 הפקת mRNA מ-Total RNA

0.5mg של total RNA עברו תהליך של הפרדת ה-mRNA, בעזרת הקיט Poly AT tract system IV (Promega, Ca, USA) ועל פי הוראות היצרן.

2.4.3 הכנת cDNA

cDNA הוכן למטרות של הגברת PCR, ריאקציות Real-Time PCR ושיבוט באמצעות האנזים RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas, Burlington, Canada) על פי הוראות היצרן.

2.4.4 תכנון תחלים ל-PCR (Polymerase Chain Reaction)

פיתוח תחלים למטרות ריצוף והגברה ב-PCR נעשה באמצעות תוכנת DNAMAN גירסה 4.1 (Lynnon Biosoft, Quebec, Canada). התחלים נרכשו מחברת סינתזה ביוסינס בע"מ, ירושלים, ישראל.

2.4.5 ריאקציות ה-PCR וניקוי התוצרים מג'ל אגרוז

ריאקציות ה-PCR נעשו על cDNA שמקורו ב-mRNA מפרחים ביום 0. ריאקציות ה-PCR, בנפח של 50µl, הכילו כ-10ng cDNA, 25mM TAPS (pH 9.3 ב-25°C), 50mM KCl, 10mM dNTPs (Nucleotide Tri Phosphate dioxide), 10pmoles מכל אחד מהתחלים ויחידה אחת של DNA Polymerase, SuperNova Taq Polymerase (מדי בע"מ, ראשון לציון, ישראל). במבחנת ביקורת הושמו המרכיבים הנ"ל ללא cDNA. הריאקציות בוצעו באמצעות מכשיר Mastercycler personal PCR (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). תהליך ההגברה נעשה במחזורים הבאים: **שלב 1**: 94°C במשך 3 דקות; **שלב 2**: 94°C במשך 30 שניות; **שלב 3**: 55-60°C במשך 30 שניות; **שלב 4**: 72°C במשך 30-60 שניות (הזמן תלוי בגודל תוצר ה-PCR); **שלב 5**: חזרה על שלבים 2-4, 34 פעמים; **שלב 6**: 72°C במשך 5 דקות; **שלב 7**: קירור תמיסת הריאקציה ב 4°C.

התחלים ששימשו לריאקציות ה-PCR מוצגים בטבלה 1.

תוצרי ריאקציות ה-PCR הורצו על גבי ג'ל אגרוז 1% וזוהו על ידי צביעה ב-EtBr (Ethidium Bromide) מתוצרת (Amerso, Solon, Ohio, USA) כמפורט בסעיף 2.4.5.1.

טבלה 1. התחלים ששימשו לבידוד הגן *Glycosyl Hydrolase Family 1* (GH1) מצמח הברונפלסיה.

GH Sense	5' - CACTCGTGAAAGGTTCTACG -3'
GH Antisense	5' - GCCCATTCCCAGTTATCCATC -3'
GH2 Degenerate Sense	5' - ATNGGNATGGAYGCNTAYAG -3'
GH2 Sense	5' - ATGGGGATGGATGCGTACAG -3'

על מנת לבדוד ולרצף את כל רצף הגן *GHI* מצמח הברונפלסיה ראשית תוכננו תחלים התואמים את רצף הגן *GHI* מתפוח אדמה הרצף הושווה לנתוני ESTs שונים ממשפחת הסולניים ותחלים תוכננו מאיזורים שמורים. ראשית בודד רצף של 456bp שעל פיו נעשה המשך הריצוף. בהמשך תוכנן תחל דגנרטיבי באוריינטיבית Sense לפי הומולוגיה שנמצאה לגן *GHI* מצמח הארבידופסיס (*Arabidopsis thaliana*). תוצר ריאקציה זו היה מקטע בן 1126bp.

על מנת לרצף את קצה 5' ואת קצה 3' של הגן *GHI* נעשתה ריאקציית RACE (rapid amplification of cDNA ends) באמצעות Cap Fishing Full-length cDNA Premix Kit (Seegene Inc, Seoul, Korea).

2.4.5.1 הכנת ג'ל אגרוז

להכנת ג'ל אגרוז בריכוז 1% הומסו 1.5gr אגרוז (Amerso, Solon, Ohio, USA) ב-150ml תמיסת TAE (Tris-HCl, acetic acid, EDTA), הוסף 1µl של EtBr בריכוז של 1mg/ml ועורבבו. תערובת זו נמזגה לתבנית להרצת ג'ל לקרישה. תוצרי ה-PCR הורצו על גבי הג'ל במכשיר אלקטרו פורזה (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) במשך 30-40 דקות במתח של 120V, 400mA.

2.4.5.2 הפקת DNA מג'ל אגרוז

הפקת DNA מג'ל אגרוז נעשתה באמצעות GelElute Extraction Kit (5 prime, Gaithersburg, Maryland USA) על פי הוראות היצרן.

2.4.6 שיבוט לוקטור pGEM-T easy לסריקת תוצרי PCR

מקטעי הגנים שהופקו עברו ליגציה לפלסמיד pGEM-T easy (Promega, Ca, USA) בעל עמידות לאמפיצילין על פי הוראות היצרן. תוצרי הליגציה עברו טרנספורמציה לחיידקי E.coli אלקטרו קומפטנטים. החיידקים נזרעו על צלחות LB עם אמפיצילין בריכוז 100µg/ml, IPTG 0.2mM ו-40µg/ml X-Gal. החיידקים הודגרו למשך הלילה ב 37°C ונבחרו קלונים שיצרו מושבות לבנות. קלונים אלו רובו ב-5ml מצע LB נוזלי בתוספת אמפיצילין בריכוז 100µg/ml, מהם הופק DNA שנשלח לריצוף.

2.4.7 הפקת DNA פלסמידי מחיידקים

הפקה של DNA פלסמידי נקי, נעשתה באמצעות FastPlasmid™ Mini Kit (5 prime, Gaithersburg, Maryland USA) על פי הוראות היצרן.

2.4.8 קביעת רצף

קביעת רצפי DNA נעשתה על בסיס שיטת Sanger במעבדת השירות של מכון ויצמן. התחלים לקביעת רצפים היו SP6 ו-T7. פירוט רצפי התחלים מופיע בטבלה 2.

טבלה 2. התחלים ששימשו לשם לקביעת רצפי ה-DNA המשובטים :

T7 5' - TAATACGACTCACTATAGGG -3'

SP6 5' - TTAGGTGACACTATAGAATAC -3'

2.5 ריבוי תוצרי ה-PCR

נעשה בעזרת טרנספורמציה באלקטרופורציה לחיידקים אלקטרו קומפטנטים. הטרנספורמציה נעשתה לפי (Dower 1990). לכמות של 50µl חיידקים קומפטנטים שהופשרו בקרח הוספו DNA 10-50ng בנפח של 1-2 µl. התרחיף עורבב והועבר לקיווטות אלקטרופורציה (Bio-Rad) 0.1mm בקרח. האלקטרופורציה התבצעה במכשיר אלקטרופורציה (Bio-Rad), במתח חשמלי של 1800V עבור E. coli ו-1700V עבור *A. tumefaciens*. לכל מנת חיידקים הוסף 1ml מצע LB והם הועברו לטלטול במשך שעה ב-37°C (E.coli) או ב-28°C (*A. tumefaciens*). לאחר מכן נזרעו החיידקים על צלחות אשר הכילו מצע מזון ואנטיביוטיקה מתאימים וגודלו למשך לילה עד שניים בטמפרטורה המתאימה.

2.5.1 הכנת חיידקים אלקטרו קומפטנטים

הכנת חיידקים קומפטנטים נעשתה לפי (Dower 1990). חיידקי E.coli מזן E-cloni או חיידקי אגרובקטריום מזן EHA105 נזרעו ב-10ml מצע LB נוזלי וטולטלו למשך הלילה, בטמפרטורה של 37°C (E.coli) או 28°C לאגרובקטריום. למחרת נמהלה התרבית לתוך 200ml מצע LB טרי ביחס של 1:100. התרבית שהודגרה ב-37°C תוך טלטול עד לקבלת O.D.₆₀₀=0.5-1.0, קוררה על קרח למשך 30 דקות ואז סורכה ב-3,500g למשך 15 דקות ב-4°C. משקע החיידקים הורחף בנפח שווה של ddH₂O מקוררים, הושקע שוב והורחף במחצית הנפח של 10% גליצרול סטרילי קר. החיידקים הושקעו והמשקע שהתקבל הורחף ב-10ml של 10% גליצרול סטרילי קר. לאחר השקעה נוספת, הורחף המשקע ב-1.5ml של 10% גליצרול קר וחולק למנות של 50µl שהוקפאו מיידית ב-80°C.

2.6 ריאקציות Real-Time PCR

Total RNA הופק מפרחים מימים: 2, 3, 1, 0, -0.25, -2, כמתואר בסעיף 4.1 ושימש ליצירת cDNA כמתואר בסעיף 4.3. ריאקציות ה-Real-Time PCR נעשו באמצעות DyNAmo™ Flash SYBR® Green qPCR Kit (Finnzymes, Espoo, Finland). תהליך ההגברה ב-Real-Time PCR נעשה במחזוריים הבאים: **שלב 1:** 95°C במשך 7 דקות; **שלב 2:** 95°C במשך 15 שניות; **שלב 3:** 61°C במשך 30 שניות; **שלב 4:** 72°C חזרה על שלבים 2-3, 39 פעמים. גן הייחוס היה הגן הריבוזומלי 18S והתחלים שתוכננו לו ולגן הנבחן מוצגים בטבלה 3. האנליזה נעשתה באמצעות Sequence Detection System GeneAmp 5600 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) והתוצאות עובדו בעזרת תוכנת 5600 GeneAmp SDS (Applied Biosystems). ערך ה-CT מייצג את מספר מחזורי ההגברה שנדרש לקבלת כמות תוצרים שנקבעה מראש כרמת סף. רמת הסף (Threshold) נקבעה כך שעקומות הפלורסנציה של הגן הנבדק ושל גן הביקורת היו בשלב

הליניארי של ההגברה, וערכה קבועה לכל הראקציות. ערך ΔCT שווה להפרש בין ערך CT של הדוגמא בהגברה עם תחלים ספציפיים לגן ובין ערך CT של הדוגמא בהגברה עם תחלים לגן הייחוס 18S.

טבלה 3. התחלים ששימשו ל- Real-Time PCR

GHRT Sense	5' - GTATGGGAACCCTCTGATCATTATC -3'
GHRT Antisense	5' - GATCCTTTTTGTATCCCTTGAGAAGC -3'
18S Sense	5' - GCGACGCATCATTCAAATTC -3'
18S Antisense	5' - TCCGGAATCGAACCCCTAATTC -3'

2.7 בניית קונסטרוקט לביטוי ביתר של הגן *GHI* שבודד מצמח הברונופלסיה

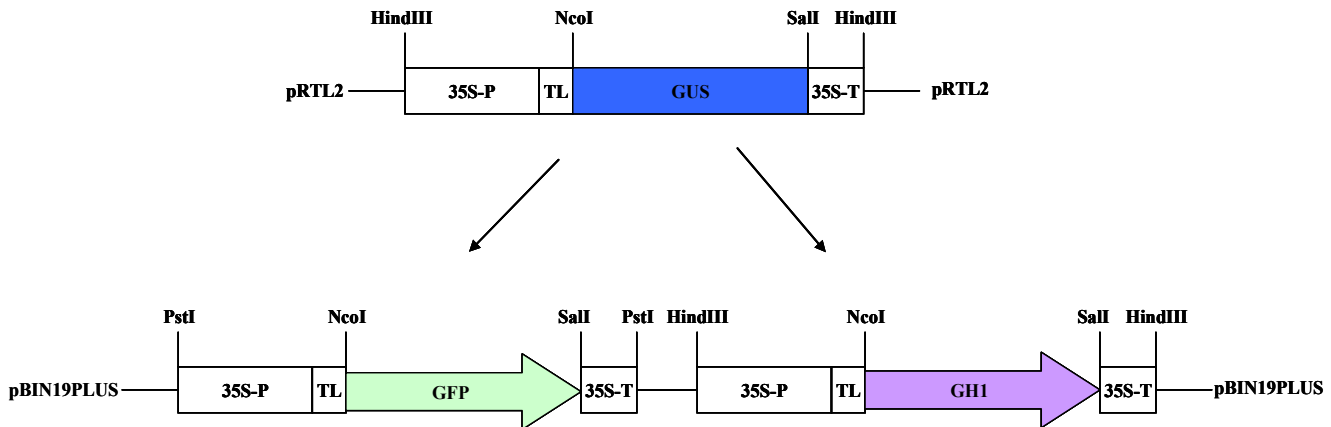
הקונסטרוקט לביטוי ביתר נבנה על בסיס הפלסמיד pBIN19PLUS והכנתו מתוארת סכמטית בהמשך. הגן *GHI* ששובט לפלסמיד הוגבר על ידי PCR באמצעות אנזים Pyrobest (Takara), בעל פעילות proof reding, תוך שימוש בתחלים הבאים הכוללים את אתרי הרסטריקציה NcoI ו-SalI לצורך שיבוט (sub cloning) לפלסמיד המעבר pRTL2.

טבלה 4: התחלים ששימשו לבידוד הגן *GHI* ושיבוטו לפלסמיד pBIN.

GH1 for NcoI Sense	5' - GTCCATGGCTATGTTGCCTAAAAGAGGCATTGC-3'
GH1 rev SalI Antisense	5' - CGAGTCGACATTTCTGTAGCACCTACCTCAATC-3'

תוצר ריאקציית ה-PCR (לאחר השקעה אתנולית) והפלסמיד נחתכו על ידי האנזימים NcoI ו-SalI (Fermentas, Burlington, Canada). תוצרי ריאקציית החיתוך הורצו בגיל אגרוז על מנת לבדוד את המקטעים המתאימים. הפקה מהגיל נעשתה כמתואר בסעיף 4.5.2. תוצר ה-PCR שנוקה מהגיל שובט לוקטור pGem-T easy ונשלח לריצוף לפני השיבוט לפלסמיד pRTL2 ולפלסמיד הבינארי pBIN. לאחר השיבוט לפלסמיד pRTL2 נחתך ממנו המקטע שבין שני אתרי HindIII המכיל פרומוטר CAMV 35S (35S-P), TEV translation enhancer (TL) ו-CAMV 35S transcription terminator (35S-T) כמתואר באיור 5 ושובט לאתר HindIII שבפלסמיד pBIN. בצורה דומה הוכן מקטע המכיל את הגן המדווח GFP גם הוא תחת בקרת פרומוטר 35S. מקטע זה נחתך מהפלסמיד pRTL2 באתרי ה-PstI (כמתואר באיור 5) ושובט לאתר PstI שבפלסמיד pBIN. הגן *GHI* עבר מוטגנזה נקודתית בבסיס 1176 (מספור מקודון התחל) על מנת לבטל אתר חיתוך של האנזים HindIII.

איור 5: תיאור סכמטי של תהליך בניית הקונסטרוקט pBIN-GFP-GH1



2.8 טרנספורמציה לצמחי טבק ולפרחי פטוניה

2.8.1 טרנספורמציה חולפת באמצעות אינפילטרציה (הזרקה)

פלסמיד בינארי המכיל את רצף הגן *GHI* ואת רצף הגן המדווח *GFP* שנבנה על בסיס pBIN19PLUS כמתואר בסעיף 7 שימש לטרנספורמציה בחיידקי *A. tumefaciens* מזן EHA105. החיידקים נזרעו על צלחות LB עם קנמיצין בריכוז 50 µg/ml וריפאמפיצין בריכוז 25 µg/ml וגודלו למשך 2 לילות, בחושך, ב-28°C. מספר מושבות שימשו להדבקת 50ml מצע LB נוזלי עם קנמיצין בריכוז 50 µg/ml ו-100 µM (100 µM) Acetosyringone (Ac) אשר הודגר למשך לילה בטילטול, בחושך, ב-28°C. למחרת סורכזה התרבית ב-5,000rpm למשך 10 דקות ב-25°C. משקע החיידקים הורחף ל- O.D.₆₀₀=0.4 לטרנספורמציה לטבק ול- O.D.₆₀₀=1 לטרנספורמציה לפרחי הפטוניה במצע MS נוזלי. לאחר טלטול של כשעתיים בטמפרטורת החדר, ב-200rpm בוצעה ההזרקה. ההזרקה לעלי טבק ולפרחי פטוניה נעשתה בעודם מחוברים לצמח. 48-72 שעות לאחר ההזרקה נבדק ביטוי החלבון הפלורסנטי GFP כאינדיקציה ליעילות ההדבקה. חתיכות עלים/עלי כותרת בהם נראה ביטוי GFP נשקלו והוקפאו לצורך הפקת אנטוציאנינים. מיצוי אנטוציאנינים והפרדתם באמצעות HPLC נעשו כמתואר בסעיף 3.

2.8.2 טרנספורמציה קבועה לתאי טבק (*Nicotiana tabacum*) Bright Yellow 2 (BY-2) tobacco

פלסמיד בינארי המכיל את רצף הגן *GHI* ואת רצף הגן המדווח *GFP* שנבנה על בסיס pBIN19PLUS כמתואר בסעיף 7 שימש לטרנספורמציה בחיידקי *A. tumefaciens* מזן EHA105. גידול החיידקים נעשה כמתואר בתת סעיף 2.8.1. משקע החיידקים הורחף ל- OD=1 במצע: 10mM + 500 µg/ml Ac+BY2. בוצעה הדגרה משותפת של תאי MgSO₄. לאחר טלטול של כשעתיים, בטמפרטורת החדר ב-200rpm, בוצעה הדגרה משותפת של תאי BY-2 בני 6 ימים ושל החיידקים למשך 48-72 שעות, על צלחת המכילה 500 µg/ml Ac+BY2+agar בטמפרטורה של 25°C, בחושך. בשלב זה בוצעו שטיפות חוזרות של התאים והרחפה במצע המכיל את האנטיביוטיקות קנמיצין בריכוז 50 µg/ml וקלפורן בריכוז 250 µg/ml כל יומיים. שטיפות אלו בוצעו במשך שבוע עד 10 ימים עד ליצירת גושים קטנים, הם התאים המותמרים. גושים אלו הועברו לגידול

בתרבית נוזלית כמתואר בסעיף 2.1.3 בתוספת האנטיביוטיקות המתאימות להמשך הסלקציה. לאחר התייצבות התרבית נבדק ביטוי החלבון הפלורסנטי GFP כאינדיקציה ליעילות ההדבקה.

2.9 בדיקת מיקום תוך תאי של החלבון Glycosyl Hydrolase Family 1

2.9.1 בניית קונסטרוקט לבדיקת מיקום תוך תאי של החלבון GH1

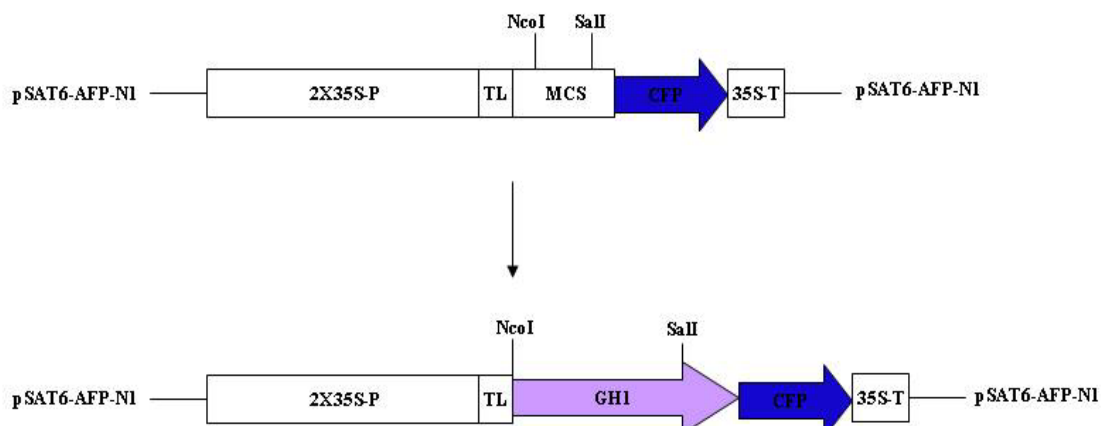
לצורך קביעת המיקום התוך תאי של החלבון נעשה איחוי של רצף הגן *GHI* לרצף הגן המדווח CFP על בסיס הפלסמיד pSAT6-AFP-N1 (Tzfira *et al.* 2005) כמתואר באיור 6. איחוי הגן המדווח נעשה בקצה הקרבוקסילי של רצף הגן GH1 על מנת שלא לשבש את סיגנל ההפרשה שנמצא בקצה האמיני של הרצף.

השיבוט נעשה על ידי שימוש בתחלים הבאים הכוללים את אתרי הרסטרקציה NcoI ו SalI (טבלה 5) כאשר מרצף תחל ה-Antisense הוסר ה-Stop codon על מנת לאפשר את ביטוי החלבון המאוחד. כמו כן תוכננו התחלים תוך שמירה על מסגרת הקריאה על מנת שלא לגרום לשיבוש בתרגום החלבון. לצורך בדיקת המיקום התוך תאי של החלבון נעשתה טרנספורמציה חולפת לפרוטופלסטים של תאי מזופיל מצמח הטבק כמפורט בסעיף 9.2.

טבלה 5: התחלים ששימשו לבידוד הגן GH1 ושיבוטו לפלסמיד pSAT.

GH1 for NcoI Sense 5' – GTCCATGGCTATGTTGCCTAAAAGAGGCATTGC -3'
 GH1 rev - SalI no stop 5' - CGAGTCGACGAGCAGAGCCTAAGAAATTCTTGAAC -3'
 Antisense

איור 6: תיאור סכמטי של תהליך בניית הקונטרקט pSAT-CFP-GH1



2.9.2 טרנספורמציה חולפת לפרוטופלסטים מתאי מזופיל שלצמחי טבק

תאי מזופיל בודדו מצמחי טבק (*Nicotiana tabacum cv Samsun NN*) שגודלו בתנאים סטריליים (Draper *et al.* 1988). אלקטרופורציה של $2.5-5 \times 10^5$ פרוטופלסטים עם הקונטרקט נעשתה במצע אלקטרופורציה מקורר (Fromm *et al.* 1985) תוך שימוש ב- DNA פלסמידי, 1-5 μg של calf thymus ו- 0.5ml של תמיסת אלקטרופורציה.

לשם קביעת המיקום התוך תאי נעשה שימוש בקונסטרקט נוסף המבוסס על רצף הפלסמיד pBIN המכיל את רצף הגן המקדד לחלבון γ -TIP, הממודר לממברנת הטונופלסט, מאוחה לרצף הגן המדווח *Cherry* (Nelson *et al.* 2007). אחרי האלקטרופורציה הועברו הפרוטופלסטים למצע גידול בתנאי חושך ובטמפרטורה של 27°C למשך 24 שעות לפני אנליזה במיקרוסקופ קונפוקלי. תהליך זה נעשה בעזרתה של גבי אנאיט מט ממעבדתו של ד"ר דוד גדעוני.

2.10 מיקרוסקופיה קונפוקלית

כל התצפיות המיקרוסקופיות נעשו על ידי שימוש במיקרוסקופ קונפוקלי סורק מסוג Olympus IX 81 NA PlanApo X1.060 ו- argon-ion, בקרן לייזר (Japan) Fluoview 500 inverted laser water immersion objective. עירור החלבון הפלורסנטי CFP נעשה באורך גל של 458nm והפליטה נקלטה דרך פילטר BA 480-495. עירור החלבון הפלורסנטי *Cherry* נעשה באורך גל של 543nm והפליטה נקלטה דרך פילטר BA 560-600. הצבעים המייצגים בתמונות הינם ירוק עבור GFP, כחול עבור CFP ואדום עבור *Cherry*. עבודת המיקרוסקופיה נעשתה בעזרתו של מר אדוארד בלאוסוב.

2.11 אפיון תוצרי פעילות אנזימטית של האנזים Glycosyl Hydrolase Family 1

מיצוי הפלבנואידיים ואפיון תוצרי פעילות האנזים נעשו לפי *Lewinsohn et al.* (1986).

1. בדיקת פעילות האנזים Glycosyl Hydrolase Family 1:

20ml תרבית תאי BY-2 גודלה במשך 5 ימים עד $OD_{600} \sim 4.0$ (הקיום הטרנסגניים הכילו את הפלסמיד pBin ועליו הגן Glycosyl Hydrolase Family 1 המתואר בסעיף 7 וכביקורת שימש קו תאי Wild-*Type*).

פעילות האנזים נבדקה *In-Vivo* על ידי הוספת פלבנואידיים שונים לתרבית התאים (מומסים ב DMSO) בריכוז סופי של 0.1mM. התרבית הודגרה ב 28°C בטלטול למשך 60 שעות, בחושך. נבדקו הפלבנואידיים: Naringin, Prunin, Naringenin. הסובסטרט UDP-Rhamnose קיים בתאים צמחיים באופן טבעי. הביקורות היו תרבית טרנספורמנטים ללא הוספת פלבנואיד ותרבית תאי BY-2 לא טרנספורמנטים (WT). פלבנואידיים שנבדקו היו מתוצרת Sigma (USA), Indofine (USA).

2. מיצוי הפלבנואידיים:

תרבית התאים (תאים+מצע) הורתחו במשך 15 דקות בארלנמייר הגידול וקוררו לטמפרטורת החדר. לכל ארלנמייר הוסף נפח שווה לנפח התרבית (20ml) של Ethylacetate או water saturated n-Butanol. התרחיף עורבב היטב והפאזה האורגנית הועברה למבחנת צנטריפוגה של 50ml. הדוגמאות סורכזו ב 4°C, 10,000g למשך 15 דקות והפאזה העליונה נאספה ויובשה תחת אוויר חם במנדף.

3. בחינת התוצרים על ידי Thin Layer Chromatography:

המשקע היבש של מיצוי התאים הורחף ב 300/500 μ l מתנול. סומנה חזית הרצה על פלטת Silica Gel 60 מתוצרת Merck (Germany) והוטען 1 μ l מכל דוגמה ומסטנדרטים של אגליקונים (Naringenin)

וגליקוזיידים (Naringin, Prunin). המתנול נודף בטמפרטורת החדר והדוגמאות הוטענו עוד 4 פעמים עד 5µl לנקודה. הפלטה הוכנסה במאונך למיכל הרצה ובו אווירה רוויה וגובה נוזל של 5mm של תמיסת System 3 שהרכבה: (1:1:1:1 v/v) n-Butanol, Methanol, Ethylacetate, Dichloromethane. לאחר כשעה, חזית הנוזל נעצרה והפלטה הוצאה ויובשה. הפלטה רוססה בתמיסת אתנול עם 1% AlCl₃ ויובשה במנדף. מרחק הריצה היחסי של הפלבנואידים השונים ממיצוי התאים נבחן תחת מנורת UV יחסי למרחק ריצת הסטנדרטים. הפלטות תועדו על ידי צילום במצלמה דיגיטלית Nikon 990 עם תאורת UV 365nm ומסנן צהוב.

2.12 מיצוי וקביעת ריכוז חלבונים מפרחי ברונפלסיה

מיצוי החלבון נעשה לפי Esen and Blanchard 2000, בשינויים קלים: 1gr רקמת עלי כותרת נכתש בחנקן נוזלי. בופר מיצוי 6 pH Na acetate 10mM, הוסף לפני הפשרת הרקמה. לאחר הפשרה, הנוזל נאסף למבחנה וסורכו בצנטריפוגת Sorvall (דגם RC-5B) מקוררת ל-4°C במשך 18 דקות במהירות של 17,000g. הנוזל העליון נשפה למבחנה ונשמר בקרח. הניסויים נערכו על המיצויים מיד לאחר הפקתם. קביעה כמותית של ריכוז החלבון נעשתה ע"י קיט "protein assay" של חברת Bio-Rad המבוסס על שיטת Bradford.

2.13 מדידת פעילות β גלוקוזידאזות (מודיפיקציה ל- van Tilbeurgh et al. 1988)

המדידה מתבססת על פירוק הסובסטרט 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucoside (MUGlc) ושחרור האגליקון הפלורסנטי 4-Methylumbelliferone (MU) על ידי β גלוקוזידאזות. לכל ריאקציה נלקחו 500µg חלבון שהופק מפרחי ברונפלסיה (כמפורט בסעיף 2.12) בשלבי התפתחות שונים מומס ב- 150µl בופר 50mM Sodium Phosphat pH7 ו- 150µl של 4mM MUGlc מומס אף הוא באותו בופר. הריאקציה התבצעה בטמפ' של 37°C והופסקה בזמנים שונים על ידי הוספה של 950µl 0.2M Sodium Carbonate (stop buffer) לכל ריאקציה. המדידה שנעשתה היא של הפלורסנציה המתקבל באורך גל של 534nm (אורך גל מעורר 345nm). כבלנק שימשה תמיסת ה- 0.2M Sodium Carbonate (stop buffer). כמות האגליקון שהשתחרר חושבה על פי עקומת כיוול של MU(Sigma). הפעילות בוטאה על פי כמות התוצר שהשתחררה לפי MU(Sigma) 4-Methylumbelliferone conc. (nmol).

3. תוצאות

עבודתי התמקדה באיתור גנים המעורבים בתהליך פירוק אנזימטי של אנטוציאנינים בפרחי צמח הברונפלסיה תוך התמקדות במשפחת ה- β גלוקוזידאזות. העבודה כללה בחינת השפעת עיכוב פעילות β גלוקוזידאזות על תהליך הפירוק ומעקב אחר פעילות β גלוקוזידאזות במהלך התפתחות הפרח. כמו כן, בודד ורוצף גן מתת משפחה ספציפית במשפחת ה- β גלוקוזידאזות, Glycosyl Hydrolase Family 1 (GH1), מפרחי הברונפלסיה. פרופיל השעתוק של הגן *GHI* נבחן באמצעות Real-Time PCR והשפעת ביטוי ביתר שלו נבחנה במספר מערכות מודל צמחיות. על מנת לחזק את ההשערה כי GH1 מעורב בתהליך הפירוק נבדק המידור התוך תאי של החלבון על ידי איחוי לגן מדווח פלורסנטי. איתור גנים נוספים המעורבים בתהליך הפירוק נעשה על ידי בניית ספריית הפחתה של cDNA שהופק מפקעים בשלב של שעות ספורות לפני פתיחת הפרח (D -0.25) לעומת cDNA שהופק מפרחים בסוף תהליך הפירוק (D3). על מנת לאפשר בדיקת פעילות *in vivo* של הגנים שאותרו בצמח הברונפלסיה עצמו המשכתי בעבודת פיתוח מערכות רגנרציה (שחר, 2007) וטרנספורמציה לצמח הברונפלסיה (Nissim-Levi *et al.* 2010).

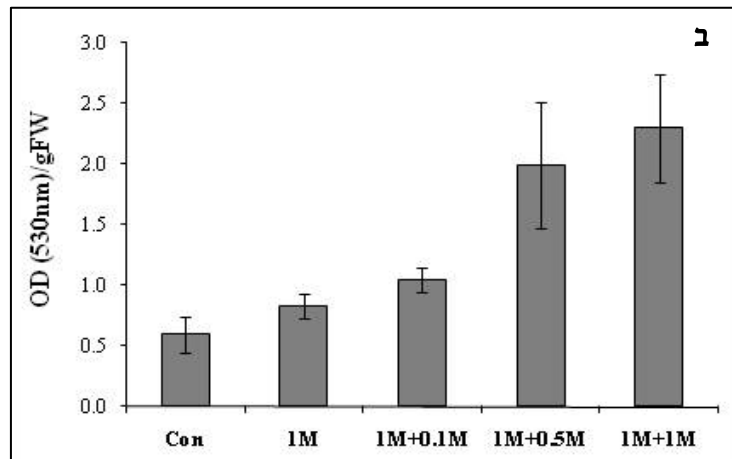
3.1 מעורבות גנים ממשפחת ה- β גלוקוזידאז בפרוק אנטוציאנינים

מסקירת הספרות בנוגע לתהליך הפירוק האנזימטי של אנטוציאנינים בפרק המבוא (איור 2) עולה כי המודל למעורבות אנזימי משפחת β גלוקוזידאז בתהליך הפירוק הינו ניתוק הסוכרים המותמרים ממולקולת האנטוציאנין ובעקבותיו פירוק ספונטני של האנטוציאנידין החשוף למולקולת תוצר חסרת צבע (Huang, 1955). עבודה ראשונית בנושא שנעשתה על פרחי צמח הברונפלסיה העלתה כי עיכוב פעילות β גלוקוזידאזות על ידי טיפול במעכב ספציפי הביאה לעיכוב תהליך פירוק האנטוציאנין בפרחים מנותקים. ממצא זה מרמז על מעורבות אנזימים ממשפחת ה- β גלוקוזידאזות בפירוק אנטוציאנין בפרחי הברונפלסיה.

3.1.1 בחינת השפעת עיכוב פעילות β גלוקוזידאזות בפרחי ברונפלסיה על תהליך פירוק הצבע

עיכוב פעילות β גלוקוזידאז נעשה על ידי הגמעת פרחים מנותקים בתמיסת D gluconic acid, מעכב תחרותי של פעילות β גלוקוזידאזות (Babcock and Esen, 1994; Geerlings *et al.* 2000; Jabeen *et al.* 2006), החל מיום 0. הטיפול במעכב הפעילות גרם לעיכוב פירוק הצבע. כאשר בנוסף להגמעה טופלו הפרחים גם בטבילה בריכוז עולה של המעכב (איור 7) נראתה עליה משמעותית בעיכוב הפירוק. מתוצאות הניסוי עלה כי העיכוב על ידי D gluconic acid הינו חולף מאחר ותהליך פירוק הצבע התחדש בקצב דומה לפירוק בפרחי הביקורת כיומיים לאחר הטיפול. השערותינו לגבי התחדשות תהליך הפירוק הינן כי המעכב הפעיל. יתכן כי עיכוב הפירוק אינו מוחלט וכי פירוק איטי יותר מתרחש כל הזמן. כמו כן, יתכן כי השפעתו של המעכב הינה זמנית ונגמרת לאחר מספר ימים ובשל כך אנו רואים התחדשות של תהליך הפירוק.

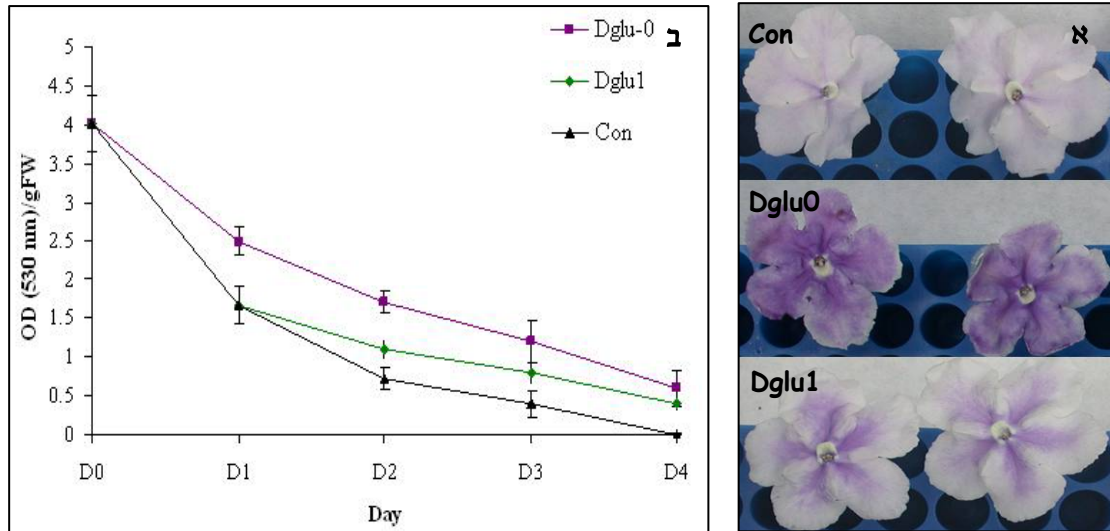
איור 7: השפעת טיפול במעכב פעילות β גלוקוזידאזות על ריכוז האנטוציאנין בפרחי ברונפלסיה
 א. השפעת טיפול בהגמעה (1M) ובטבילה (הריכוזים המולריים מצוינים באיור) במעכב D gluconic acid הספציפי
 לאנזימים ממשפחת ה- β גלוקוזידאזות בהשוואה לפרחי ביקורת שהוגמעו ונטבלו בתמיסת סוכרוז (Con). הוספת המעכב
 נעשתה ביום 0 והפרחים צולמו ביום 2 לאחר פתיחת הפרח. התמונה מייצגת 5-10 פרחים שנלקחו לכל טיפול (א). ריכוז
 האנטוציאנינים נקבע עבור כל טיפול (ב). התוצאות מייצגות ממוצעים של 5-10 חזרות \pm שגיאת תקן.



בניסוי הבא שערכתי בדקתי האם להתחלת טיפול העיכוב על ידי D gluconic acid ביום 1 לאחר פתיחת
 הפרח תהיה השפעה כלשהי על תהליך פירוק האנטוציאנין בפרחי הברונפלסיה (איור 8). בדיקת התחלת
 טיפול במעכב ביום 1 העלתה כי עדיין ישנה פעילות של β גלוקוזידאזות הקשורה לפירוק האנטוציאנין
 מאחר ועיכוב פעילות גם בשלב זה גרם לעיכוב בפירוק האנטוציאנין לעומת פרחי הביקורת. בניסוי זה
 נלקחו לניסויי פרחים עד יום 4 לאחר פתיחת הפרח על מנת לבדוק את השפעת מעכב הפעילות לאורך זמן
 ואת קצב התחדשות תהליך הפירוק. ניתן לראות ירידה משמעותית ביותר בריכוז האנטוציאנינים (סעיף
 ב') בין יום 0 ליום 1 שיכולה להיות מוסברת לאו דווקא על ידי פירוק פעיל אלא בשל גדילת הפרח ומיהול
 האנטוציאנינים.

איור 8: השפעת מתן טיפול במעכב פעילות β גלוקוזידאזות בשלבים שונים של התפתחות הפרח על ריכוז האנטוציאנין בפרחי ברונפלסיה.

א. השפעת מתן טיפול D gluconic acid בשלבים שונים במהלך התפתחות הפרח בפרחי ברונפלסיה על ריכוז האנטוציאנין בהשוואה לפרחי ביקורת שהוגעו ונטבלו בתמיסת סוכרוז (Con). המעכב הוסף ביום 0 (Dglu 0) ויום 1 (Dglu 1). הפרחים צולמו ביום 2 לאחר פתיחת הפרח. התמונה מייצגת 10 פרחים שנלקחו לכל טיפול (א). ריכוז האנטוציאנינים נקבע עבור כל טיפול בימים 0,1,2,3,4 (D0-4) לאחר פתיחת הפרח (ב). התוצאות מייצגות ממוצעים של 10 חזרות \pm שגיאת תקן.



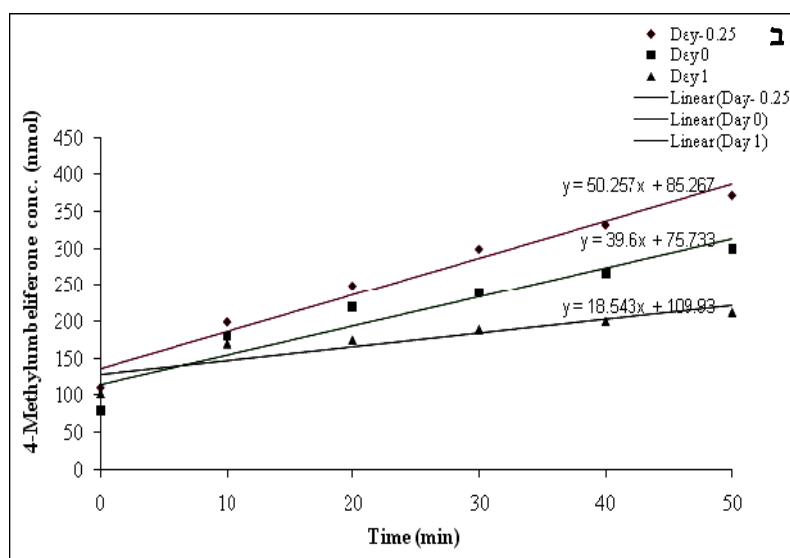
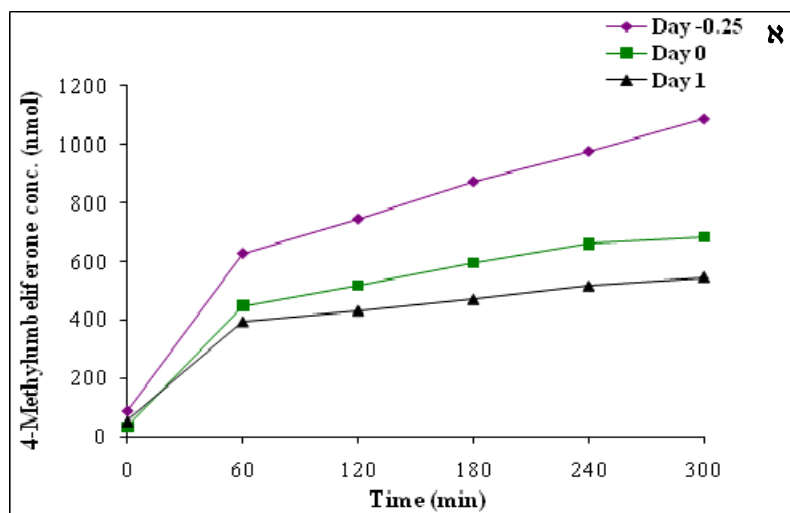
מתוצאות ניסויי עיכוב פעילות β גלוקוזידאזות באמצעות טיפולים במעכב הפעילות D gluconic acid עולה כי ככל הנראה ישנה מעורבות כלשהי של אנזימים ממשפחת ה- β גלוקוזידאזות בשלבים שונים של תהליך פירוק האנטוציאנינים המתרחש במהלך התפתחותם של פרחי הברונפלסיה מאחר ועיכוב פעילות של אנזימים אלו הביא לעיכוב משמעותי של תהליך הפירוק.

3.1.2 בדיקת פעילות אנזימטית של חלבונים ממשפחת ה- β גלוקוזידאז

מיצוי חלבון מפרחי ברונפלסיה מימים 0, -0.25, ו-1 לאחר פתיחת הפרח נעשה כמפורט בפרק השיטות. ממדידת רמת הפלורסנציה המייצגת את כמות תוצר הפעילות האנזימטית לאורך 5 שעות (איור 9א) נמצא כי עיקר הפעילות מתרחשת בשעה הראשונה ועל כן נעשה ניסוי נוסף בו נבדקה כמות התוצר במשך שעה (איור 9ב). על מנת לחשב מכמות התוצר את קצב הפעילות האנזימטית נעשה חישוב של הרגרסיה הליניארית (איור 9ב) ומשיפוע קו הרגרסיה ניתן היה לקבל את קצב הפעילות האנזימטית. מהתוצאות שהתקבלו ניתן לראות כי בנקודת הזמן יום -0.25 השיפוע היה הגבוה ביותר ועמד על 50.257, מה שמצביע על רמת הפעילות האנזימטית הגבוהה ביותר, בעוד שהשיפועים שהתקבלו עבור מיצויי החלבון מימים 0 ו-1 היו מתונים יותר ועמדו על 39.6 ו-18.543 בהתאמה.

איור 9: בדיקת פעילות β גלוקוזידאזות במיצויי חלבון מפרחי ברונפלסיה.

קביעת רמת פעילות β גלוקוזידאזות על ידי הוספת הסובסטרט 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucoside (MUGlc), למיצויי חלבון מפרחי ברונפלסיה מימים -0.25, 0 ו-1. רמת הפעילות נקבעה על ידי מדידת כמות האגליקון הפלורסנטי (4-MU) 4-Methylumbelliferone, המשתחרר כתוצאה מפעילות β גלוקוזידאזות בהשוואה לעקומת כיול MU. המדידה בוצעה במשך 6 שעות (א) ובמשך שעה (ב). מדידת הפלורסנציה נעשתה באורך גל של 534nm לאחר עירור באורך גל של 345nm.



בניסויים שתוארו עד כה נבחנה פעילות אנזימים ממשפחת ה- β גלוקוזידאז והשפעת עיכוב פעילות זו על תהליך פירוק האנטוציאנין. ניסויים אלו בוצעו על ידי שימוש בסובסטרט ובמעבד שאינם ספציפיים לאנזים כלשהו במשפחה. מתוצאות אלה התחזקה ההשערה כי ישנה מעורבות של β גלוקוזידאזות בתהליך הפירוק. מכאן גם עלה הצורך בהתמקדות באנזים ספציפי ממשפחה זו שהינה מגוונת ונרחבת מבחינת ספציפיות האנזימים החברים בה לאגליקון ולמולקולת הסוכר.

3.2 בחירת תת משפחה ספציפית ממשפחת ה- β גלוקוזידאז

בעבודה קודמת שנעשתה במעבדתנו במסגרת עבודתה של אילת בר-עקיבא אופיין הרכב האנטוציאנינים בפרחי הברונפלסיה ביום פתיחת הפרח באמצעות אנליזת MS שבוצעה במעבדתו של ד"ר אסף אהרוני במכון וייצמן. הרכב האנטוציאנינים בפרחי הברונפלסיה נקבע לאחר זיהוי הקבוצות המתמירות על האגליקונים השונים, בעזרת המסות המתאימות ובדיקתן ב- Database of Natural Products (DNP). אימות המבנה נעשה באנליזת MS/MS והשווה לספרות. מתוצאות עבודה זו עלה כי האנטוציאנין העיקרי בפרחים הינו Malvidin-3-O-Coumaroylrutinoside-5-O-glucoside (Bar-Akiva *et al.* 2010). בנוסף נמצא כי ישנה הסתברות גבוהה כי שלושת האנטוציאנינים העיקריים בפרחי הברונפלסיה מותמרים בעמדה 3 של טבעת C של שלד האנטוציאנידין בדו-סוכרים (Bar-Akiva *et al.* 2010). אפיון זה הוביל להתמקדות בתת משפחה ספציפית מתוך משפחת ה- β גלוקוזידאז המתמחה בהידרוליזה של דו סוכרים. כמו כן, מנתוני אנליזת microarray שנעשו בה נעשתה היברידיזציה הטרולוגית בין RNA שהופק מפרחי ברונפלסיה מימים 0 ו-1 לבין סליידים (microarray) של תפוי"א עליהם הודפסו 15,264 קלונים של cDNA שמקורו בצמחי תפוח אדמה המשתייך אף הוא למשפחת הסולניים. מסריקת מאות גנים אשר רמת הביטוי שלהם משתנה ושעלו מניסוי זה, נמצא גן ממשפחת ה- β גלוקוזידאז, השייך לתת המשפחה Glycosyl Hydrolase Family 1 (GH1) אשר רמת הסיגנל שלו ירדה באופן מובהק בין יום 0 ליום 1. לרצף הגן *GHI* מגנום תפוח האדמה הותאמה אנוטציה (באמצעות האתר www.TIGR.org) ונמצאה הומולוגיה גבוהה בינו לבין גנים שונים מתת משפחת GH1 ממקורות שונים. בדיקת אופי הפעילות של גנים מן המשפחה העלתה כי הגן עשוי להיות מעורב בתהליך פירוק האנטוציאנינים. בין מאפייני תת המשפחה GH1 התמחות בפירוק של דו סוכרים בשני שלבים: בשלב הראשון פירוק הקשר בין שני הסוכרים. לאחר מכן עוד גלוקוזידאז מפרק את הקשר בין הסוכר לאגליקון (Ahn *et al.* 2004).

3.2.1 ריצוף הגן *GHI*

בשל המתואר בסעיף 3.2 וההחלטה להתמקד בגן ממשפחת ה- β גלוקוזידאז השייך לתת המשפחה Glycosyl Hydrolase Family 1, נעשה ריצוף של הגן *GHI* מ-cDNA של פרחי ברונפלסיה. תהליך הריצוף החל בתכנון תחלים התואמים לרצף הגן *GHI* ממקור תפוח אדמה, אשר בניסוי ההיברידיזציה ההטרולוגית המתואר בסעיף 3.2 נמצא כי ישנה הומולוגיה המאפשרת היברידיזציה בינו לבין רצף אשר מקורו מפרחי הברונפלסיה. רצף זה הושווה לנתוני ESTs שונים ממשפחת הסולניים ותחלים תוכנו מאיזורים שמורים (טבלה 1). ראשית בודד רצף של 456bp שעל פיו נעשה המשך הריצוף. רצף זה, של 456bp תורגם והשווה לרצפי חומצות אמינו ממקורות שונים ובהם צמחי הארבידופסיס והאורז. מהשוואה זו נמצאו איזורים שמורים ברמת רצף חומצות האמינו ועל בסיס השוואה זו תוכנן תחל דגנרטיבי באוריינטציית Sense (טבלה 1). תוצר ריאקציה זו היה מקטע בן 1126bp. בהמשך בוצעה ריאקציית RACE לריצוף קצוות 5' ו-3' של הגן *GHI*. מריאקציה זו התקבל רצף של 1520bp (איור 10) שמתרגמו התקבלה מסגרת קריאה שלמה של 506 חומצות אמינו מקודון המתיונין (ATG) ועד קודון הסיום (איור 11).

איור 10: רצף הגן GHI אשר בודד מפרחי הברונפלסיה

באדום מסומנים הבסיסים ATG המייצגים את חומצת האמינו מתיונין ממנה מתחילה מסגרת הקריאה והבסיסים TAA שיחד יוצרים stop codon המסיים את תרגום הרצף.

ATGTTGCCTAAAAGAGGCATTGCTCTTTGGGCAATATTACTAGTATTTGTTCTTGGACTGCTTACAT
ATTGTTTCAGCACAAAATATCAGCAGAAACAGCTTTCCAAAAGGTTTTATTTTTGGCACTGCTTCTTC
TGCTTATCAGTTTGAAGGCGCTGTAAAGGAGGACGGGAGAGGTCCAACATATATGGGATAAATTTG
CTCATACTTTTGGTAAAGTACTTGTATTTAGCAATGCCGACGTAGCCGTGGATCAGTATCACCGTT
ACCCTGAAGATATACAGCTTATGAAGAATATGGGAATGGATGCTTACAGATTTTCTATTGCTTGGG
CCAGAATTTTCCCTAATGGAAGTGGAGAAATTAATCAGGCTGGAATTGATCACTACAATAAGTTGA
TCAATGCTCTACTAGCTAATGGAATCAACCAATTTGTAACACTATAACCATTGGGACCTTCCTCAAG
CTCTAGAAGACAAGTACAATGGGTGGCTCAGCCACAGATCATAAAAAGATTTTGCAATATACGCG
GAGACGTGCTCAAGAATTTTGGTGATAGGGTGAAGAAGTGGATCACTATTAATGAGCCCCATACT
GTTGCCACCCAAGGATTTGATGTAGGACTTCAAGCACCTGGTCGATGTTCCATCCTCCTTCGAGCT
CTTTGCAGGGCTGGCAACTCTGCAACTGAACCTTACATTGTTACTCACAATTTACTGCTTGCTCATG
CCACCGTTGTAGACATTTACAAAAAGAAGTACAAGCCAATACAACATGGATCAATTGGGATATCA
TTAGATTCCTTTTGGTATGAGCCCATGACAACTCCACAGATGACATTGAAGCAACACAAAGGGCC
ATTGAGTTCAATTTAGACTGGTATCTTGAGCCTGTGATGCTTGGAAAGGTATCCAAGTTCAATGGTG
GATAGAGTAGGAAGCCGGTTACCAGAATTTTCACCAGCTGAGTCTGCTCTTGTGAAAGGTTCCCTAC
GATTCATAGGCATAAATCACTACACTACATGGTATGCTAGCAAGAACAACAAACATAAATTGG
TGTGCTGCTCAATGACACCCTTGCAGACTCTGGCACCCCTTACCCTCCCATTCAAAGGTTTAAACC
AATAGCAGACAGGCAAGTCCATATGGTTATACATAGTACCTCATGGTATCAGAAGCTTAATGA
GCTACATCAAGCAAAAAGTATGGGAACCCTTACTGATCATTATCACTGAAAATGGAATGGATGATCCA
AATAACGCATTAATATCCAGACAAGATGCTCTCAAGGATACAAAAAGGATCAAATATCACAAATGA
CTATCTTACGAACCTGTTAGCTGCTATCAAAGAAGATGGCTGCAACGTGAAAGGATACTTCGTGTG
GTCTCTGATGGATAATTGGGAGTGGGCAGCTGGATTTTCGTGAGGTTTGGACTTTATTATGTGGA
TTTCAAGGACAACCTCAAGAGATATCCTAAGAATTCGTAACCTGGTTCAAGAATTTCTTAGGCTC
TGCTTAA

איור 11: רצף חומצות אמינו של 506aa שהתקבל מתרגום רצף הגן GHI :

חומצות האמינו המסומנות בצהוב מייצגות איזורים שמורים באנזימים שונים השייכים לתת משפחת GHI (Ahn et al. 2004).

MLPKRGIALWAILLVFVLGLLTYCSAQNISRNSFPKGFIFSTASSAYQFEGAVKEDGRGPTIWDKFAHTF
GKVLDFSADVAVDQYHRYPEDIQLMKNMGMDAYRFSIAWARIFPNGTGEINQAGIDHYNKLVNALL
ANGIQPFVTLYHWDLPPQALEDKYNGWLSPOIKDFAIYAETCFKNFGDRVKNWITINEPHTVATQGFV
GLQAPGRCSILLRALCRAGNSATEPYIVTHNLLAHATVVDIYKPKYKPIQHGSSIGSLDSFWYEPMTNS
TDDIEATQRAIEFNLDWYLEPVMGLGRYPSSMVDVRSRLPEFSPAESALVKGSYDFIGINHYTTWYASK
XKTNIIGVLLNDFADSGTLTLPFKGLKPIADRASSIWLYIVPHGIRSLMSYIKQKYGNPLIITENGMDP
NNALISRQDALKDKTRIKYHNDYLTNLLAAIKEDGCNVKGYFVWSLMDNWEWAAGFSSRFGLYYVD
FKDNLKRYPKNSVNWFKNFLGSA

3.2.2 בדיקת הימצאות סיגנל הכוונה ברצף החלבון GH1

מבדיקת רצף חומצות האמינו שהתקבל מתרגום רצף הגן GHI שבודד מפרחי צמח הברונפלסיה (איור 11) נמצא באמצעות האתר SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) לפי Bendtsen et al. (2004) כי ישנה הסתברות של 99.7% (Signal peptide probability) שבקצה האמיני של החלבון נמצא סיגנל הכוונה. תוכנת ה-SignalP צופה את קיומם של אתרי חיתוך של האנזים signal peptidase I המבצע חיתוך של רצפי הכוונה ובכך מספקת גם את החלוקה לחלבונים מופרשים ושאינם מופרשים וגם מאתרת את אתר החיתוך. קיומו של סיגנל הכוונה ברצף מעיד על כך שהחלבון מיועד להיות מופרש מן

הציטוזול אל הרשתית האנדופלסמטית או אל מנגנון הגולג'י ומשם אל מדורים שונים בתא כדוגמת כלורופלסט, מיטוכונדריה, פרוקסיזום וממברנת הטונופלסט או אל מחוץ לתא (Bendsten *et al.* 2004; Nelson *et al.* 2007). עדיין ישנה בעייתיות בפרדיקציה מדוייקת של המידור התוך תאי של חלבון מרצף חומצות האמינו בלבד (Emanuelsson and von Heijne, 2001; Nakai and Horton, 2007) אך הימצאות סיגנל הכוונה ברצף חומצות האמינו מחזקת את ההשערה כי מדובר בחלבון אשר פעילותו בואקואולת התא שם מצטבר האנטוציאנין (איור 12, טבלה 6). בנוסף, נמצא כי ישנה סבירות גבוהה ביותר (Max cleavage site probability) כי אתר חיתוך סיגנל הכוונה, המתבטא באיור 10 בערכי ה- C score וה- Y score, נמצא בין חומצות האמינו 26 ו-27: CSA-QN (איור 12). ההומולוג הקרוב ביותר לרצף הברונפלסיה הקיים הינו מצמח הארבידופסיס ומבדיקת רצף חלבון ממקור זה נמצא כי ישנה סבירות גבוהה לקיומו של סיגנל הכוונה.

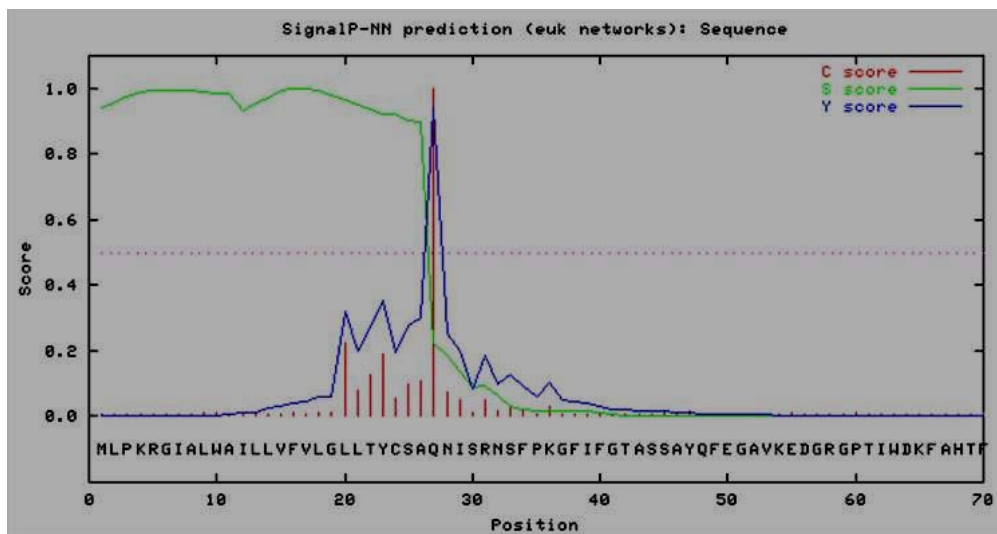
איור 12: תוצאות אנליזת הימצאות סיגנל הפרשה ברצף החלבון GH1 מן האתר SignalP.

C score המסומן באדום באיור הינו ערך החוזה את מיקום אתר החיתוך (cleavage site score).

S score המסומן בירוק באיור הינו ערך החוזה את קיום סיגנל הפרשה (signal peptide score).

Y score המסומן בכחול באיור הינו ערך המשלב את ה- C score (cleavage site) ואת ה- S score (signal peptide score) ובכך משפר את יכולת הפרדיקציה של אתר החיתוך.

D score משמש להבחנה בין רצפים מופרשים לרצפים שאינם מופרשים תוך שימוש בערך ה- C score.



טבלה 6: תוצאות אנליזת הימצאות סיגנל הפרשה ברצף החלבון GH1 מן האתר SignalP.

Measure	Value	Signal peptide?
Max. C score	0.999	Yes
Max. Y score	0.942	Yes
Max. S score	0.997	Yes
D score	0.954	Yes

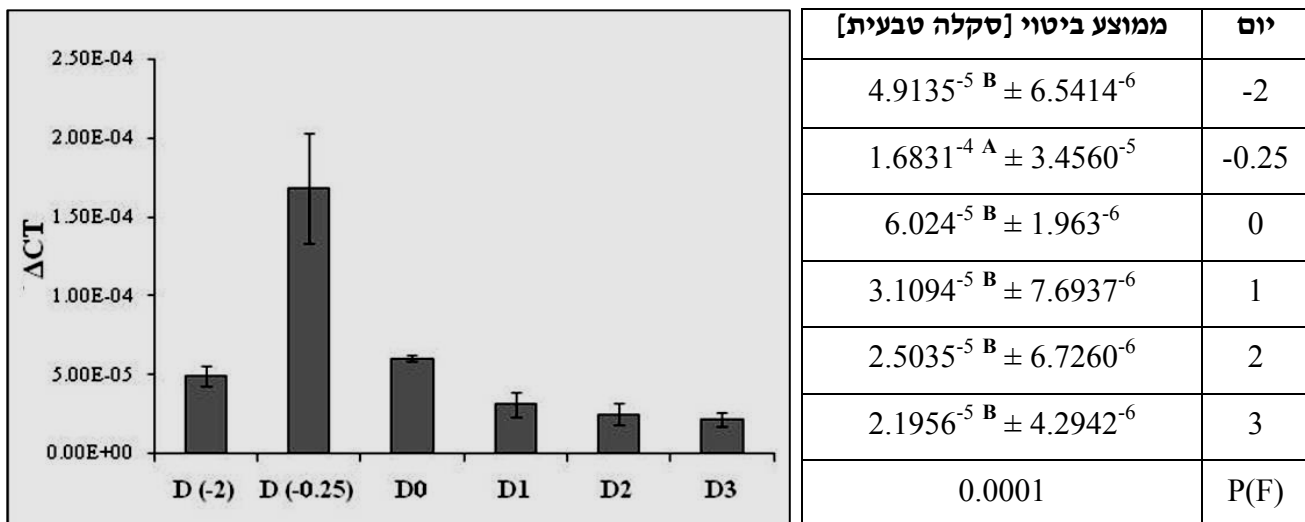
3.2.3 בחינת פרופיל הביטוי של הגן *GHI* על ידי Real time PCR

על בסיס הרצף נעשה ניסיון לאפיין את ביטוי הגן על ידי ריאקציית Real time PCR (qRT-PCR) בשלבי התפתחות הפרח השונים – ימים: -2, -0.25, 0, 1, 2, 3. קריאת התוצאות נעשתה באמצעות ABI 5600 detection system (Applied Biosystems). תוצאות אנליזת הביטוי של מקטע הגן *GHI* (איור 13) הראו כי ביום -0.25 רמת התעתיקים גבוהה פי 3.42 יותר מאשר ביום -2, פי 4 יותר מאשר ביום 1 וירידה של כמעט פי 8 בביטוי בין יום -0.25 ליום 3. עיכוב בפירוק הצבע *in vivo* בעקבות הגמעת פרחים במעבד ספציפי של אנזים זה מצביע על מעורבות האנזים בתהליך ולכן דפוס הביטוי הגבוה ביום -0.25 מתאים להשערת העבודה ולצפוי מאנזים המעורב בתהליך הפירוק.

איור 13/טבלה 7: כמות תעתיקי המקטע *GHI* ביחס לכמות תעתיקי גן הייחוס *18S* בשלבי התפתחות הפרח השונים

אותיות שונות הכתובות בטבלה בכתב עילי ומודגש מצביעות על הבדלים מובהקים סטטיסטית בין הימים השונים ($p < 0.05$) כפי שנקבע על מבחן Tukey-Kramer HSD.

(-2) הינם פרחים כיומיים לפני פתיחת הפרח (פקע סגור), D (-0.25) הינם פרחים כשש שעות לפני פתיחת הפרח, D0 הינם פרחים ביום פתיחת הפרח, D1 פרחים יום לאחר פתיחת הפרח, D2 יומיים לאחר פתיחת הפרח ו-D3 פרחים כשלושה ימים לאחר פתיחת הפרח. הערך ΔCT מייצג את ההפרש ברמת הביטוי בין הגן הנבדק לבין גן הייחוס *18S*. התוצאות מייצגות ממוצעים של 3 חזרות ביולוגיות ו-3 חזרות טכניות \pm שגיאת תקן.



3.2.4 קביעת המידור התוך תאי של החלבון GH1

קביעת המידור התוך תאי של חלבון מהווה כלי חשוב ללימוד פעילותו בשל הקשר הישיר בין מיקומו של החלבון לפעילותו הפיזיולוגית (Bolte and Cordelières, 2006). כמו כן, יכולתו הביוכימית של אברון תוך תאי מוגדרת בעיקרה על ידי החלבונים/האנזימים הממודרים אליו (Nelson *et al.* 2007). שיטה מקובלת לקביעת המידור התוך תאי של חלבונים הינה קו-לוקליזציה באמצעות מיקרוסקופיה פלורסנטית (Bolte and Cordelières, 2006). כלומר, שימוש בחלבונים אשר מיקומם התוך תאי ידוע ולבחון את מיקום החלבון הנבדק ביחס אליהם.

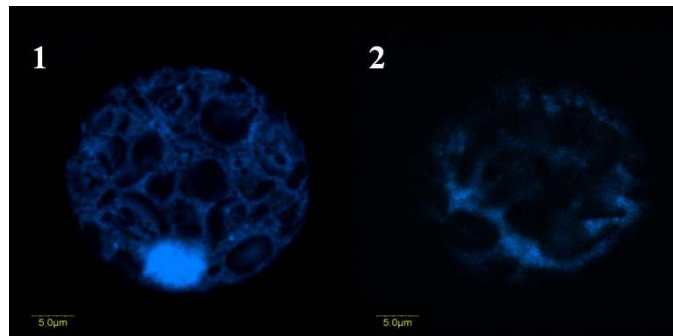
על מנת לקבוע את מידורו התוך תאי של החלבון יש לבצע קו-לוקליזציה של הפלסמיד המכיל את החלבון המאוחה GH1-CFP תחת בקרת הפרומוטר 35S (איור 6), מול פלסמידי ביקורת המכילים חלבון כלשהו אשר מידורו התוך תאי ידוע, המאוחה לגן מדווח. חלבון כזה, בו מקובל להשתמש כסמן לממברנת הטונופלסט הינו γ -TIP, אקוופורין הממוקם בממברנת הטונופלסט (Saito *et al.* 2002, Nelson *et al.* 2007). בעבר הראו כי מידור לוקואולה עצמה לא מתאפשר בשל ה-pH הנמוך שאינו מאפשר את ביטוי החלבון הפלורסנטי המדווח (Tamura *et al.* 2003) ועל כן נבדק המידור אל הטונופלסט. γ -TIP מהווה סמן אמין לממברנת הטונופלסט המקיפה את הוואקואולה המרכזית הקיימת בתאי צמח בוגרים (Nelson *et al.* 2007) ואף משמש כסמן במחקרים אודות פעילות הוואקואולה (Jauh *et al.* 1999).

במסגרת עבודתי נבנה הקונסטרוקט המכיל את רצף הגן GH1 מאוחה לרצף הגן המדווח CFP (pSAT-GH1-CFP) המתואר באיור 6 בפרק השיטות. ניסויי הקו-לוקליזציה נערכו על ידי טרנספורמציה של הפלסמידים לפרוטופלסטים של תאי מזופיל מצמחי טבק כמתואר בסעיף 9.2 בפרק השיטות.

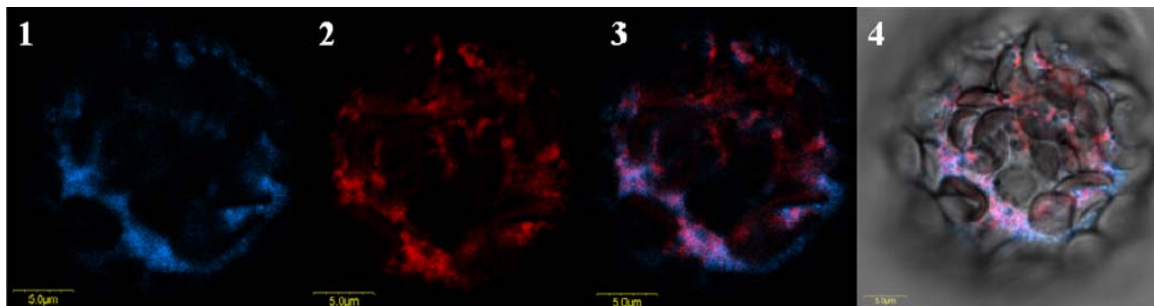
תוצאות ראשוניות אשר התקבלו מבחינת ביטוי הקונסטרוקט שנבנה, pSAT-GH1-CFP, בפרוטופלסטים בהשוואה לביטוי הפלסמיד pSAT-CFP אשר אינו מכיל את רצף הגן GH1 (איור 14) מעלות כי יש שוני בדפוס הביטוי. בפרוטופלסט אליו הוחדר הפלסמיד pSAT-CFP (פנל 1) נראה ביטוי של החלבון הפלורסנטי CFP בגרעין ובציטופלסמה. לעומת זאת, בפרוטופלסט אליו הוחדר הפלסמיד pSAT-GH1-CFP (פנל 2) לא נראה שיש ביטוי של CFP בגרעין התא ודפוס הביטוי שונה במראהו.

מניסוי קו-לוקליזציה שערכתי בו נעשתה השוואה בין דפוס הביטוי של הפלסמיד pSAT-GH1-CFP ושל פלסמיד המבטא את החלבון המאוחה γ -TIP-Cherry (איור 15), לא התקבלו תוצאות חד משמעיות בשל בעיה טכנית הקיימת בבדיקת שני הסמנים CFP ו-Cherry יחדיו אך נראתה חפיפה חלקית בביטוי שני הסמנים. לשם קביעה מדויקת של מידורו התוך תאי של החלבון GH1 יש צורך בבניית קונסטרוקט נוסף אשר יכיל את הרצף המקדד לחלבון γ -TIP מאוחה לרצף הגן המדווח YFP אשר מתאים לעבודה מול CFP. יצירת קונסטרוקט זה והשוואת דפוס הביטוי של שני הקונסטרוקטים תאפשר קבלת תמונה ברורה יותר לגבי מידורו התוך תאי של החלבון GH1. המידור אל ממברנת הטונופלסט יכול לחזק את ההשערה כי החלבון פעיל GH1 פעיל בואקואולת התא ויכול להיות מעורב בתהליך פירוק האנטוציאנינים.

איור 14: השוואת דפוסי הביטוי של הפלסמידים pSAT-CFP ו-pSAT-GH1-CFP באיור שני פרוטופלסטים המייצגים את תוצאות ניסוי זה. (1) פלורסנציה כחולה התואמת לחלבון CFP המתקבלת כאשר מעוררים את הפרוטופלסטים באורך גל של 458nm (2) פלורסנציה כחולה התואמת לחלבון GH1-CFP



איור 15: קו-לוקליזציה של GH1 שבודד מפרחי הברונפלסיה על ידי ביטוי חולף של החלבונים המאוחים GH1-CFP ו- γ -TIP-Cherry בפרוטופלסטים של תאי טבק באיור פרוטופלסט המייצג את תוצאות ניסוי זה. (1) פלורסנציה כחולה התואמת לחלבון GH1-CFP המתקבלת כאשר מעוררים את הפרוטופלסטים באורך גל של 458nm (2) פלורסנציה אדומה התואמת לחלבון γ -TIP-Cherry המתקבלת כאשר מעוררים את הפרוטופלסטים באורך גל של 543nm (3) תמונה משותפת של פלורסנציה כחולה ואדומה (layover) אשר התקבלה מאיחוי תמונות 1 ו-2 בה ניתן לראות חפיפה חלקית בביטוי GH1-CFP ו- γ -TIP-Cherry (4) בפרוטופלסט באור הנראה ועליו layover של תמונה 3.



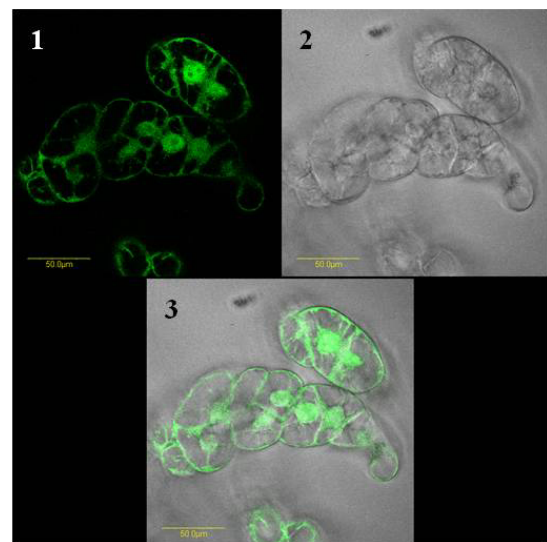
3.2.5 בדיקת השפעת ביטוי ביתר של הגן *GHI* שבודד מצמח הברונפלסיה *in vivo* במערכות צמחיות שונות

בשל השתייכות צמח הברונפלסיה למשפחת הסולניים נבחרו מספר צמחי מודל השייכים אף הם למשפחת הסולניים על מנת לבדוק את פעילות הגן *GHI* במערכות צמחיות *in vivo*. המערכות שנבחרו הינן מערכות מודל קלאסיות לטרנספורמציה קבועה וחולפת. בדיקת הפעילות נעשתה באמצעות טרנספורמציה הפלסמיד המתואר בסעיף 7 בפרק השיטות המכיל את רצף הגן *GHI* שבודד מפרחי ברונפלסיה תחת בקרת הפרומוטר הויראלי 35S ואת רצף הגן המדווח *GFP*.

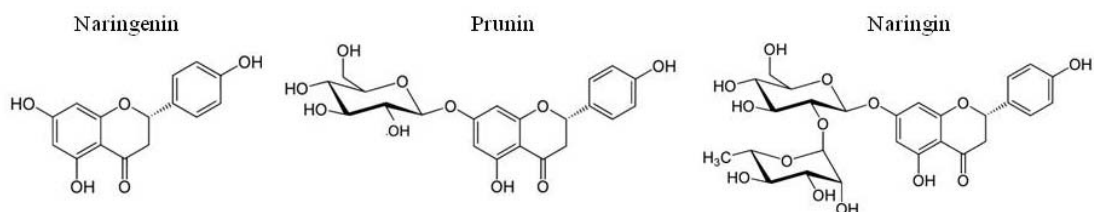
3.2.5.1 בדיקת ביטוי במערכת תאי טבק *Bright Yellow 2 (BY-2) tobacco (Nicotiana tabacum)*
מערכת תאי ה- BY-2 נבחרה בשל האפשרות לטרנספורמציה וסלקציה יעילה ויכולת "האכלה" של התאים בסובסטרטים שונים הניתנים למיצוי מן התאים לאחר מעבר במערכת צמחית *In vivo*. תרבית

תאי BY-2 עברה טרנספורמציה של הפלסמיד המכיל את רצף הגן *GHI* שבודד מפרחי ברונפליסיה תחת בקרת הפרומוטר הויראלי 35S ואת רצף הגן המדווח *GFP* (איור 5). התאים המותמרים עברו סלקציה על ידי הוספת אנטיביוטיקה למצע הגידול וכמו כן נבדקו לביטוי הגן המדווח *GFP* על ידי סריקה מיקרוסקופית לבדיקת הפלורסנציה בתאים (איור 16). תאי WT ותאים מותמרים המכילים את הפלסמיד pBIN המכיל את רצף הגן *GHI* (איור 5) נלקחו לניסוי והוזנו בפלבנואידים שונים (איור 17) ובהם: Naringin, Prunin, Naringenin. הסובסטרט UDP-Rhamnose קיים בתאים צמחיים באופן טבעי. הביקורות היו תרבית טרנספורמנטים ללא הוספת פלבנואיד ותרבית תאי BY-2 לא טרנספורמנטים (WT).

איור 16: בחינת ביטוי החלבון הפלורסנטי GFP בתאי BY-2 שעברו טרנספורמציה של הפלסמיד pBIN המכיל את רצף הגן *GHI* שבודד מפרחי ברונפליסיה באיור מספר תאים המייצגים 20ml של תרבית תאים אשר עברה טרנספורמציה של הפלסמיד pBIN המכיל את רצף הגן *GHI* תחת בקרת פרומוטר 35S ואת רצף הגן המדווח GFP תחת בקרת פרומוטר 35S. (1) פלורסנציה ירוקה התואמת לחלבון GFP המתקבלת כאשר מעוררים את התאים באורך גל של 515nm. (2) התאים באור הנראה (3) Layover של תמונות 1 ו-2.



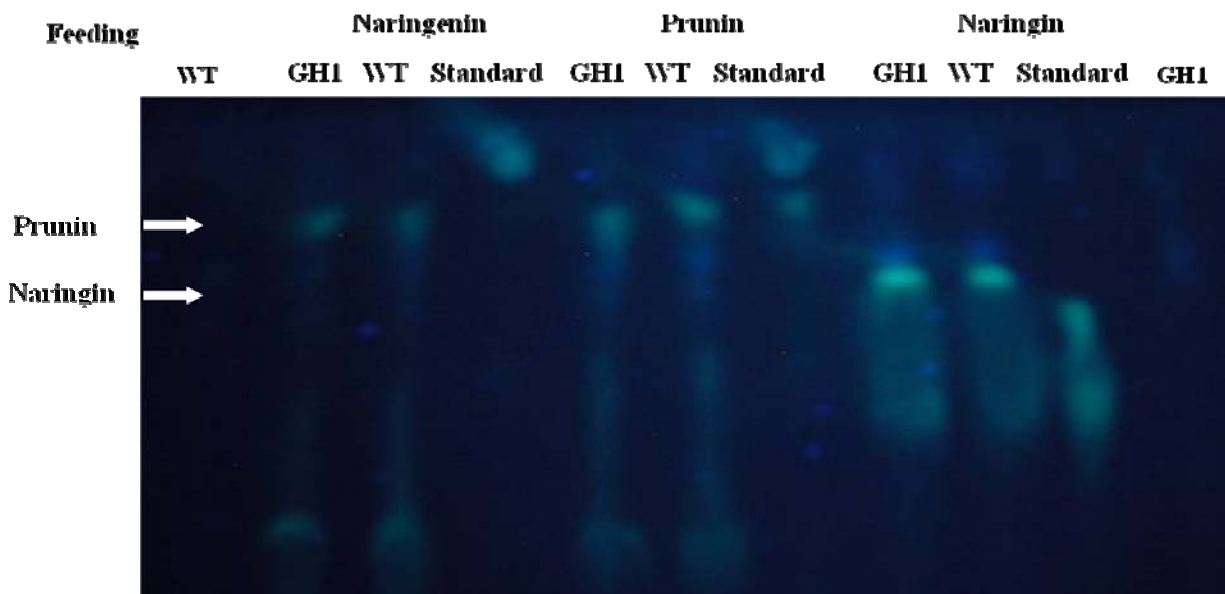
איור 17: הפלבנואידים השונים בהם הוזנו תאי ה-BY-2.



ממיצוי הפלבנואידים שנעשה לאחר הדגרה של כ- 60 שעות של התאים בנוכחות הסובסטרט והפרדתם באמצעות כרומטוגרפיית Thin Layer Chromatography (TLC) (איור 18) ניתן לראות כי דפוס ההפרדה דומה בין התאים הטרנסגנים ותאי ה-WT. בתאי ה-BY-2 מתרחשת באופן טבעי גליקוזילציה ולכן דפוס הריצה של הפלבנואידים שהופקו מן התאים שהוזנו ב-Naringenin שהינו חסר התמרה סוכרית כלשהי דומה לזה של התאים שהוזנו ב-Prunin המותמר במולקולת סוכר אחת. ניתן לראות כי הפלבנואידים שמוצו מן התאים שהוזנו ב-Naringenin הראו דפוס ריצה שונה וזאת משום היות ה-Naringenin מותמר בדו-סוכר מה שמאט את קצב הריצה בפלטה לעומת הפלבנואידים המותמרים במולקולת סוכר אחד בלבד.

איור 18: הפרדה באמצעות Thin Layer Chromatography (TLC) של פלבנואידים שונים שמוצו מתאי BY2 המכילים את הגן *(GHI)* Glycosyl Hydrolase Family 1 לעומת תאי WT שהוזנו בפלבנואידים שונים.

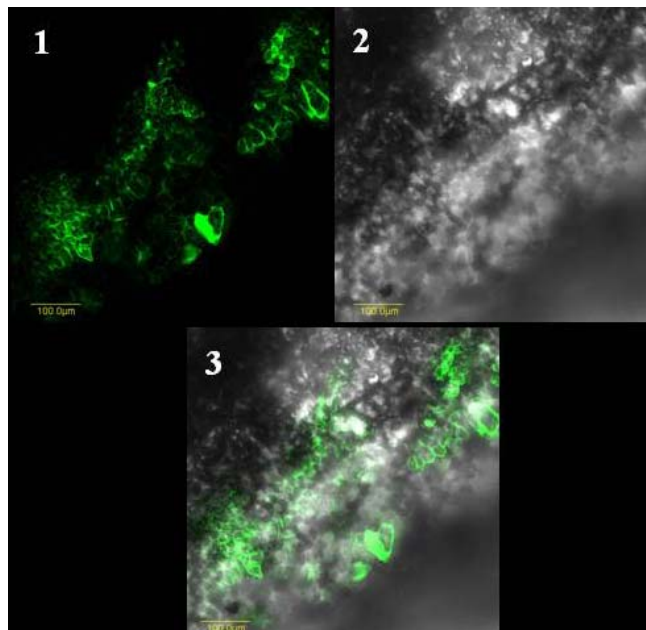
באיור הפרדה של פלבנואידים שונים אשר מוצו מתאי BY2 מותמרים המבטאים את החלבון *GHI* ומתאי WT, באמצעות כרומטוגרפיית TLC. התאים הוזנו בפלבנואידים שונים (Prunin, Naringenin ו-Naringin) שהורצו אף הם כסטנדרטים (standard). מיצוי הפלבנואידים נעשה כ- 60 שעות לאחר ההזנה.



3.2.5.2 טרנספורמציה חולפת לפרחי פטוניה

פרחי פטוניה נבחרו בשל עמידותם היחסית לפרחי הברונפלסיה מה שמעניק זמן ארוך יותר למעקב אחר פנוטיפ אפשרי של הטרנספורמציה. מבנה והרכב האנטוציאנינים בפרחי הפטוניה דומה לזה של פרחי הברונפלסיה וגם שם האנטוציאנינים מותמרים בדו-סוכרים (Ando *et al.* 1999) ועל כן יכולים להיות סובסטרט אפשרי של האנזים שבודד מפרחי הברונפלסיה ועל כן נבדקה השפעת ביטוי ביתר של הגן *GHI* שבודד מפרחי ברונפלסיה על תהליך פירוק האנטוציאנינים במערכת זו (איור 20). הטרנספורמציה נעשתה באמצעות הזרקה ישירה של חיידקי אגרובקטריום (כמתואר בסעיף 8 בפרק השיטות) המכילים את הפלסמיד הבינארי pBIN ועליו רצף הגן *GHI* ורצף הגן המדווח *GFP* (איור 5). כביקורת שימש פלסמיד דומה המכיל את רצף הגן המדווח בלבד. הניסוי נערך בצורה זו על מנת לנטרל את השפעות תהליך ההזרקה על הפרחים. לניסוי זה נלקחו פיסות מעלי הכותרת אשר בהן נראה ביטוי של הגן המדווח *GFP* על ידי סריקה מיקרוסקופית לבדיקת הפלורסנציה בתאים (איור 19).

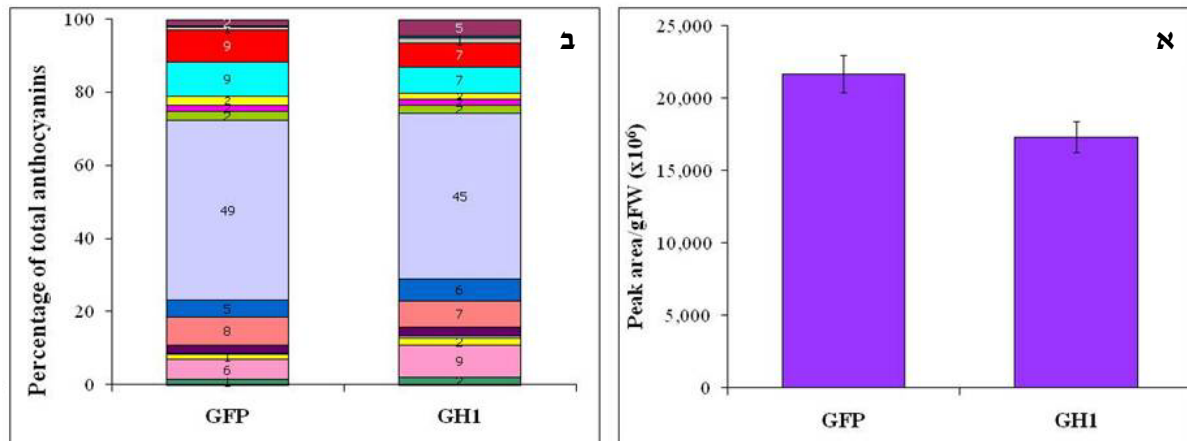
איור 19: בחינת ביטוי החלבון הפלורסנטי GFP בתאי פרחי פטוניה שעברו טרנספורמציה חולפת של הפלסמיד pBIN המכיל את רצף הגן *GHI* שבודד מפרחי ברונפלסיה באיור תאי עלה כותרת מייצג של פרח פטוניה אשר עבר טרנספורמציה של הפלסמיד pBIN המכיל את רצף הגן *GHI* תחת בקרת פרומוטר 35S ואת רצף הגן המדווח GFP תחת בקרת פרומוטר 35S. (1) פלורסנציה ירוקה התואמת לחלבון GFP המתקבלת כאשר מעוררים את התאים באורך גל של 515nm. (2) תאי עלה הכותרת באור הנראה (3) Layover של תמונות 1 ו-2.



איור 20: הרכב האנטוציאנינים בפרחי פטוניה (*Petunia hybrida*) שעברו טרנספורמציה חולפת של הפלסמיד pBIN המכיל את רצף הגן *GHI* שבודד מפרחי ברונפלסיה

א. שטח הפיק למשקל רקמה מבטא את כמות האנטוציאנינים הכללית בפרחים שעברו טרנספורמציה של הפלסמיד המכיל את רצף הגן *GHI* או של פלסמיד הביקורת המכיל את רצף הגן *GFP*.

ב. הריכוז היחסי של האנטוציאנינים השונים בפרחים. הצבעים השונים מייצגים 17 פיקים שונים שנראו בהפרדת מיצוי כלל האנטוציאנינים מן הפרחים. לכל טיפול נלקחו 3-5 פרחים אשר שימשו כחזרות ביולוגיות ומכל פרח נלקחו 3 דוגמאות אשר שימשו כחזרות טכניות.

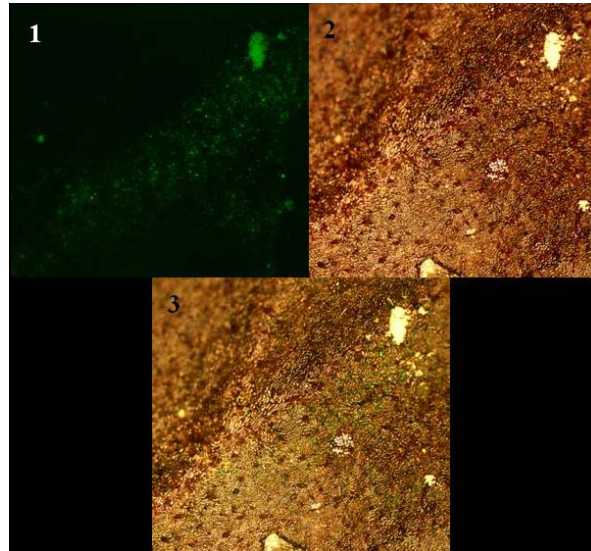


מניסוי זה עולה כי ישנם שינויים קלים בשני הפרמטרים שנבדקו בעקבות טרנספורמציה חולפת וביטוי ביתר של הגן *GHI* בפרחי פטוניה. ישנו הבדל בכמות האנטוציאנינים הכללית והכמות בפרחי הטיפול נמוכה מזו שבפרחי הביקורת. מניתוח הרכב האנטוציאנינים ניתן לראות כי ישנם שינויים קלים בהרכב וכי הפיק העיקרי שמהווה 49% מן האנטוציאנינים שמוצו מפרחי הביקורת מהווה 45% מכלל האנטוציאנינים בפרחי הטיפול. יתכן כי השינויים אינם דרמטיים בשל אופי הניסוי, טרנספורמציה חולפת ושאינה קבועה וכמו כן בשל השוני בביטוי הגן עם המעבר מצמח הברונפלסיה לפרחי הפטוניה.

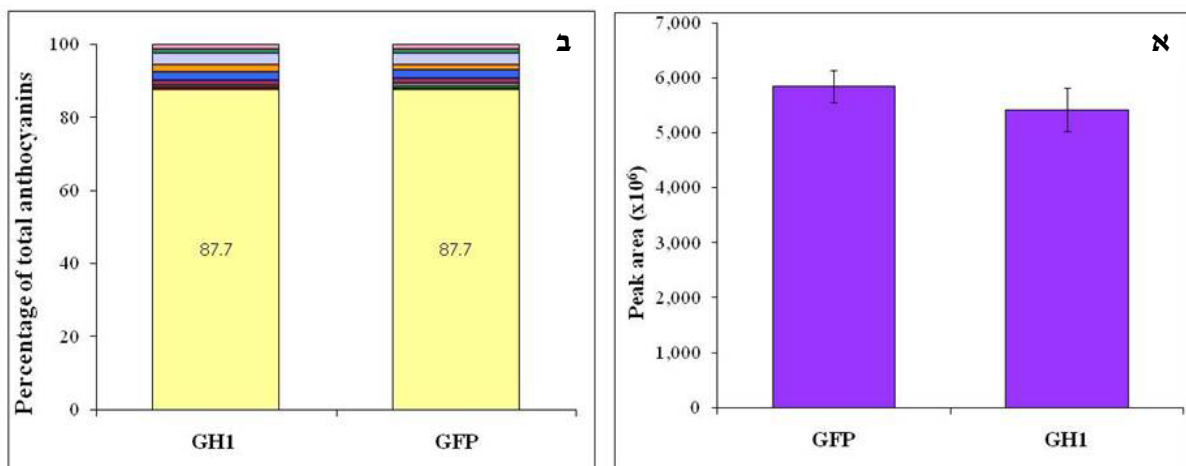
3.2.5.3 טרנספורמציה חולפת לצמחי טבק המבטאים ביתר את פקטור השעתוק *PAP1*

צמחי טבק (*Nicotiana tabacum*) המבטאים ביתר את הגן *PAP1* הינם אדומים/סגולים לחלוטין בשל הגברת מסלול הביוסינטזה של אנטוציאנינים (Borevitz *et al.* 2000). מבנה האנטוציאנינים בצמחי הטבק המבטאים ביתר את הגן *PAP1* דומה לזה של פרחי הברונפלסיה וגם שם האנטוציאנינים מותמרים בדו-סוכרים (Zhou *et al.* 2008) ועל כן יכולים להיות סובסטרט אפשרי של האנזים שבודד מפרחי הברונפלסיה ועל כן נבדקה השפעת ביטוי ביתר של הגן *GHI* שבודד מפרחי ברונפלסיה על תהליך פירוק האנטוציאנינים גם במערכת זו (איור 22). הניסוי נערך בצורה דומה לזה שבפרחי הפטוניה באמצעות הזרקה ישירה של חיידקי אגרובקטריום (כמתואר בסעיף 8 בפרק השיטות) המכילים את הפלסמיד הבינארי pBIN ועליו רצף הגן *GHI* ורצף הגן המדווח *GFP* (איור 5). כביקורת שימש פלסמיד דומה המכיל את רצף הגן המדווח בלבד. הניסוי נערך בצורה זו על מנת לנטרל את השפעות תהליך ההזרקה על הפרחים. לניסוי זה נלקחו פיסות עלים אשר בהן נראה ביטוי של הגן המדווח *GFP* על ידי סריקה בבינקולר לבדיקת הפלורסנציה (איור 21).

איור 21: בחינת ביטוי החלבון הפלורסנטי GFP בתאי עלי טבק טרנסגני 35S:PAP1 שעברו טרנספורמציה חולפת של הפלסמיד pBIN המכיל את רצף הגן *GHI* שבודד מפרחי ברונפליסיה באיור עלה טבק 35S:PAP1 מייצג אשר עבר טרנספורמציה של הפלסמיד pBIN המכיל את רצף הגן *GHI* תחת בקרת פרומוטר 35S ואת רצף הגן המדווח GFP תחת בקרת פרומוטר 35S. (1) פלורסנציה ירוקה התואמת לחלבון GFP המתקבלת כאשר מעוררים את התאים באורך גל של 515nm. (2) העלה באור הנראה (3) Layover של תמונות 1 ו-2.



איור 22: הרכב האנטוציאנינים מעלי צמחי טבק אדומים המבטאים ביתר את הגן *PAP1* שעברו טרנספורמציה חולפת של הפלסמיד pBIN המכיל את רצף הגן *GHI* שבודד מפרחי ברונפליסיה א. שטח הפיקים הכללי המבטא את כמות האנטוציאנינים הכללית בעלי הטבק שעברו טרנספורמציה של הפלסמיד המכיל את הגן (*GHI*) לעומת עלי הביקורת שעברו טרנספורמציה של הפלסמיד המכיל את הגן המדווח *GFP* בלבד. ב. הריכוז היחסי של האנטוציאנינים השונים בעלי הטיפול (*GHI*) והביקורת (*GFP*) מתוך סה"כ האנטוציאנינים. הצבעים השונים מייצגים 10 פיקים שונים שנראו בהפרדת מיצוי כלל האנטוציאנינים מן הפרחים.



בניסוי זה לא נמצאו שינויים מובהקים בתכולת האנטוציאנינים או בהרכבם בעקבות טרנספורמציה חולפת וביטוי ביתר של הגן *GHI*. יתכן כי אופי הצמחים, בהם נמשך כל הזמן תהליך הביוסינטזה של אנטוציאנינים אינו מאפשר שינויים משמעותיים בהרכב ובכמות האנטוציאנינים.

3.3 פיתוח מערכת רגנרציה של צמח הברונפלסיה לבחינת ביטוי *in vivo* של הגנים הנבחרים והשפעתם על תהליך פירוק הצבע

בשל ייחודו של תהליך פירוק האנטוציאנינים בצמח הברונפלסיה ובחירתו כצמח מודל ללימוד תהליך הפירוק נוצר הצורך בפיתוח מערכת רגנרציה יעילה לבדיקת ביטוי קבוע של גנים שונים *in vivo*. תחילת פיתוח מערכת הרגנרציה נעשה במעבדתנו על ידי ליאת שחר. ראשית נבדקה יכולת הרגנרציה של איברים שונים של הצמח ובהם: פרחים, ניצנים חיקיים, גבעולים, עלים צעירים ועלים בוגרים. איברים אלו הונחו על מצעי MS בתוספת הרכבי הורמונים שונים. נמצא כי האיבר בעל יכולת הרגנרציה המוצלחת ביותר הינו עלה צעיר וכי מצע הרגנרציה המוצלח ביותר הכיל 6-Benzyladenine (BA) $4.44\mu\text{M}$ ו- Indole-3-acetic acid (IAA) $2.85\mu\text{M}$ (שחר, 2007). במצע זה נוצרו מכל חתיכת עלה מספר מקסימלי של נצרונים (איור 23א) שגודלו עד לגובה של כסנטימטר וחצי (איור 23ב). בהמשך לעבודה זו פיתחתי מערכת השרשה עבור נצרונים אלו. הנצרונים הושמו במצעי השרשה שונים. כל מצעי ההשרשה הכילו את ההורמון Indole-3-butyric acid (IBA) בריכוזים שונים כמפורט בטבלה 10. לאחר תקופה של כ- 12 שבועות חלק מהצמחונים פיתחו שורשים כאשר המצע בו הייתה התפתחות השורשים המוצלחת ביותר הכיל IBA $2.46\mu\text{M}$ (איור 23ג). תוצאות סעיף זה מופיעות במאמר המצורף כנספח מספר 1 (Lieberman *et al.* 2010).

טבלה 10: השפעת ריכוז ה- IBA במצע על יעילות ההשרשה בצמחוני ברונפלסיה

ריכוז IBA (μM)	זמן השרשה (שבועות)	יעילות השרשה (%)	אחוזי הישרדות
1.23	12	33	100
2.46	12	72	100
4.92	12	0	0

איור 23: תיעוד שלבים שונים בתהליך הרגנרציה של צמח הברונפלסיה



4. דיון ומסקנות

מטרתה העיקרית של עבודה זו הייתה בחינת מעורבות אנזימים ממשפחת ה- β גלוקוזידאז בתהליך פירוק אנטוציאנינים בפרחי צמח הברונפלסיה. בנוסף, עסקתי בפיתוח מערכות טרנספורמציה, רגנרציה והשרשה המובילות להתאמת הברונפלסיה לשמש כצמח מודל ללימוד תהליך פירוק האנטוציאנינים. מלימוד מנגנונים אפשריים לפירוק אנזימטי של אנטוציאנינים (Oren-Shamir, 2009) נמצא כי אחת האפשרויות הינה פירוק דו-שלבי הכולל הידרוליזה של ההתמרות הסוכריות על מולקולת האנטוציאנין ולאחריו חמצון על ידי אנזימים ממשפחות הפרוקסידאז או פוליפנול-אוקסידאז (איור 2). במספר מינים, דווח כי הסרת ההתמרות הסוכריות על ידי β גלוקוזידאזות הינה הכרחית לפני פעילות פרוקסידאזות (Yu et al. 2006). מידור תוך תאי משותף של פרוקסידאזות וגלוקוזידאזות בואקואולה, שם מצטברים האנטוציאנינים, תומך בהשערה הנוגעת למעורבותם של אנזימים אלו בתהליך הפירוק *in vivo* (Calderon et al. 1992, Zapata et al. 1992).

4.1 הברונפלסיה כצמח מודל לבחינת תהליך פירוק אנטוציאנינים בצמח השלם

צמח הברונפלסיה נבחר לשמש כצמח מודל לבחינת תהליכי פירוק פעיל של אנטוציאנינים מאחר ובפרחי הצמח מתרחש התהליך בצורה מהירה ובולטת לעין. הפרח נפתח כאשר הוא בצבע סגול כהה ובמהלך שלושת הימים הבאים הוא מאבד את צבעו בהדרגה עד להלבנה מלאה. ממדידת ריכוז האנטוציאנינים במהלך הימים שלאחר פתיחת הפרח נמצאה ירידה משמעותית בריכוז עד לרמה כמעט אפסית (Vaknin et al. 2005). בשל אופי תהליך הפירוק בו עלי הכותרת מלבינים ואינם משחמים, ניתן להניח כי תהליך הפירוק אינו נגרם בשל תהליך חמצון כפי שמתואר בספרות לגבי פירות הליצי (Zhang et al. 2005; Zheng and Tian, 2006). מעיכוב תהליך ההזדקנות בפרחים מנותקים נמצא כי אין קשר בין תהליך ההזדקנות לבין תהליך איבוד הצבע (Vaknin et al. 2005). כמו כן, נמצא כי איבוד צבע זה דורש סינטזת mRNA וחלבונים ומתרחש לפני תחילת הזדקנות הפרח.

יתרון נוסף של מערכת מודל זו הינו שימור תהליך הפירוק גם בפרחים מנותקים (Vaknin et al. 2005). כך, ניתן לבחון השפעתם של תנאים שונים על תהליך הפירוק, כגון: חומרי גדילה, הורמונים צמחיים ותרכובות כימיות שונות. חיסרון משמעותי המקשה על השימוש בברונפלסיה כצמח מודל הינו הקושי בריבוי מיני של הצמח. חיסרון נוסף הוא הקושי בטרנספורמציה קבועה לעלי הצמח ליצירת צמחים טרנסגניים. על מנת לאפשר שימוש יעיל בצמח הברונפלסיה כצמח מודל ולאפשר בחינת השפעת ביטוי גנים שונים על תהליך פירוק האנטוציאנינים בפרחי הברונפלסיה, פותחו במעבדתנו פרוטוקולים לטרנספורמציה חולפת לפרחים (Nissim-Levi et al. 2010). בשל הקושי הקיים בביצוע טרנספורמציה חולפת בפרח ללא פגיעה ברקמה ועל מנת לבדוק את פעילותם של גנים אשר מופעלים עוד לפני פתיחת הפרח, נוצר הצורך בפיתוח מערכת טרנספורמציה קבועה לצמח הברונפלסיה. על מנת לאפשר טרנספורמציה קבועה המשכתי בעבודת פיתוח מערכת רגנרציה של פיסות עלים עד הגעה לצמח שלם (Lieberman et al. 2010). מערכת רגנרציה זו מהווה בסיס לפיתוח פרוטוקול טרנספורמציה קבועה, ליצירת צמחי ברונפלסיה טרנסגניים. באמצעות פיתוח מערכות הטרנספורמציה והרגנרציה תתאפשר בדיקת השפעת ביטוי ביתר/השתקת גנים החשודים במעורבות בתהליך פירוק האנטוציאנינים בצמח הברונפלסיה השלם.

4.2 מעורבות אנזימים ממשפחת ה- β גלוקוזידאז בתהליך פירוק האנטוציאנין בפרחי ברונפלסיה

במחקרים קודמים נבחנה מעורבות אנזימים ממשפחת ה- β גלוקוזידאז בתהליך פירוק אנטוציאנין בליציי (Zhang *et al.* 2001), בתפוזי דם (Bargallo *et al.* 2007), ביין (Huang 1955) ובחצילים (Sakamura and Obata, 1961). בחינת מעורבות אנזימים ממשפחת ה- β גלוקוזידאזות בתהליך פירוק האנטוציאנין בפרחי הברונפלסיה נעשתה בשיטות פיזיולוגיות, ביוכימיות ומולקולריות. המחקר החל בבדיקת פעילות כללית של אנזימים ממשפחת ה- β גלוקוזידאזות והשפעת עיכוב פעילות של קבוצת אנזימים זו על תהליך הפירוק ובהמשך התמקד המחקר במשפחה ספציפית מתוך קבוצת אנזימי ה- β גלוקוזידאזות, משפחת Glycosyl Hydrolase family 1, מתוכה בודד גן ספציפי מפרחי הברונפלסיה אשר לגביו נעשה אפיון מקיף.

ראשית, נבחנה השפעת עיכוב פעילות β גלוקוזידאזות על תהליך הפירוק (איור 7) על ידי הגמעת וטבילת פרחים מנותקים בתמיסת המעכב D Gluconic acid, מעכב תחרותי של פעילות אנזימי משפחת ה- β גלוקוזידאזות (Babcock and Esen, 1994; Geerlings *et al.* 2000; Jabeen *et al.* 2006). הוספת המעכב לתמיסת הגידול גרמה לעיכוב בתהליך פירוק האנטוציאנין ומכאן עולה כי ישנה מעורבות של β גלוקוזידאזות בתהליך הפירוק. יתכן כי עיכוב פעילות הגלוקוזידאזות עשוי להשפיע על יכולת הפעולה של אנזימים ממשפחת הפרוקסידאז וכי ההפרעה המרחבת הנוצרת על ידי ההתמרה הסוכרית שאינה מוסרת, משפיעה על יכולת הפעולה של הפרוקסידאזות. כמו כן, ניתן ללמוד מניסוי זה כי פעילות אנזימי ה- β גלוקוזידאזות חיונית גם לאורך כל תהליך הפירוק מאחר וגם הוספת המעכב כיום לאחר פתיחת הפרח גרמה לעיכוב בתהליך הפירוק (איור 8).

לאחר מכן נבחנה פעילות כללית של אנזימים ממשפחת ה- β גלוקוזידאזות במיצויי חלבון משלבים שונים בהתפתחות פרחי הברונפלסיה (איור 9). ניסוי זה נעשה על ידי שימוש בגליקוזיד 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucoside (MUGlc) כסובסטרט אפשרי לפעילות נרחבת של אנזימים ממשפחת ה- β גלוקוזידאזות ומקובל לשימוש לקביעת פעילות וספציפיות של אנזימים מן המשפחה. בשל הפלורסנציה של תוצר ההידרוליזה של סובסטרט זה, 4-Methylumbelliferone (MU), המבחן הביולוגי הינו בעל רגישות גבוהה (van Tilbeurgh *et al.* 1988; Babcock and Esen, 1994). ניסוי זה נעשה על מנת לבדוק האם אכן ישנו שינוי כלשהו בפעילות אנזימים ממשפחת ה- β גלוקוזידאזות במקביל לתהליך פירוק האנטוציאנין ואכן נמצא כי ישנו שינוי ברמות הפעילות האנזימטית (איור 9). קצב הפעילות הגבוה ביותר נמצא במיצוי החלבון אשר מקורו בפרחים בשלב של מספר שעות לפני פתיחת הפרח. בשל אופי הניסוי אשר בדק פעילות במיצוי חלבונים כללי תוך שימוש בסובסטרט כללי לא ניתן ליחס את השינויים בקצב הפעילות האנזימטית בלעדית למעורבות בתהליך הפירוק. אנזימים ממשפחת ה- β גלוקוזידאזות מעורבים במגוון תהליכים ביולוגיים המתרחשים במהלך התפתחות הפרח ובהם מטבוליזם של סוכרים הקשור לבניית ופירוק דופן התא (Minic, 2008; Yap *et al.* 2008) שהינו תהליך הכרחי לפתיחת הפרח, במיוחד בשלב שבו נראתה הפעילות הגבוהה ביותר, מספר שעות לפני פתיחת הפרח. ישנה מעורבות β גלוקוזידאזות בתהליכים רבים הקשורים להתפתחות ופתיחת הפרח ובהם תהליכי מטבוליזם שניוני (Minic, 2008) הכוללים שחרור תרכובות ארומה וריח (Reuveni *et al.* 1999; Watanabe *et al.* 1993).

(Suntornwat and Koocharoensap, 2005), מנגנוני הגנה וסימביוזה שונים (Minic, 2008). בפרחי הברונפלסיה ישנה עליה דרמטית בכמות החומרים הנדיפים במקביל לתהליך הפירוק (Bar-Akiva *et al.* 2010). באמצעות השוואה בין אנליזות LCMS ו-GCMS שנערכו לפרחים נמצא שיטת תרכובות בנזואידיות שונות הקשורות לסוכרים ואשר בעקבות פעילות β גלוקוזידאזות משתחררות ונראות גם באנליזת החומרים הנדיפים (Bar-Akiva *et al.* 2010).

ניסויים ראשוניים אלו נערכו על מנת לבדוק האם ישנה מעורבות כלשהי של אנזימים ממשפחת ה- β גלוקוזידאז בתהליך הפירוק. מתוצאות ניסויים אלו ניתן לשער כי קיימת מעורבות שכזו אך בשל אופי הניסויים ניתן להסיק מסקנות לגבי פעילות β גלוקוזידאזות כללית אך לא לגבי אנזימים ספציפי ממשפחת אנזימים גדולה ומגוונת זו. משפחה זו כוללת מאות גנים בארבידופסיס ובאורז, בעלי רמת הומולוגיה גבוהה ברצף חומצות האמינו ומחולקים לעשרות תתי משפחות על פי אופי פעילותם ורצפיהם (Henrissat, 2006; Opassiri *et al.* 1993; Henrissat and Bairoch, 1991; 1991). לאנזימים ממשפחה זו ישנן התמחויות ספציפיות הנקבעות על פי האפיניות לסובסטרטים שונים, טבעיים וסינתטיים, על פי מבנה האגליקון והתמרות השונות על האגליקון (Esen, 1993; Henrissat *et al.* 1995; Czjzek *et al.* 2000).

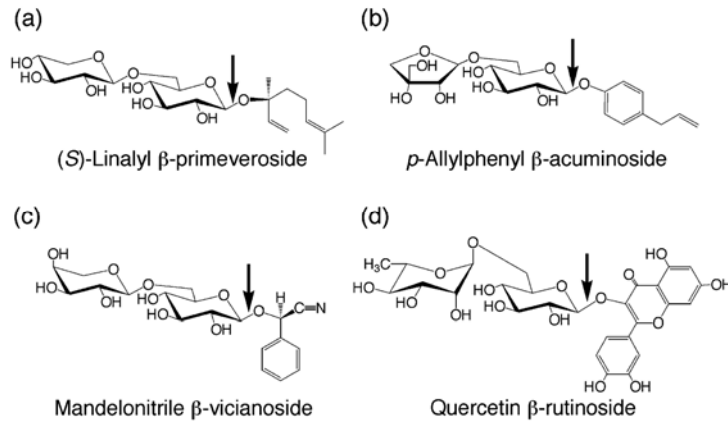
כדי להגיע למסקנות ספציפיות יותר ועל מנת למקד את המחקר בדקתי מאפיינים שונים הנוגעים למבנה והרכב האנטוציאנינים בפרחי הברונפלסיה ואופי ההתמרות הסוכריות על מולקולות אלה. בתהליך בחירת תת משפחת אנזימים ספציפית כמועמדת למעורבות בתהליך הפירוק נלקחו בחשבון תוצאות מספר עבודות קודמות שנעשו במעבדתנו.

אנליזת MS שנעשתה לאנטוציאנינים שהופקו מפרחי הברונפלסיה (Bar-Akiva *et al.* 2010) חשפה את מבנה האנטוציאנינים בפרחים ואת אופי המולקולות המתמרות את האגליקונים הללו. מתוצאות אנליזה זו עלה כי שלושת האנטוציאנינים העיקריים בפרחי הברונפלסיה מותמרים בעמדה 3 של טבעת C של שלד האנטוציאנידין בדו-סוכרים (איור 3). במקרים רבים גליקוזידים המותמרים בדו סוכרים הינם עמידים בפני פירוק על ידי גלוקוזידאזות בודדות שאינן בעלות התמחות בדו סוכרים (Ahn *et al.* 2004). ככל הנראה, דרוש תהליך דו שלבי ועוקב, המזורז על ידי שני אנזימים שונים, להידרוליזה של גליקוזידים אלה (Ahn *et al.* 2004). בשלב הראשון מתבצעת הידרוליזה של הקשר בין שני שתי מולקולות הסוכר ולאחריה אנזים נוסף מפרק את הקשר לאגליקון (Gunata *et al.* 1998).

בניסוי נוסף שנערך במעבדתנו במסגרת עבודת הדוקטורט של איילת בר-עקיבא, נעשתה היברידיזציה בין ציפים מסחריים עליהם הוטבע RNA שמקורו בצמחי תפוח אדמה המשתייך אף הוא למשפחת הסולניים לבין RNA שהופק מפרחי ברונפלסיה מימים 0 ו-1. ניסוי זה נערך במטרה לאתר גנים אשר רמת הביטוי שלהם משתנה במהלך תהליך הפירוק. בניסוי זה נמצאו מאות גנים אשר רמת הביטוי שלהם משתנה במהלך תהליך הפירוק. בסריקת גנים אלה תוך התמקדות בגנים ממשפחת ה- β גלוקוזידאז נמצא גן אחד המשתייך לתת משפחת 1 Glycosyl Hydrolase Family (GH1) אשר ביטוי יורד בין יום 0 ליום 1 בצורה מובהקת. בשל הקרבה הגנטית בין צמחי תפוח אדמה לבין הברונפלסיה השייכים שניהם למשפחת הסולניים וההומולוגיה הגבוהה הקיימת ברמת ה-DNA בגנים ממשפחת ה- β גלוקוזידאז (Henrissat, 1991) ניתן היה להתחיל את בידוד הגן באמצעות תחלים שתוכננו על בסיס הרצף המוטבע על הציפ. מבדיקת מאפייני אנזימים השייכים לתת משפחה זו במגוון צמחים, נמצא כי התמחות ספציפית

של אנזימי GH1 הינה בהידרוליזה ישירה, בשלב אחד, של דו סוכרים מן האגליקון אותו אלו מתמירים בדגש על אופי ההתמרה הסוכרית ולא דווקא על מאפייני האגליקון כמתואר באיור 24.

איור 24: גלוקוזידים דו סוכריים שונים בצמחים המהווים סובסטרטים לאנזימי GH1 (Ahn *et al.* 2004)



תוצאות אלו איפשרו את מיקוד המחקר שלי בגן ספציפי ובשל מאפייני הפעילות האנזימטית של אנזימי תת משפחת GH1 והממצאים לגבי מבנה האנטוציאנינים בפרחי הברונפלסיה הובילו אותי להתמקד בתת משפחה זו במסגרת עבודתי בבחינת מעורבות β גלוקוזידאזות בתהליך פירוק האנטוציאנינים בפרחי הברונפלסיה. כמובן שבטבע קיים מגוון רחב של אנטוציאנינים אשר עליהם התמרות סוכריות שונות ובשל כך יתכן ובתהליך פירוק האנטוציאנינים מעורבים אנזימים שונים ממשפחת ה- β גלוקוזידאז אשר אינם משתייכים לתת משפחת GH1. השערה זו דורשת מחקר עתידי ובידוד גנים נוספים שעלולים להיות מעורבים בתהליך הפירוק.

4.3 אפיון מעורבות האנזים GH1 בתהליך פירוק אנטוציאנין

לאחר הבחירה בתת משפחת אנזימי GH1 מתוך כלל אנזימי ה- β גלוקוזידאזות, והחלטה להתמקד בה כמועמדת אפשרית למעורבות בתהליך פירוק אנטוציאנינים בפרחי הברונפלסיה, בודד גן המסתייך למשפחה מ cDNA אשר מקורו בפרחי ברונפלסיה (איור 10). לאחר בידודו הגן *GHI* רוצף ותורגם (איור 11) אז ננקטו מספר גישות לבחינת מעורבותו בתהליך הפירוק. ראשית, נעשה אפיון ביואינפורמטי לרצף החלבון GH1 המתורגם. מהשוואת הרצף המתורגם באמצעות כלי ה- BLAST באתר ה- NCBI לרצפים אחרים נמצאה הומולוגיה גבוהה (50%-74%) ברמת רצף חומצות האמינו ל- β גלוקוזידאזות רבות אשר קיימות במאגרי המידע. גם בהשוואה ספציפית לרצפי אנזימים מתת משפחת GH1 נמצאה התאמה גבוהה באיזורים שמורים הקיימים בחלבוני GH1. רצף החלבון נבדק לנוכחות סיגנל הכוונה בשל הצפי כי פעילותו מתרחשת בואקואולה התא לשם מועבר האנטוציאנין ונמצא כי אכן בקצה האמיני של החלבון ישנו רצף החשוד כסיגנל הכוונה. על פי האתר SignalP (איור 12, טבלה 6). ממצאת סיגנל הכוונה ברצף ניתן להסיק כי החלבון עתיד להיות מופרש מן הציטוזול אל הרשתית האנדופלסמטית או אל מנגנון הגולג'י ומשם אל מדורים שונים או אל מחוץ לתא (Bendsten *et al.* 2004; Nelson *et al.* 2007).

בהשוואת רצפים של אנזימי β גלוקוזידאז, נמצא כי קיימת הומולוגיה גבוהה לאורך כל הרצף מלבד 30~ חומצות האמינו בקצה האמיני של החלבונים שם נמצאה שונות גבוהה האופיינית לרצפים המהווים סיגנלים שונים להפרשה. בשל ממצאים אלו החלטתי לבחון את מיקומו התוך תאי של החלבון לאחר תרגומו והפרשתו. ישנה בעייתיות בקבלת ביטוי של חלבונים פלורסנטיים בואקואולה בשל ה-pH החומצי השורר בה (Tamura *et al.* 2003) על כן, הניסיון לקביעת המידור התוך תאי נעשה באמצעות השוואה למיקומו התוך תאי של החלבון γ -TIP, אקוופורין הממודר לממברנת הטונופלסט (Saito *et al.* 2002). γ -TIP מהווה סמן אמין לממברנת הטונופלסט המקיפה את הוואקואולה המרכזית הקיימת בתאי צמח בוגרים (Nelson *et al.* 2007). הניסויים לקביעת המידור התוך תאי של החלבון GH1, נעשו על ידי איחוי רצף הגן GH1 לרצף הגן המדווח CFP בקצה הקרבוקסילי של רצף הגן GH1 וביטוי חלבון מאוחה זה בפרוטופלסטים של תאי טבק (איור 15, 14). בניסוי ראשוני אשר נערך נעשתה השוואה בין דפוסי הביטוי של החלבון CFP בפרוטופלסט אליו הוחדר הפלסמיד pSAT המכיל את החלבון CFP בלבד לעומת פרוטופלסט אליו הוחדר פלסמיד זהה המכיל את החלבון המאוחה GH1-CFP (איור 14). תוצאות ניסוי זה העלו כי ישנו שוני בדפוסי הביטוי של החלבון CFP בפרוטופלסטים שנבחנו. בפרוטופלסט המבטא את החלבון CFP בלבד נראה ביטוי של החלבון בגרעין ובציטופלסמה. לעומת זאת, בפרוטופלסט המבטא את החלבון המאוחה GH1-CFP לא נראה ביטוי של CFP בגרעין ודפוס הביטוי שונה במראהו מן בפרוטופלסט המבטא את החלבון CFP בלבד. מהניסוי בו נעשתה השוואה בין דפוס הביטוי של החלבון המאוחה GH1-CFP לזה של החלבון המאוחה γ -TIP-Cherry (איור 15) נמצאה חפיפה חלקית בלבד בדפוס הביטוי. תוצאות ראשוניות אלה לא הניבו תוצאות חד משמעיות אודות מידורו התוך תאי של החלבון. אפשרות נוספת הקיימת לבחינת מידורו התוך תאי של החלבון GH1 בפרט וחלבונים ואקואולריים בכלל הינה מידור ל- (PVCs) pre vacuolar compartments. PVCs הינם אברונים דרכם מתווד מעבר של חלבונים ממנגנון הגולג'י אל הוואקואולה (Miao *et al.* 2008). המידור ל- PVCs יכול להיעשות גם הוא על ידי קו-לוקליזציה מול חלבונים ידועים, עבורם נקבע המידור ל- PVCs. דוגמאות לחלבונים כאלו הן: 2S albumin ו- aleurain אשר בודדו מארבידופסיס ומיקומם התוך תאי נבחן בתרבויות תאי BY2 וארבידופסיס (Miao *et al.* 2008).

מבחינת המידור התוך תאי של מאות β גלוקוזידאזות בארבידופסיס עולה כי רוב חלבוני המשפחה ממודרים לדופן התא וכי אחוז קטן מחלבונים אלו ממודרים לואקואולה (Minic, 2006). על כן, מידור החלבון GH1 לממברנת הטונופלסט תחזק את ההשערה כי החלבון מעורב בתהליך פירוק האנטוציאנינים המצטברים בואקואולה.

כיוון שבפרחי הברונפלסיה ישנו שינוי מהיר בריכוז האנטוציאנינים (בתוך שלושה ימים) הנחתי שיהיה שינוי ברמות הביטוי של גן המעורב בתהליך בקורלציה כלשהי לתהליך הפירוק. השערתי הייתה כי בתחילת תהליך הפירוק (יום 0-1) רמת ביטוי הגן תהיה גבוהה יחסית לרמת ביטוי ביום 3 בו רמת האנטוציאנינים נמוכה מאוד ועיקר תהליך הפירוק כבר התרחש (Vaknin *et al.* 2005). מבחינת פרופיל הביטוי של הגן GH1 (איור 12) נראה כי ישנו ביטוי של הגן בכל שלבי התפתחות פרחי הברונפלסיה, החל מיומיים לפני פתיחת הפרח, בניצן הסגור, עד כשלושה ימים לאחר פתיחת הפרח. עליה מובהקת בביטוי

נראתה מספר שעות לפני פתיחת הפרח ולאחר פתיחת הפרח נראה כי רמת הביטוי הגן הולכת ופוחתת. פרופיל הביטוי זה נמצא בהתאמה לרמות פעילות חלבונים ממשפחת ה- β גלוקוזידאזות שנבחנו ובהתאמה לפרופיל הביטוי של אנזים ממשפחת הפרוקסידאז שנחשד אף הוא במעורבות בתהליך הפירוק. הדמיון בפרופיל הביטוי מחזק את ההשערה כי לשני האנזימים מעורבות בתהליך הפירוק. בנוסף, יתכן אף כי מרווח הזמן בין שיא ביטוי הגן לבין שיא תהליך הפירוק נובע מהצורך לתרגם ולייצר את החלבון ואף מאופי פעילותו. מלימוד תהליכי פירוק שנסקרו בפרק המבוא, אנו משערים כי פעילות אנזימי ה- β גלוקוזידאז הינה שלב התחלתי בתהליך הפירוק וקודמת לפעילותם של אנזימים מחמצנים שונים. המשך שעתוק הגן לאורך כל תהליך הפירוק אף תואמת את הממצא כי התחלת עיכוב פעילות אנזימים ממשפחת ה- β גלוקוזידאז גם כיום לאחר תחילת תהליך הפירוק עדיין גורמת לעיכוב תהליך הפירוק. בשל אופי ריאקציית ה-Real time qPCR, המבדדת פרופיל ביטוי של גן אחד בלבד ותכנון התחלים ששימשו בריאקציה זו מאיזורים שאינם שמורים בקרב אנזימים ממשפחת ה- β גלוקוזידאז, מתחדדת האפשרות כי אכן ישנה מעורבות של *GHI* בתהליך הפירוק. אופי ניסוי זה מנטרל חלקית את ההשערות כי העליה המובהקת בביטוי שעות לפני פתיחת הפרח, נובעת מביטוי אנזימים הקשורים לתהליך פתיחת הפרח עצמו. מטרתו העיקרית של מחקר זה הינה לימוד תהליכי פירוק אנטוציאנינים *in vivo*, בצמח השלם. על כן השלב הבא בעבודתי התמקד בבחינת השפעת שינויים בביטוי הגן *GHI* שבודד מצמח הברונפליסיה בצמח השלם. בשל הקושי הטכני בביצוע טרנספורמציה חולפת בניצן סגור ללא פגיעה ברקמה, ישנה בעייתיות בבחינת גנים אשר מופעלים לפני פתיחת עלי הכותרת ולא ניתן לבצע שינויים כלשהם בביטוי בנקודת זמן מדויקת בשיטה זו. על מנת להתגבר על מכשול ועל מנת ליצור מערכת יעילה של טרנספורמציה קבועה, לבדיקת מספר רב של גנים החשודים במעורבות בתהליך הפירוק, באמצעות השתקה או ביטוי ביתר של גנים, פותחה במעבדתנו מערכת רגנרציה דרך תרביות רקמה של צמח הברונפליסיה (Lieberman et al. 2010). מערכת הטרנספורמציה הקבועה דורשת המשך פיתוח ומחקר ועל כן לא היה באפשרותי להשתמש בה. בשל מגבלה זו בחרתי לבחון את השפעתו של הגן *GHI* במגוון מערכות מודל צמחיות כאשר הדגש בבחירתן הינו בהשתייכותן למשפחת הסולניים ויעילות הטרנספורמציה האפשרית עבורן. המערכות שנבחרו היו: תרבית תאי טבק (*Nicotiana tabacum*) מסוג BY-2, צמחי טבק טרנסגנים המבטאים ביתר את הגן *PAPI* ופרחי פטוניה.

תרבית תאי BY-2 מהווה מערכת נוחה לטרנספורמציה קבועה של גנים ולהמשך תהליך סלקציה במהלך גידול התאים. מערכת זו הינה מערכת נוחה לבדיקת פעילות אנזימטית בשל היכולת "להאכיל" את התאים בסובסטרטים שונים, בהם גם פלבנואידים, הניתנים למיצוי מן התאים לאחר המעבר בתא הצמחי. בשל אי היציבות של אנטוציאנינים שונים, הניסוי נערך על ידי הזנת התאים בפלבנואידים שונים. הפלבנואידים בהם הוזנו התאים היו: שלד ה- Naringenin שהינו חסר התמרה סוכרית כלשהי, Prunin המותמר על ידי מולקולת חד סוכר ו- Naringin עליו ישנה התמרה של דו-סוכר כמתואר באיור 17. בניסוי זה שימשו כביקורות תרבית תאי WT ותאים טרנסגנים שלא הוזנו בפלבנואידים. בדיקת השפעת ביטוי ביתר של הגן *GHI* במערכת זו נעשתה על ידי מיצוי הפלבנואידים מן התאים והפרדתם באמצעות כרומטוגרפיית TLC (איור 18). מבדיקה זו עלה כי לא נראה שינוי בדפוס הריצה, כלומר בהתמרות על הפלבנואידים בעקבות ביטוי ביתר של הגן *GHI* בהשוואה לתאי WT. תוצאה זו יכולה להיות מוסברת

בשל ספציפיות של אנזימים ממשפחת ה- β גלוקוזידאז גם למולקולה המותמרת (איור 24) ולא רק להתמרה הסוכרית (Esen, 1993; Henrissat *et al.* 1995; Czjzek *et al.* 2000). יכול להיות שלאנזים GHI שמקורו מצמח הברונפלסיה אפיניות נמוכה לאגליקונים שאינם אנטוציאנידינים. דפוס הריצה הדומה של הפלבנואידים שהופקו מן התאים שהוזנו ב- Prunin וב-Naringenin ניתן להסביר בכך שבמערכת תאי ה-BY-2 מתרחשת גליקוזילציה באופן טבעי.

פרחי הפטוניה נבחרו לבחינת השפעת ביטוי ביתר של הגן *GHI* באמצעות טרנספורמציה חולפת בשל מספר סיבות כאשר הראשונה שבהן הינה הרכב האנטוציאנינים הדומה לזה של פרחי הברונפלסיה (Ando *et al.* 1999; Bar-Akiva *et al.* 2010). באנטוציאנינים הקיימים בפרחי הפטוניה ישנן התמרות בדו-סוכרים בצורה דומה לזו שבפרחי הברונפלסיה. כמו כן, פרחים אלו עמידים ביחס לפרחי הברונפלסיה ומחזיקים מעמד מספר ימים לאחר הטרנספורמציה ולפני תחילת תהליך ההזדקנות מה שמאפשר מעקב ממושך יותר אחר פנוטיפ אפשרי בפרחים המבטאים ביתר את הגן. כמו כן, בפרחי הפטוניה מסתיימת סינטזת האנטוציאנינים עם פתיחת הפרח. מערכת זו הינה הקרובה והדומה ביותר לפרחי הברונפלסיה ועל כן נבחרה לניסוי זה. בנוסף, בשל הקרבה הפיזיולוגית והדמיון בהרכב האנטוציאנינים נוטרלה ככל האפשר השפעת ספציפיות האנזים לאגליקון או התמרה ספציפיים. במערכת זו נעשתה בדיקת השפעת הביטוי על ידי מיצוי אנטוציאנינים מעלי הכותרת, מאיזורים ספציפיים בהם נראתה פלורסנציה של הגן המדווח *GFP* ששובט אף הוא לפלסמיד המכיל את רצף הגן *GHI*. האנטוציאנינים שמוצו הופרדו באמצעות אנליזת HPLC. כביקורת בניסוי זה שימשו פרחים שעברו טרנספורמציה באמצעות פלסמיד שאינו מכיל את רצף הגן *GHI* אלא רק את רצף הגן המדווח *GFP* על מנת לנטרל את השפעות תהליך הטרנספורמציה עצמו. מבחינת הרכב האנטוציאנינים השונים מתוך סך האנטוציאנינים נראו הבדלים קלים (איור 20). בפרמטר השני שנבדק, כמות האנטוציאנינים ביחס למשקל הרקמה, נמצא כי בפרחים המבטאים ביתר את הגן *GHI* כמות האנטוציאנינים הכוללת נמוכה מזו שבפרחי הביקורת. מאנליזת ה-HPLC למדנו כי לביטוי ביתר של הגן *GHI* ישנה השפעה כלשהי על האנטוציאנינים בפרח אך בשלב הבא יש לערוך אנליזת LCMS על מנת לזהות בדיוק את הרכב האנטוציאנינים ואת השפעת הטרנספורמציה על אופי ההתמרות הסוכריות על שלדי האנטוציאנינים.

צמחי טבק טרנסגניים המבטאים ביתר את פקטור השעתוק *PAPI* הינם בעלי פיגמנטציה מוגברת בגווני סגול ואדום ברקמות הצמח השונות (שורשים, גבעולים, עלווה ופריחה) בשל הגברת מסלול הביוסינטזה של אנטוציאנינים (Borevitz *et al.* 2000). מערכת זו נבחרה לבחינת השפעת ביטוי ביתר של *GHI* בשל מספר גורמים ובהם: בצמחי ארבידופסיס המבטאים ביתר את פקטור השעתוק *PAPI* מתרחש באופן טבעי תהליך של פירוק אנטוציאנינים בתגובה לשינויים בתנאי הסביבה (Rowan *et al.* 2009) ותופעה דומה נראתה במעבדתנו בצמחי טבק המבטאים ביתר את *PAPI*. מבנה האנטוציאנינים דומה לזה של אנטוציאנינים שמקורם בפרחי הברונפלסיה ואף הם מותמרים בדו-סוכרים (Zhou *et al.* 2008). בניגוד לפרחי הפטוניה בהם תהליך סינטזת האנטוציאנינים מסתיים עם פתיחת הפרח, בצמחי *PAPI* ממשיך תהליך ייצור האנטוציאנינים לאורך התפתחות הצמח. הניסוי נערך בצורה דומה לניסוי שנערך בפרחי הפטוניה כאשר הביטוי נעשה באמצעות פלסמיד המכיל את רצף הגן *GHI* ואת הגן המדווח *GFP*

וכביקורת שימשו עליהם הוחדר פלסמיד המכיל רק את רצף הגן המדווח *GFP*. מעלים אלו נעשה מיצוי אנטוציאנינים שעברו הפרדה באמצעות אנליזת HPLC. בניסוי זה לא נראו שינויים מובהקים בהרכב האנטוציאנינים בין עלי הניסוי והביקורת ואף לא היה שינוי משמעותי בתכולת האנטוציאנינים הכוללת (איור 22). הסבר אפשרי לכך הוא השפעת המשך תהליך ביוסינטזת האנטוציאנינים בצמחים אלה.

4.4 סיכום, מסקנות ומחקר עתידי

עבודה זו התמקדה באפיון ובחינת מעורבות של אנזימים ממשפחת ה- β גלוקוזידאז בתהליך הפירוק הפעיל של אנטוציאנינים בפרחי צמח הברונפלסיה. נמצא כי ישנם שינויים ברמת הפעילות של חלבונים ממשפחת ה- β גלוקוזידאז במקביל לתהליך פירוק האנטוציאנין ואף נצפו שינויים ברמת הביטוי של גן ממשפחת ה- β גלוקוזידאז, *GHI* בו התמקדתי במחקר זה. מבחינת המידור התוך תאי של תוצר תרגום הגן *GHI* לא הגעתי לתוצאות חד משמעיות ונדרשת עבודה נוספת על מנת לקבוע בוודאות כי החלבון מופרש לממברנת הטונופלסט או לאברוני ה-PVC הקדם ואקואולריים. המידור אל ממברנת הטונופלסט או אל ה-PVCs יחזק את ההשערה כי החלבון *GHI* פעיל בואקואולת התא ויכול להיות מעורב בתהליך פירוק האנטוציאנינים המצטברים בואקואולה. בחינת השפעת ביטוי ביתר של הגן *GHI* נעשתה בשיטות של ביטוי חולף בצמחי פטוניה וטבק. מתוצאות ניסויים אלה לא ניתן לקבוע בצורה מוחלטת האם לחלבון *GHI* ישנה השפעה כלשהי על תהליך פירוק האנטוציאנינים. מכאן עולה ההשערה כי יצירת צמחים טרנסגניים המבטאים ביתר את הגן *GHI* הינה המשך הגיוני לניסויים שנערכו ותוכל לבסס את מידת מעורבותו של החלבון *GHI* בתהליך הפירוק. ביטוי ביתר של *GHI* במערכות שונות כדוגמת חיידקים, שמרים או פרוטופלסטים מהם ניתן יהיה להפיק את החלבון בכמות גבוהה יכול לשמש ככלי לבחינת פעילות החלבון *in vitro* על ידי מיצוי החלבון ובחינת השפעתו על אנטוציאנינים שונים. כמו כן, פיתוח מערכת הרגנרציה בצמח הברונפלסיה תאפשר יצירת צמחי ברונפלסיה טרנסגניים לבחינת השפעת ביטוי ביתר או השתקה של הגן *GHI* וגנים נוספים על תהליך פירוק האנטוציאנינים בפרחי הברונפלסיה עצמם ולא במערכות מודל.

- שחר ל (2007) מעורבות פראוקסידאזות בפירוק אנטוציאנינים בפרח הברונפלסיה. עבודת גמר אשר הוגשה לפקולטה לחקלאות של האוניברסיטה העברית בירושלים.
- Ahn YO, Mizutani M, Saino H, Sakata K (2004) Furcatin Hydrolase from *Viburnum furcatum* blume is a novel disaccharide-specific acuminosidase in glycosyl hydrolase family 1. *J. Biol. Chem.* 279:23405–23414.
- Alfenito MR, Souer E, Goodman CD, Buell R, Mol J, Koes R, Walbot V (1998) Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *Plant Cell.* 10:1135-1149.
- Alcalde-Eon C, Saavedra G, de Pascual-Teresa S, Rivas-Gonzalo JC (2004) Identification of anthocyanins of pinta boca (*Solanum stenotomum*) tubers. *Food Chem.* 86:441–448
- Allan AC, Hellens RP, Laing WA (2008) MYB transcription factors that colour our fruit. *Trends Plant Sci.* 13:99–102.
- Ando T, Saito N, Tatsuzawa F, Kakefuda T, Yamakage K, Ohtani E, Koshi-ishi M, Matsusake Y, Kokubun H, Watanabe H, Tsukamoto T, Ueda Y, Hashimoto G, Marchesi E, Asakura K, Hara R, Seki H (1999) Floral anthocyanins in wild taxa of *Petunia* (Solanaceae). *Biochem. Sys. Ecol.* 27:623-650.
- Babcock GD and Esen A (1994) Substrate specificity of maize B-glucosidase. *Plant Sci.* 101:31-39.
- Bar-Akiva A, Ovadia R, Rogachev I, Bar-Or C, Bar E, Freiman Z, Nissim-Levi A, Gollop N, Lewinsohn E, Aharoni A, Weiss D, Koltai H, Oren-Shamir M (2010) Metabolic networking in *Brunfelsia calycina* petals after flower opening. *J. Exp. Bot.* 61: 1393–1403.
- Barbagallo RN, Palmeri R, Fabiano S, Rapisarda P, Spagna G (2007) Characteristic of β glucosidase from Sicilian blood oranges in relation to anthocyanin degradation. *Enzyme Microb. Technol.* 41: 570–575.
- Ben Zvi MM, Florence NZ, Masci T, Ovadis M, Shklarman E, Ben-Meir H, Tzfira T, Dudareva N, Vainstein A (2008) Interlinking showy traits: co-engineering of scent and colour biosynthesis in flowers. *Plant Biotechnol. J.* 6:403–415.
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijng G, Brunak, S (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340:783-95.
- Bolte S and Cordelières FP (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* 224:213-232.

- Borevitz JO, Xia Y, Blount J, Dixon RA, Lamb C (2000) Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell*. 12: 2383–2393.
- Borovsky Y, Oren-Shamir M, Ovadia R, De Jong W, Paran I (2004) The A locus that controls anthocyanin accumulation in pepper encodes a MYB transcription factor homologous to Anthocyanin2 of petunia. *Theor. Appl. Genet.* 109:23–29.
- Bradley JM, Rains SR, Manson JL, Davies KM (2000) Flower pattern stability in genetically modified lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) under commercial growing conditions. *N. Z. J. Crop Hortic. Sci.* 28:175–184.
- Butelli E, Titta L, Giorgio M, Mock HP, Matros A, Peterek S, Schijlen E, Hall RD, Bovy AG, Luo J, Martin C (2008) Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nat. Biotechnol.* 26:1301–1308.
- Chaim AB, Borovsky Y, De Jong W, Paran I (2003) Linkage of the A locus for the presence of anthocyanin and fs10.1, a major fruit-shape QTL in pepper. *Theor. Appl. Genet.* 106:889–894.
- Calderon AA, Garcia-Florenciano E, Munoz R, Ros Barceló A (1992) Gamay grapevine peroxidase: its role in vacuolar anthocyanidin degradation. *Vitis*. 31:139-147.
- Campos N, Bako L, Feldwisch J, Schell J, Palme K (1992). A protein from maize labeled with azido-IAA has novel β glucosidase activity. *Plant J.* 2:675-684.
- Chalker-Scott L (1999) Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses *Photochem. Photobiol.* 70:1–9.
- Chang S, Puryear J, Cairney J (1993) A simple and efficient method for isolation RNA from Paie trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11:113-116.
- Close DC and Beadle CL (2003) The ecophysiology of foliar anthocyanin. *Bot. Rev.* 69:149–161.
- Czjzek M, Cicek M, Zamboni V, Burmeister WP, Bevan DR, Henrissat B, Esen A (2000) The mechanism of substrate (aglycone) specificity in β -glucosidases is revealed by crystal structures of mutant maize β -glucosidase-DIMBOA, -DIMBOAGlc, and -dhurrin complexes. *PNAS*. 97:13555-13560.
- Davies KM (2004) An introduction to plant pigments in biology and commerce in: Davies KM (Ed.) *Plant Pigments and Their Manipulation*. Blackwell Publishing, Oxford, UK. 14:1-22.
- de Vlaming JEM, Vaneekeres H, Wiering A (1982) Gene for flower color fading in *Petunia hybrida*. *Theor. Appl. Genet.* 61:41–46.

- Debeaujon I, Peeters AJ, Leon-Kloosterziel KM, Koornneef M (2001) The TRANSPARENT TESTA12 gene of *Arabidopsis* encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. *Plant Cell*. 13:853-871.
- Dixon DP, Skipsey M, Edwards R (2010) Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry*. 71:338–350.
- Dougall DK and Vogelien DL (1987) The stability of accumulated anthocyanin in suspension-cultures of the parental line and high and low accumulating subclones of wild carrot. *Plant. Cell. Tiss. Organ. Cult.* 8:113–123.
- Dower WG (1990) Electroporation of bacteria: a general approach to genetic transformation in: Setlow JK (Ed.) Genetic Engineering-Principales and Methods. *Plenum Press, NY, USA*. 12:275-296.
- Draper J, Scott R, Armitage P, Walden R (1988) Plant Genetic Transformation and Gene Expression: A Laboratory Manual. *Blackwell Publishing, Oxford, UK*.
- Emanuelsson O and von Heijne G (2001) Prediction of organellar targeting signals. *Biochim. Biophys. Acta*. 1541:114–119.
- Esen A (1993) β -glucosidases overview in: Esen A (Ed.) β -glucosidases: Biochemistry and Molecular Biology. *American Chemical Society, Washington, USA*. 1-14.
- Fromm M, Taylor LP, Walbot V (1985) *PNAS*. 82:5824–5828.
- Geerlings A, Martinez-Lozano Ibañez M, Memelink J, van der Heijden R, Verpoorte R (2000) Molecular cloning and analysis of strictosidine β -D-Glucosidase, an enzyme in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *J. Biol. Chem.* 275:3051–3056.
- Goodman CD, Casati P, Walbot V (2004) A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*. *Plant Cell*. 16:1812-1826.
- Goto T (1987) Structure, stability and color variation of natural anthocyanins. *Prog. Chem. Organ. Nat. Prod.* 52:113.
- Grotewold E, Chamberlin M, Snook M, Siame B, Butler L, Swenson J, Maddock S, Clair GS, Bowen B (1998) Engineering secondary metabolism in maize cells by ectopic expression of transcription factors. *Plant Cell*. 10:721-740.
- Grotewold E (2006) The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:761–780.
- Grotewold E, Davies KM (2008) Trafficking and sequestration of anthocyanins. *Nat Prod. Commun.* 3:1251-1258.

- Gunata Z, Blondeel C, Vallier MJ, Lepoutre JP, Sapis JC, Watanabe, N (1998) An endoglycosidase from grape berry skin of Cv. *M. Alexandria* hydrolyzing potentially aromatic disaccharide glycosides. *J. Agric. Food Chem.* 46:2748–2753.
- Heide OM (1963) Effect of temperature and day-length on flower initiation of *Brunfelsia calycina* (Hook) Benth. *Physiol. Plantarum.* 16:104–109.
- Henrissat B (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280:309-316.
- Henrissat B and Bairoch A (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293:781-788.
- Henrissat B, Callebaut I, Fabrega S, Lehn P, Mornont JP, Davies G (1995) Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *PNAS.* 92: 7090-7094.
- Holton TA and Cornish EC (1995) Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell.* 7:1071-1083.
- Huang HT (1955) Fruit destruction, Decolorization of anthocyanins by fungal enzymes. *J. Agri. Food Chem.* 3: 141-146.
- Hughes NM, Morley CB, Smith WK (2007) Coordination of anthocyanin decline and photosynthetic maturation in juvenile leaves of three deciduous tree species. *New Phytol.* 175:675–685.
- Huysamer M (1998) Report of the blushed pear workgroup: Perceptions, facts and questions presented at: Proceedings of the Cape Pomol. Assn. Tech. Symp. *Cape Town, South Africa.* 187-192.
- Jabeen R, Yamada K, Shigemori H, Hasegawa T, Hara M, Kuboi T, Hasegawa K (2006) Induction of β -glucosidase activity in maize coleoptiles by blue light illumination *J. Plant Physiol.* 163:538—545.
- Jauh GY, Phillips TE, JC Rogers (1999) Tonoplast Intrinsic Protein Isoforms as Markers for Vacuolar Functions. *Plant Cell.* 11:1867–1882.
- Jonsson LMV, Donker Koopman WE, Schram AW (1984) Turnover of anthocyanins and tissue compartmentation of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Petunia hybrida*. *J. Plant Physiol.* 115:29–37.
- Jiang YM (2000) Role of anthocyanins, polyphenol oxidase and phenols in lychee pericarp browning. *J. Sci. Food. Agric.* 80:305-310.
- Jiang YM, Duan XW, Joyce D, Zhang ZQ, Li JR (2004) Advances in understanding of enzymatic browning in harvested litchi fruit. *Food Chem.* 88:443–446.

- Kitamura S, Shikazono N, Tanaka A (2004) TRANSPARENT TESTA 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in Arabidopsis. *Plant J.* 37:104-114.
- Kitamura S (2006) Transport of flavonoids in: Grotewold (Ed.) The Science of Flavonoids. Springer Science, NY, USA. 123-146.
- Larsen ES, Alfenito MR, Briggs WR, Walbot V (2003) A carnation anthocyanin mutant is complemented by the glutathione S-transferases encoded by maize Bz2 and petunia An9. *Plant Cell Rep.* 21:900-904.
- Lewinsohn E, Berman E, Mazur Y, Gressel J (1986) Glucosylation of exogenous flavanones by grapefruit (*Citrus paradisi*) cell cultures. *Phytochem.* 25:2531–2535.
- Liberman R, Shahar L, Nissim-Levi A, Evenor D, Reuveni M, Oren-Shamir M (2010) Shoot regeneration from leaf explants of *Brunfelsia calycina*. *Plant. Cell. Tiss. Organ. Cult.* 100:345-348.
- Lin Y, Irani NG, Grotewold E (2003) Sub-cellular trafficking of phytochemicals explored using auto-fluorescent compounds in maize cells. *BMC Plant Biol.* 3:10.
- Manzanares P, Rojas V, Genoves S, Valles S (2000) A preliminary search for anthocyanin- β -D-glucosidase activity in non-Saccharomyces wine yeasts. *Inter. J. Food Sci. Technol.* 35: 95-103.
- Markham KR and Ofman DJ (1993) Lisianthus flavonoid pigments and factors influencing their expression in flower colour. *Phytochemistry* 34:679–685.
- Markham KR, Gould KS, Winefield CS, Mitchell KA, Bloor SJ, Boase MR (2000) Anthocyanic vacuolar inclusions - their nature and significance in flower colouration. *Phytochemistry.* 55:327-336.
- Marrs KA, Alfenito MR, Lloyd AM, Walbot V (1995) A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene Bronze-2. *Nature.* 375:397-400.
- Mazza G and Miniati E (1993) Color stabilization and intensification in: Mazza G and Miniati E (Eds.) Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains. CRC Press, Boca Raton, FL. 1–20.
- Miao Y, Li KY, Li H, Yao X, Jiang L (2008) The vacuolar transport of aleurain-GFP and 2S albumin-GFP fusions is mediated by the same pre-vacuolar compartments in tobacco BY-2 and Arabidopsis suspension cultured cells. *Plant J.* 56:824-839.
- Minic Z (2008) Physiological roles of plant glycoside hydrolases. *Planta.* 227:723–740.

- Mizutani M, Nakanishi H, Ema JI, Ma SJ, Noguchi E, Inohara-Ochiai M, Fukuchi-Mizutani M, Nakao M, Sakata K (2002) Cloning of β -Primeverosidase from tea leaves, a key enzyme in tea aroma formation. *Plant Physiol.* 130:2164–2176.
- Mol J, Grotewold E, Koes R (1998) How genes paint flowers and seeds. *Trends Plant Sci.* 3:212-217.
- Mueller LA, Goodman CD, Silady RA, Walbot V (2000). AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiol.* 123:1561-1570.
- Nakai K and Horton P (2007) Computational prediction of subcellular localization in: van der Giezen M (Ed.) Protein Targeting Protocols. *Humana Press, NJ, USA.* 29:429-466.
- Nelson BK, Cai X, Nebenführ A (2007) A multicolored set of *in vivo* organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *Plant J.* (2007) 51:1126–1136.
- Nissim-Levi A, Kagan S, Ovadia R, Oren-Shamir M. (2003) Effects of temperature, UV light and magnesium on anthocyanin pigmentation in cocoplum leaves. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 78:61–64.
- Nissim-Levi A, Liberman R, Bar-Akiva A, Shahar L, Gaba V, Oren-Shamir M (2010) Transient transformation of *Brunfelsia calycina* flowers. *Plant. Cell. Tiss. Organ. Cult.* (submitted).
- Nozue M, Kubo H, Nishimura M, Katou A, Hattori C, Usuda N, Nagata T, Yasuda H (1993) Characterization of intravacuolar pigmented structures in anthocyanin-containing cells of sweet-potato suspension-cultures. *Plant Cell Physiol.* 34:803-808.
- Ogawa K, Ijima Y, Guo W, Watanabe N, Usui T, Dong S, Tong Q, Sakata K (1997) Purification of a β -Primeverosidase concerned with alcoholic aroma formation in tea leaves (Cv. Shuixian) to be processed to oolong tea. *J. Agric. Food Chem.* 45: 877–882.
- Opassiri R, Pomthong B, Onkoksoong T, Akiyama T, Esen A, Ketudat Cairns JR (2006) Analysis of rice glycosyl hydrolase family 1 and expression of Os4bglu12 β -glucosidase. *BMC Plant Biol.* 6:33.
- Oren-Shamir M and Nissim-Levi A (1999) Temperature and gibberellin effects on growth and anthocyanin pigmentation in Photinia leaves. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 74:355–360.
- Oren-Shamir M (2009) Does anthocyanin degradation play a significant role in determining pigment concentration in plants? *Plant Sci.* 177:310–316.
- Pourcel L, Irani NG, Lu Y, Riedl K, Schwartz S, Grotewold E (2009) The formation of anthocyanic vacuolar inclusions in *Arabidopsis thaliana* and implications for the sequestration of anthocyanin pigments. *Mol. Plant.* 3:78-90.

- Quattrocchio F, Verweij W, Kroon A, Spelt C, Mol J, Koes R (2006) PH4 of petunia is an R2R3 MYB protein that activates vacuolar acidification through interactions with basic-helix-loop-helix transcription factors of the anthocyanin pathway. *Plant Cell*. 18:1274–1291.
- Reuveni M, Sagi Z, Evmor D, Hetzroni A. (1999) β -Glucosidases activity is involved in scent production in *Narcissus* flowers. *Plant Sci*. 147:19-24.
- Rodriguez ME, Lopes CA, Broock M, Valles S, Ramon D, Caballero AC (2004) Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activities. *J. App. Microbiol*. 96:84–95.
- Rowan DD, Cao MS, Lin-Wang K, Cooney JM, Jensen DJ, Austin PT, Hunt MB, Norling C, Hellens RP, Schaffer RJ, Allan AC (2009) Environmental regulation of leaf colour in red 35S:PAP1 *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*. 182:102–115.
- Saito C, Ueda T, Abe H, Wada Y, Kuroiwa T, Hisada A, Furuya M, Nakano, A (2002) A complex and mobile structure forms a distinct subregion within the continuous vacuolar membrane in young cotyledons of *Arabidopsis*. *Plant J*. 29:245–255.
- Sakamura S and Obata Y (1961) Anthocyanase and anthocyanins occurring in eggplant, *Solanum melongena*. *Agric.Biol. Chem*. 25:750–756.
- Sánchez-Torres P, Gonzalez-Candelas L, Ramon D (1998) Heterologous expression of a *Candida molischiana* anthocyanin- β -glucosidase in a wine yeast strain. *J. Agric. Food Chem*. 46:354-360.
- Simpson KL, Lee TC, Rodrigue JH, Chichester CO (1976) Metabolism in senescent and stored tissues in: Goodwin TW (Ed.) Chemistry and Biochemistry of Plant Pigment. *Academic Press, NY, USA*. 780-842.
- Steyn WJ, Wand SJE, Holcroft DM, Jacobs G (2002) Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytol*. 155:349–361.
- Sugawara T and Igarashi K (2008) Cultivar variation and anthocyanins and rutin content in sweet cherries (*Prunus avium* L.), *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol*. 55:239–244.
- Suntornwat O and Koocharoensap S (2005) β -Glucosidase Activity and Scent Production in Some Flowers presented at: III WOCMAP Congress on Medicinal and Aromatic Plants - Quality, Efficacy, Safety, Processing and Trade in Medicinal and Aromatic Plants. *ISHS Acta Horticulturae* 679.
- Suzuki H, Takahashi S, Watanabe R, Fukushima Y, Fujita N, Noguchi A, Yokoyama R, Nishitani, K, Nishino T, Nakayama T (2006) An isoflavone conjugate-hydrolyzing β -

- glucosidase from the roots of soybean (*Glycine max*) seedlings. *J. Biol. Chem.* 281:30251–30259.
- Tamura K, Shimada T, Ono E, Tanaka Y, Nagatani A, Higashi SI, Watanabe M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2003) Why green fluorescent fusion proteins have not been observed in the vacuoles of higher plants. *Plant J.* 35:545–555.
- Tanaka Y, Sasaki A, Ohmiya A (2008a) Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J.* 54:733–749.
- Tanaka Y and Ohmiya A (2008b) Seeing is believing: engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19: 190–197.
- Tzfira T, Tian G, Lacroix B, Vyas S, Li J, Leitner-Dagan Y, Krichevsky A, Taylor T, Vainstein A, Citovsky V (2005) pSAT vectors: a modular series of plasmids for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants. *Plant Mol. Biol.* 57:503–516.
- Vaknin H, Bar-Akiva A, Ovadia R, Nissim-Levi A, Forer I, Weiss D, Oren-Shamir M (2005) Active anthocyanin degradation in *Brunfelsia calycina* (Yesterday–Today–Tomorrow) flowers. *Planta.* 222: 19–26.
- van Tilbeurgh H, Loontjens FG, De Bruyne CK, Claeysens M (1988) Fluorogenic and chromogenic glycosides as substrates and ligands of carbohydrases. *Methods Enzymol.* 160: 45–59.
- Verweij W, Spelt C, Di Sansebastiano GP, Vermeer J, Reale L, Ferranti F, Koes R, Quattrocchio F (2008) An H⁺ P-ATPase on the tonoplast determines vacuolar pH and flower colour. *Nat. Cell Biol.* 10:1456–1462.
- Wang H, Cao G, Prior RL (1996) Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.* 44:701–505.
- Wang H, Cao G, Prior RL (1997) Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 45:304–309.
- Watanabe N, Watanabe S, Nakajima R, Moon JH, Shimokihara K, Inagaki J, Etoh H, Asai T, Sakata K, Kazuo I (1993) Formation of flower fragrance compounds from their precursors by enzymic action during flower opening. *Biosc. Biotech. Biochem.* 57:1101–1106.
- Winkel-Shirley B (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:218–223.
- Wirth J, Guo W, Baumes R, Gunata Z (2001) Volatile compounds released by enzymatic hydrolysis of glycoconjugates of leaves and grape berries from *Vitis vinifera* muscat of alexandria and shiraz cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 49:2917–2923.

- Yap YM, Loh CS, Ong BL (2008) Regulation of flower development in *Dendrobium crumenatum* by changes in carbohydrate contents, water status and cell wall metabolism. *Sci. Hort.* 119:59–66.
- Yasuda T and Nakagawa H (1994) Purification and characterization of the rutin-degrading enzymes in tartary buckwheat seeds. *Phytochemistry.* 37:133–136.
- Yu O, Matsuno M, Subramanian S (2006) Flavonoid Compounds in Flowers: Genetics and Biochemistry in: Teixeira da Silva JA (Ed.) Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology. *Global Science Books, UK.* 1:282-292.
- Zapata JM, Calderon AA, Munoz R, Ros Barceló A (1992) Oxidation of natural hydroxybenzoic acids by grapevine peroxidases: kinetic characteristics and substrate specificity. *Am. J. Enol. Viticult.* 43:134-138.
- Zhang H, Wang L, Deroles S, Bennett R, Davies K (2006) New insight into the structures and formation of anthocyanic vacuolar inclusions in flower petals. *BMC Plant Biol.* 6:29.
- Zhang JJ and Watkins CB (2005) Fruit quality, fermentation products, and activities of associated enzymes during elevated CO₂ treatment of strawberry fruit at high and low temperatures. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 130: 124-130.
- Zhang Z, Pang X, Ji Z, Jiang Y (2001) Role of anthocyanin degradation in litchi pericarp browning. *Food Chem.* 75: 217-221.
- Zheng XL and Tian SP (2006) Effect of oxalic acid on control of postharvest browning of litchi fruit, *Food Chem.* 96:519–523.
- Zhou L, Zeng H, Shi M, Xie D (2008) Development of tobacco callus cultures over expressing Arabidopsis PAP1/MYB75 transcription factor and characterization of anthocyanin biosynthesis. *Planta.* 229:37–51.