

**מטבוליזם סוכרוז בפרי ההדר:  
ביטוי אינברטאז בשקיקי המיץ**

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

מאת

עדי מונדשיין

עבודה זו נעשתה בהדרכת:

ד"ר אבי צדקה, מהמחלקה למטעים, הקריה למחקר חקלאי, בית דגן.  
ופרופ' אליעזר גולדשמידט, מהמכון למדעי הצמח וגנטיקה, הפקולטה למדעי  
החקלאות, המזון ואיכות הסביבה של האוניברסיטה העברית בירושלים.

## תודה

לד"ר אבי צדקה על ההכוונה, ההשקעה וההדרכה הצמודה לאורך כל הדרך,  
לפרופ' אליעזר גולדשמידט ולפרופ' רפי גורן על העזרה והייעוץ,  
לגב' מילה שליזרמן על העזרה הרבה, לנפתלי צור ולכל שאר חברי המעבדה.  
תודה לכל אותם רבים שעזרו לי במהלך העבודה – ד"ר משה ראובני,  
ד"ר ארתור שפר ואנשי מעבדתו, פרופ' אדוארדו בלומוולד ואנשי מעבדתו .

תודה מיוחדת להורי סימה ואברהם, על התמיכה ועל העזרה הרבה.

## -תוכן העניינים-

א-ב	.....	תקציר	i
1-3	.....	מבוא	ii
4	.....	מטרות העבודה	iii
5-28	.....	סקירת סיפרות	iv
5	.....	א. מבנה פרי ההדר	
6	.....	ב. איכות פרי ההדר	
6	.....	ג. הרכב המוצקים המסיסים בפרי ההדר	
7	.....	ד. יתרונות אגירת סוכרוז	
7-20	.....	ה. פעילות המבלע כאתר בקרה בהובלת וחלוקת המוטמעים	
21-28	.....	ו. אינברטאז חומצי	
29-37	.....	שיטות וחומרים	v
29	.....	1. חומר צמחי	
29	.....	2. סריקת סיפריית cDNA	
29-31	.....	3. מיצוי חלבונים	
31-32	.....	4. הרצת מיצוי החלבונים בגיל	
32	.....	5. נוגדנים כנגד אינברטאז חומצי	
33	.....	6. הגבת הנוגדנים כנגד Inv1 ו-Inv2 עם Western Blot	
34-35	.....	7. מידור האינברטאז החומצי	
35-36	.....	8. אנליזת RNA	
37	.....	9. פעילות אינברטאז בגיל	
38-68	.....	תוצאות	vi
38-39	.....	1. בידוד הגנים Inv1 ו-Inv2	
40-54	.....	2. שימוש בנוגדנים ספציפיים למיקום אנזימי Inv1 ו-Inv2 בתאי שקיקי המיץ	
55-68	.....	3. מעקב אחרי רמת ה-mRNA, החלבון והפעילות של האינברטאז החומצי	
69-76	.....	דיון	vii
69-71	.....	1) המיקום התוך תאי של אינברטאז בפירות הדר	
71-72	.....	2) בקרה ברמת השעתוק (mRNA) של האינברטאז בפרי	
73-74	.....	3) חוסר התאמה בין רמת החלבונים ופעילות Inv1 ו-Inv2	
74-76	.....	4) המנגנון המטבולי להובלה ואגירה של סוכרוז	
IV-XIII	.....	מקורות	viii
I-III	.....	Abstract	ix

## -תקציר-

המדד העיקרי לקביעת איכות הפרי בהדרים הינו היחס בין אחוז הסוכרים לאחוז החומצה, האופייניים לכל זן, כאשר יחס זה משקף את טעם הפרי. לכן חשוב לבחון את השפעת פעילות האנזימים המשתתפים במטבוליזם של הסוכרים על הרכב המיץ ומהלך הצטברות הסוכרים בפירות. במחקר זה הוחלט להתמקד במשפחת אנזימי האינברטאז, האחראית על הידרוליזת הסוכרוז לגלוקוז וסוכרוז בתגובה בלתי הפיכה, במהלכה אובדת האנרגיה של הקשר הגליקוזידי. פרוק הסוכרוז משפיע ישירות על היכולת לייבא מוטמעים אל שקיקי המיץ ובכך קובע את חוזק המבלע שלהם.

בשלב ראשון נלמדה המערכת האנזימטית הקשורה למטבוליזם של סוכרוז במהלך התפתחות התפוז הטבורי (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck), בדגש על הבנת תפקיד הגנים ממשפחת האינברטאז. במהלך עבודה מוקדמת, לחיפוש גנים ממשפחת האינברטאז המתבטאים בספריית ציפה של תפוז טבורי, בודדו ורוצפו שני שבטים - Inv1 ו-Inv2, שהראו הומולוגיה לאינברטאז חומצי מסיס. אך לא נמצאו שבטים המראים הומולוגיה לאינברטאז קשור לדופן, בסיפריה שהופקה מציפת הפרי. גם בחיפוש במאגרי מידע, לא נמצאו שבטי אינברטאז קשור בסיפירות של שקיקי מיץ הדר. על כן הוחלט לבדוק לעומק את ביטוי שני השבטים הנ"ל וכן לבחון את האפשרות, לכך שהם מקודדים לאנזימים הממוקמים גם בדופן.

בעבודה זו נבדקו ארבעה זנים שונים של פירות הדר, בעלי אופן צבירת סוכרים שונה: קליף מזן אור-1 (*Citrus reticulata* x temple) ותפוז טבורי (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck), בהם מגיעים הסוכרים בהבשלה לכדי 75% עד 80% מכלל המוצקים המסיסים. והסוכרים העיקריים במיץ הם גלוקוז, פרוקטוז וסוכרוז ביחס 1:1:2, בהתאמה. לעומת יחס שונה בזנים האחרים: בלימטה המתוקה (*Citrus limmetioides*), 6:6:1, ובלימון החמוץ (*Citrus limon* [L.] Burm), 3:3:1 בהתאמה. בהם הסוכרים מהווים רק 20% מכמות המוצקים המסיסים.

סריקת ספריית cDNA משקיקי מיץ של פרי לימון, בעזרת גלאים שהופקו מהשבטים שבודדו בתפוז טבורי, העלתה התאמה גבוהה ביותר בין הרצפים של Inv1 משני פירות ההדר השונים. מתוך הנחה כי מידת השונות בין זני ההדרים השונים זניחה, הוחלט לבדוק את ביטוי הגנים לאינברטאז החומצי בזני ההדרים השונים.

כדי לבחון את הבקרה על ביטוי השבטים, נמדדה רמת השעתוק (mRNA) של האינברטאז בפרי. נמצא דמיון רב בדגם הביטוי של שני האיזו-אנזימים לאינברטאז. ודגם שונה בין הזנים שנבדקו, כאשר באור-1 ובתפוז הטבורי נצפה שיא ברמת ה-mRNA בשלבי הפרי הצעיר. בלימטה עולה רמת תוצרי השעתוק לאורך ההתפתחות עד לשיא בפרי בוגר. בלימון נצפתה רמת mRNA חלשה במהלך כל שלבי התפתחות הפרי, ביחס ליתר זני הפירות. מוצע כאן, לראשונה, כי יתכן שהחומצה הציטרית, שנצברת ביחס הפוך לרמת תוצרי השעתוק לאינברטאז, מהווה מעכב לביטוי.

E. פפטידים נבחרים מ-Inv1 ומ-Inv2 בוטאו בחיידקים וכנגדם הופקו נוגדנים במעבדתו של פרופ' E. Blumwald. בנוגדנים אלה נעשה שימוש כדי ללמוד על ביטויים ופעילותם של תוצרי השבטים שבודדו בשלבי התפתחות שונים של התפוז הטבורי, אור-1, לימטה ולימון. בכל אחד מהזנים השונים, הושווה רמת ה-mRNA, לכמות החלבונים המשוקלת של האינברטאז המסיס שנמצאה ב-immunoblot. נמצאה התאמה גבוהה בפרי אור-1, לימטה ולימון. יוצא מן הכלל הוא התפוז הטבורי, בו ישנה עליה בכמות החלבונים המזוהים על ידי נוגדני Inv1 עם התבגרות הפרי, בעוד רמת ה-RNA דווקא יורדת. ואילו ב-Inv2 דווקא בשלבים המוקדמים, כאשר רמת ה-RNA בשיאה, נראית ירידה בכמות החלבון המשוקלל. מכך ניתן להסיק, מבחינה איכותית, כי כמות חלבוני האינברטאז מבוקרת ברמת השעתוק של שני השבטים, בזנים אור-1, לימטה ולימון. לעומת זאת, כנראה, שבתפוז הטבורי הבקרה אינה נעשית ברמה זו אלא באופן פוסט – שעתוקי (post-transcriptional).

משקלם המולקולרי של חלבוני האינברטאז, שזוהו על ידי הנוגדנים, נקבע בפס העיקרי המופיע ב-74kDa וב-76kDa לגבי Inv1 ו-Inv2 בהתאמה. בנוסף נמצאו חלבונים אחדים בעלי משקל מולקולרי נמוך יותר (42kDa, 47kDa, 55kDa) ואף קטנים מכך). יש להניח שאלה הם תוצרי פירוק, לא פעילים, של החלבון השלם. כיוון שפעילות נצפתה רק באיזורים בהם נמצאו חלבונים הקרובים למשקל הגבוה. בדומה לתוצאות שהוצגו בעבודות קודמות, גם כאן מאובחנת פעילות אינברטאז גבוהה בשלבים המוקדמים של הפרי בכל הזנים שנבדקו. הפעילות אינה תואמת את רמת ה-mRNA ואת כמות החלבון המשוקלל, על כן נראה כי ההבדלים בפעילות נובעים משינויים בחלבון עצמו. עובדה זו מחזקת את האפשרות שאיבוד הפעילות של אינברטאז חומצי מסיס בפירות הדר הוא תהליך התפתחותי המתרחש כתוצאה משינוי בתנאי הסביבה בחללית.

בעזרת הנוגדנים כנגד Inv1 ו-Inv2 נבחנו מיקומם של תוצרי השבטים בשתי שיטות שונות. באמצעות הפרדת החלבונים שהופקו לפרקציה מסיסה וקשורה, נמצא כי חלבוני האינברטאז אכן קיימים גם בפרקציה הקשורה לדופן התאים של שקיקי מיץ מתפוז הטבורי ואור-1. בנוסף מוקמו חלבוני Inv1 ו-Inv2 גם בעזרת שיטת האימונוולוקליזציה, בחתכים שנלקחו משקיקי מיץ של תפוז טבורי בשני שלבים התפתחותיים – פרי צעיר ובוגר. זאת בעזרת שתי שיטות שונות, בשימוש במיקרוסקופ אור חודר וכן במיקרוסקופ קונפוקאלי, שהראו כי הסימון ל-Inv1 ו-Inv2 אכן נראה בדופן התא, בעיקר בפרי הבוגר.

בעבר הוצע מנגנון של פרוק וסינתזה מחדש של סוכרוז ברקמות הסמוכות למערכת ההובלה. תוצאות מחקר זה מאששות קיום מנגנון זה גם בתאי שקיקי המיץ המרוחקים מאתרי הפריקה מהשיפה. על פי המנגנון, הסוכרוז יכול לעבור בין תאי המבלע בצורה אפופלסטית, באפופלסט הוא מפורק להקסוזות על ידי אינברטאז חומצי הקשור לדופן התא. תוצרי הפרוק נקלטים לציטופלסמה, שם הם מסונתזים מחדש לסוכרוז על ידי סוכרוז פוספט סינתז, והסוכרוז שמתקבל נאגר בחללית בהעדר פעילות אינברטאז חומצי מסיס. נראה כי שילוב של מספר מרכיבים הקיימים בתפוז הטבורי וב-אור-1 וחסרים בלימטה המתוקה והלימון החמוץ, מאפשרים לתפוז הטבורי ואור-1 לצבור סוכרוז במהלך התפתחות הפרי. על כן, משיקולים אוסמוטיים, הם מסוגלים לאגור מוצקים מסיסים בריכוז גבוה.

## -מבוא-

אחד התהליכים המטאבוליים החשובים, לאורך כל שלבי האגירה והובלת המוצקים המסיסים לפרי, קשור לבניה ופירוק סוכרוז. הסוכרוז  $\alpha$ -glucopyranosyl-  $\beta$ -D-fructofuranoside מתקבל לאחר הפוטוסינתזה ומועבר ממקום הווצרותו העיקרי בעלים לכל חלקי הצמח. סוכרוז גם נוצר בקליפה של פרי צעיר אשר תאיה פעילים פוטוסינתטית.

הסוכרוז משמש כמקור של פחמן אורגני לבניה וכן לאנרגיה. חלק גדול ממנו נאגר בריכוז גבוה באיזורי המבלע כגון בפרי (Avigad 1982). סוכרוז הוא החומר העיקרי בהדרים המוסע בשיפה ומועבר לפרי, הסוכרוז חודר דרך קרום התא והטונופלט וכסוכר לא מחזר הוא בעל יציבות רבה לחמצון במהלך ההובלה. היותו סוכר ניטרלי עושה אותו לאינרטי וגורם לכך שאינו יוצר קשרים אלקטרוסטטיים עם מולקולות טעונות המצויות בתא. בהיותו סוכר מסיס הוא מגיע לריכוזים גבוהים וללא השפעה ועיכובים על תהליכים המתקיימים בתא. סוכרוז משמש כמוסת לחץ אוסמוטי וזרימת מים בין מרכיבי התאים.

הסוכרוז משתתף במספר תהליכים מטאבוליים, עובר הידרוליזה על ידי אינברטאז לגלוקוז ופרוקטוז, או מתפרק על ידי סוכרוז סינתאז ומספק גלוקוז-UDP לבניית דופן התא ופרוקטוז. מניחים שתהליכים אלו נמצאים בליבה של המערכת הרגישה, המבוקרת באופן עצמאי, של התפתחות הצמח. השפעותיה מאוזנות בידי יכולת החישה את הסוכרוז עצמו, אבל מערכות ותגובות שונות מעורבות (Koch 2004).

בקשר שבין מטאבוליזם סוכרוז ובין אותות של סוכרים ישנם גורמים נוספים, המעורבים בתהליך הפיזיקאלי של יבוא סוכרוז ואתרי פירוק הסוכרוז. סוכרוז יכול לנוע מן השיפה אל הציטופלסמה של תאי מבלע עם או בלי מעבר דרך ממברנת התא או חלל הדופן. זהו הבדל חשוב, כיוון שנקודות על פני שטח הממברנה נמצאו כמעורבות במנגנונים ייחודיים של חישת סוכרוז וכמו כן גם חישה של הקסוז. ממברנת התא יכולה להיות חשופה לשפע סוכרוז ו/או הקסוזות במקרה ואין חיבורים פלסמו-דסמטיים בין התאים (או שהם מוגבלים). במקרים אלה, כמו בפירות הדר בהם אין המשכיות בין תאי צורות ההובלה אל תוך תאי השקיק, אינברטאז דופן יכול להעלות רמות הקסוז מקומיות בצורה ניכרת. כשהוא כבר בתוך התאים המייבאים, הופך שוב מטאבוליזם הסוכרוז חשוב לויסות ריכוז הסוכרים בתא, הפעם להקסוז שנוצר בתא ואולי אף למערכת מעבר אותות בידי סוכרוז.

התוצרים של פעילות סוכרוז סינתאז מעלים באופן המזערי ביותר את ריכוז ההקסוז בתא (דבר שיכול להוות יתרון במצבים מסויימים), כמו כן פעילות אינברטאז ציטופלאסמי היא מינימאלית ביותר ברוב המערכות, בכל מקרה סוכרוז ציטופלאסמי בדרך כלל מועבר לחללית לביקוע.

אינברטאז חללי, כמו שותפו צמוד הדופן, מייצר שפע של הקסוזות ומעלה את ריכוזן בתא. האינברטאז החללי גם משתתף בתהליך המרכזי של ביקוע הסוכרוז ברקמות שבשלב ההתרחבות, ובכך תורם לשטף משמעותי של הקסוזות דרך הטונופלט ולכניסה של הקסוזות למטאבוליזם הציטופלאסמי. שליטה זמנית בשני התהליכים מסתייעת עוד בידי המידור בחללית, אשר יכול למוג את הייבוא והתפקוד בשליחת אותות של האינברטאז החללי, יחד עם תפקידו האוסמוטי שבשלב

התרחבות התאים (Koch 2004).

החשיבות הרבה של האינברטאזות בוויסות רמת הסוכרים בתא הובנה כאשר החלו המחקרים המולקולריים בשנות ה-90 המוקדמות. מאז ועד היום האינברטאזות משכו הרבה תשומת לב, עד כה ישנם מעל ל-300 רצפי אינברטאז במאגרי המידע, המיציגים מעל ל-200 איזו-אנזימים שונים מ-50 זני צמחים שונים (Roitsch et al. 2004).

בהתבסס על רמת המסיסות, המיקום התוך תאי, ה-pH האופטימאלי והנקודה האיזואלקטרית, ניתן להבדיל בין שלושה טיפוסים שונים של איזו-אנזימים: אינברטאז חללי, קשור לדופן התא וניטרואלי. לאינברטאזות החללית ולא להקשורות לדופן יש מאפיינים אנזימטיים וביוכימיים דומים ומשותפת להן רמת הומולוגיה גבוה ברצף הכללי וכן שני מוטיבים של חומצות אמיניות שמורות. שני טיפוסים האינברטאז הינם  $\beta$ -פרוקטופוראנוסידאזות, אשר להם pH אופטימאלי חומצי והם גם מסוגלים לקבל פרוקטופוראנוסידים אחרים כגון סטאכיוז וראפינוז כמצע אך עם יעילות מופחתת בהרבה לביקוע. האינברטאז החללי וזה הקשור לדופן הם גליקו-חלבונים, הודגם בעבר שעיקוב הגליקוזילציה תגרום לפירוק מהיר של האינברטאז קשור הדופן.

אינברטאזות החללית, שמשווגות גם כאינברטאזות מסיסות חומציות, הן מאופיינות על ידי pH אופטימאלי חומצי (5.0-5.5) וממוקמות בחללית. לאינברטאזות החללית יש תוספות ברצף של הקצה ה-N טרמינאלי, שלא כמו ברצפי האינברטאזות הקשורות לדופן. הן קובעות את רמת הסוכרוז המאוחסן בחללית ואת התעבורה של סוכרוז לתהליכים מטבוליים. תפקיד מוכח היטב הוא וויסות של מאזן הסוכר ברקמות הפרי ובפקעות בוגרות.

אינברטאזות קשורות לדופן, אליהן מתייחסים גם כחוץ תאיות, אפופלסטיות, פריפלסטיות או כאינברטאזות החלל החופשי, הן מאופיינות על ידי pH אופטימאלי נמוך (3.5-5.0), נקודה איזואלקטרית גבוהה והן קשורות בצורה יונית לדופן התא. כפי המוצע, האינברטאזות קשורות הדופן מבקעות סוכרוז שחדר או הועבר על ידי נשאי סוכרוז מאלמנטי הכברה של השיפה אל תוך האפופלסט. אז מועברים תוצרי הביקוע לתוך תאי המבלע בידי נשאי הקסוז. הקישור הפונקציונאלי בין נשאי הקסוז לבין אינברטאזות קשורות דופן נתמך בידי צימוד הביטוי ברקמות ספציפיות ובוויסות מתואם. בעוד שבמסלול האפופלסטי נדרש בתאים מבודדים מבחינה סימפלסטית, כמו תאי השמירה בגרגרי אבקה, הוברר כי אינברטאזות קשורות לדופן הן גם חשובות ברקמות מבלע בעלות קשרים סימפלסטיים. באיזור המוטיב של החומצות האמיניות השמורות WECP/V, כל האינברטאזות החלליות הן בעלות שייר ואלין, בעוד כל האינברטאזות החוץ תאיות (פריפלסטיות) מאופיינות בשייר פרולין. ההבדל של חומצה אמינית שמורה אחת זה שקובע את ה-pH האופטימאלי החומצי, יותר המייחד את האינברטאזות קשורות הדופן ואת הספציפיות שלהן למצע.

מספר אינברטאזות, החשודות כקשורות לדופן, אשר שובטו מתאפיינות ב-pI חומצי, דבר התומך בקיומו של טיפוס נוסף של אינברטאז של דופן התא, אשר אינו קשור בצורה יונית לדופן (Roitsch et al. 2004).



הטיפול השלישי של אינברטאזות, ניטרליות, ידועות גם כבסיסיות או ציטופלסמטיות, בגלל ה-pH האופטימאלי שלהן (pH 6.8-8.0) ומיקומן התוך תאי. מידע על תפקידם הפיזיולוגי מוגבל יחסית, בשל הפעילות האנזימית הנמוכה באופן כללי ואשר אובדת במהירות, רק מעט אינברטאזות ניטרליות שובטו ואופיינו. לעומת האינברטאזות החומציות הן לא עוברות גליקוזילציה ומזרזות הידרוליזה של סוכרוז באופן מועדף או בלעדי, לכן אינן פרוקטופוראנוזידאזות. הרצפים המעטים הזמינים, של אינברטאזות ניטרליות, הם בעלי הומולוגיה גבוהה, עם אחוז גבוה של שימור בקצה ה-C טרמינאלי, אבל מראות הומולוגיה נמוכה לרצפי אינברטאזות החללית והקשורות לדופן.

בעבודות פיסיולוגיה בהדרים, אשר נעשו בעשור הקודם, אופיינו פעילות האנזימים בשלבי התפתחות הפרי במיצויים של הפרקציות השונות, שנלקחו החל משלב חלוקת תאים מהירה, התארכות והבשלה (Tzur 1994, Echeverria et al. 1997). במרבית הפירות שנבדקו נמצאה בדרך כלל פעילות גבוהה יותר של אינברטאזות חומציות בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרי לעומת שלבים מאוחרים יותר. יחד עם זאת, לא תמיד ישנה התאמה בדגם הפעילות לגבי זנים אשר נבדקו בעבודות השונות. בסריקת רצפי DNA עולה כי עד היום שובטו שתי אינברטאזות מסיסות, הנחשבות כפעילות בחללית (לאור הומולוגיה לשבטים מצמחים אחרים), שלהלן יקראו Inv1 ו-Inv2. בעבודה מוקדמת (נערכה ע"י ד"ר אבי צדקה במעבדתו של E. Blumwald) בודדו ורוצפו שני השבטים הנ"ל מספריית שקיקי מיץ של תפוז טבורי. בין שבטים אלה ניכר שוני מהותי ברצף ה-cDNA, והם מראים הומולוגיה לאינברטאז מסיס ולכן נחשדו כאינברטאזות של החללית. כמו כן, ניסיון למצוא שבטים המראים הומולוגיה לאינברטאז הקשור לדופן, נכשלו ולא נמצאו בסיפריה שהופקה מציפת הפרי. בנוסף, במאגר המרכזי של רצפי EST's מהדרים (HarvEST), המכיל למעלה מ-225,000 שבטים שונים, מצויים שבטים המראים הומולוגיה לאינברטאז דופן, אולם כולם בסיפריית של איברים אחרים (עלים, פלבדו), אך לא בסיפריית משקיקי מיץ. הוחלט לבדוק לעומק את ביטוי שני השבטים הנ"ל וכן לבחון את האפשרות, לכך שהם מקודדים לאנזימים המצויים גם בדופן. פפטידים נבחרים, מתוך השבטים שבודדו משקיקי מיץ של תפוז טבורי, בוטאו בחיידקים והוכנו כנגדם נוגדנים. נוגדנים אלו נתקבלו באדיבות של פרופ' בלומוולד, אוניברסיטת דיוויס, על מנת להיעזר בהם ככלי לזיהוי מיקום החלבונים בתא ומידת השינוי בכמותם לאורך התפתחות התפוז הטבורי.

לשם השוואה בין רמת ביטוי שני השבטים שבודדו מתפוז טבורי, נבדקה רמת ביטויים גם בפירות הדר שונים, המכילים רמת סוכר שונה במהלך התפתחות השחלה והחנט, וכן בציפת הפרי לאורך התפתחותו (אור-1, לימטה מתוקה ולימון חמוץ). זאת כדי לבדוק את ההשפעה הפיסיולוגית, שבהצטברות הסוכרים ותכולת החומצה השונים בין פירות הדר, שמידת קירבתם הטקסונומית משתנה בתוך הסוג *Citrus* (משפחת *Rutaceae*).

כדי לבחון את רמת הבקרה על תוצרי שיבטי האינברטאזות שבודדו, נבדקו ההבדלים בין דגם ביטוי האינברטאזות לבין רמת פעילות ספציפית בחללית. השוואה זו של פעילות האנזים נערכה בהתאם לבדיקות רמת הביטוי, לאורך התפתחות הפירות מהסוגים השונים.

## מטרות העבודה:

- מטרת העבודה הינה לנסות להעריך את חשיבות תוצרי השבטים, של האינברטאז Inv1 ו-Inv2 שבודדו, במנגנון הקליטה, האגירה והמטבוליזם של הסוכרוז בפירות ההדר:
- 1) בירור המיקום התוך תאי של תוצרי שבטי האינברטאז in vivo באמצעות אימונולוקליזציה.
  - 2) מעקב אחר דגם הביטוי (mRNA) ורמת חלבון האינברטאז לאורך התפתחות פרי ההדר.
  - 3) לימוד פעילות Inv1 ו-Inv2 במהלך התפתחות פירות ההדר שנבחרו.
  - 4) הבנת המנגנון המטבולי להובלה ואגירה של סוכרוז בתאי שקיקי המיץ.

בעבודה זו נבדקו ארבעה זנים שונים של פירות הדר, בעלי אופן צבירת סוכרים שונה: קליף מזן אור-1 (*Citrus reticulata* x temple) ותפוז טבורי (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck), בהם מגיעים הסוכרים בהבשלה לכדי 75% עד 80% מכלל המוצקים המסיסים. והסוכרים העיקריים במיץ הם גלוקוז, פרוקטוז וסוכרוז ביחס 1:1:2, בהתאמה. לעומת יחס שונה בזנים האחרים: בלימטה המתוקה (*Citrus limmetioides*), 6:6:1, ובלימון החמוץ (*Citrus limon* [L.] Burm), 3:3:1 בהתאמה. בהם הסוכרים מהווים רק 20% מכמות המוצקים המסיסים.

למטבוליזם הסוכר בפרי חשיבות רבה בקביעת כח המבלע של הפרי והכוונת המוטמעים אליו. הערכת פעילותם של האנזימים הקשורים במטבוליזם של הסוכרוז, לימוד מיקומם בפרי והבקרה על פעילותם בסוגי הדרים שונים, להם יכולת צבירת סוכרים ותכולת חומצה שונה, עשוי לתרום להבנת המנגנון הביוכימי המאפשר אגירת סוכרים, ואולי אף שליטה מסוימת בקביעת איכות הפרי.

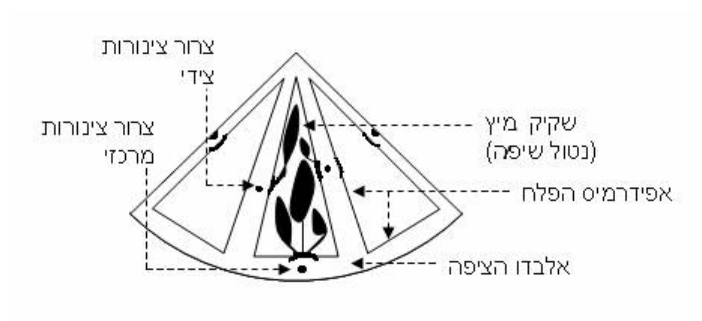
## -סקירת ספרות-

### א. מבנה פרי ההדר

אופיו הסטרקטוראלי של פרי ההדר, המוגדר כ"הספרידיום", משפיע רבות על תכונותיו. במבנהו ניתן למצוא קליפה עבה וציפה שאינה רקמה הומוגנית. אין קשר ואסקולרי לשקיקי המיץ שבפלחים, קיימים יחסים שונים באחוז המים של הקליפה והציפה ועוד. הפלבדו, הוא החלק החיצוני בקליפה, מהווה את שטח פני הפרי. מתחת לפלבדו בקליפה, נמצא האלבדו המורכב משכבה ספוגית לבנה. ציפת פרי ההדר מורכבת מפלחים נפרדים ובתוך כל פלח שקיקי מיץ שהתפתחו מקבוצות תאים מריסטמטיים (Burns 1992). שקיקים אלה מחוברים באמצעות עוקצים לבסיס הפלחים כאשר דרכם מועברים אל שקיות המיץ מים וחומרים מומסים הבאים מהעלים מזרימת מוטמעים ומחלקי הצמח האחרים.

רקמת הציפה אינה רקמה במובנה הרגיל של המילה, דהיינו, אינה רצף של תאים פרנכימטיים הגובלים זה בזה באופן בלתי אמצעי, אלא מתהווה מהצמדה של צברי תאים המהווים את שקיקי המיץ. אלה מופרדים זה מזה על ידי קרומים המכוסים בשכבות דונג. בשקיקי המיץ חלים תהליכים מטאבוליים שונים כולל תהליכים הידרוליטיים שבעקבותיהם נאגרים סוכרים וחומרים אחרים במוהל שבחלליות התאים. מיץ זה מורכב מתערובת של סוכרים מחזרים ולא מחזרים, חומצות אורגניות וחומצות אמינו ומנרלים שונים. היחסים בין מרכיבים אלה משתנים עם התפתחות הפרי והבשלתו (Iwagaki et al. 1981). בהובלת המוטמעים מעלי מקור לפרי המתפתח בעצי הדר המשמש כמבלע, נמצא הסוכרוז כחומר עיקרי (Kriedemann 1969).

למערכת צינורות ההובלה הנמצאת במזוקרפ (אלבדו) של הפרי אין קשר ישיר עם שקיקי המיץ (Schneider 1968). אפשר להבחין בצרור צינורות מרכזי הנמצא בצד הדיסטלי של כל פלח (Dorsal bundle) ובצרורות צינורות נוספים (Septal bundle) כאשר בין כל שני פלחים נמצא צרור אחד (Lowell et al. 1989), **תמונה 1**. צרורות צינורות אלה מספקים את המוטמעים לכל פלח בנפרד כאשר הם ניצבים במקביל ולאורכם של שורות שקיקי המיץ (Koch et al. 1990). חדירת המוטמעים אל שקיקי המיץ מותנית בפריקתם (Unloading) מהשיפה של מערכת צרורות הצינורות שתוארה לעיל ובתנועה לא וסקולארית (Nonvascular transport) דרך האפידרמיס של הפלח והזירים של שקיקי המיץ שהם חסרי מערכת הובלה (Koch et al. 1990).



**תמונה 1:** צרורות הצינורות המוליכים לציפת פרי הדר (מתוך Lowell et al. 1989).

### **ב. איכות פרי ההדר**

הבשלתו של פרי ההדר, שאינו נחשב לפרי קלימקטרי, אינה מוגדרת על ידי שלב פיסיולוגי חד משמעי, אלא נקבעת על פי טעמים של מרבית הצרכנים, ומוגדרת באופן אנליטי בעיקר על ידי היחס בין סוכר לחומצה (Rhodes 1980). הבשלת הפרי מאופיינת על ידי הצטברות סוכרים וירידת מתכונת החומצה. הצטברות הסוכרים בהתפתחות הפרי אינה נובעת מפירוק עמילן אלא מזרימה מתמדת של מוטמעים מן העלים, ומתהליכים המתרחשים בתוך הפרי. מסיבה זו פרי שנקטף טרם זמנו לא יבשיל על המדף. עם זאת יש לציין שעמילן נמצא רק בפירות צעירים. המדד לקביעת איכות הפרי בהדרים שונה בהתאם לשימוש בו כפרי למאכל טרי או כפרי מעובד. סטנדרט ההבשלה בפרי טרי תלוי בשינוי הצבע (שבירת צבע), אחוז מיץ וביחס בין אחוז הסוכרים לאחוז החומצה, האופייניים לכל זן כאשר יחס זה משקף את טעם הפרי. אחת הבעיות החשובות בהדרים היא הקושי לכוון את איכות הפרי, במיוחד פרי המיועד לשיווק טרי, כאשר המגמה להגיע לפרי בעל יחס רצוי של סוכר לחומצה. איכות הפרי תלויה גם באיזורים, בדרישת השוק, בהתאמת זנים לכנות ולתנאים המקומיים.

### **ג. הרכב המוצקים המסיסים בפרי ההדר**

סוכרים הם אחד המרכיבים הביוכימיים החשובים המשפיעים על איכות הפירות. סוג הסוכרים וכמותם משפיע ישירות על טעם הפרי ועל המתקנות. לכן חשוב לבחון את מרכיבי המיץ ומהלך הצטברות הסוכרים בפירות ולהבהיר את הקשר שלהם לפעילות האנזימים המשתתפים במטבוליזם של הסוכרים (Moriguchi et al. 1992).

בין החומרים השונים הנאגרים בפירות, מהווים הסוכרים – פחמימות מסיסות המצויים בשפע, חלק חשוב ביותר. בפרי ההדר, בהבשלה, 75% עד 80% מכלל המוצקים המסיסים הם סוכרים (Soule 1986). הסוכרים העיקריים במיץ הדרים הם גלוקוז, פרוקטוז וסוכרוז ביחס 1:1:2, בהתאמה. יחס כללי זה שונה בחלק מהזנים, כגון: בלימטה, 6:6:1, בלימון, 3:3:1 (Sinclair 1984). במשך ההבשלה יש עליה ברמות הסוכרים במיץ. באשכוליות ובפירות של זנים חמוצים כמות הסוכרוז קטנה בהשוואה לפירות מתוקים. בלימון ולימטה הסוכרים מהווים רק 20% מכמות המוצקים המסיסים (Ting et al. 1986). ההצטברות האיטית של הסוכרים והירידה ההדרגתית של תכולת החומצה משנים את טיבו של פרי ההדר במהלך התפתחותו.

#### ד. יתרונות אגירת סוכרוז

לסוכרוז ישנם שני יתרונות עיקריים לאגירה בצמחים, על פני אגירת סוכרים מחזרים. ראשית, סוכרוז הינו דיסכריד לא מחזר והוא פחות זמין לעיבוד על ידי מערכת הנשימה ותהליכים מטבוליים אחרים. מסיבה זו, יחסית לגלוקוז, הוא מוגן בפני התקפות אנזימטיות וזמינותו למטבוליזם מופחתת. יתרונ זה של הסוכרוז נובע ככל הנראה מהעובדה שהוא אינו עובר זרחון ישיר, מאחר שלא קיים סוכרוז קינאז בטבע ורק לאחר שהוא עובר פרוק אנזימטי על ידי אנזימים הממודרים ברקמות מקור או ברקמות מבלע, תוצרי הפרוק זמינים למטבוליזם (Hawker 1965). שנית, במידה שקליטת סוכר לחללית מוגבלת על ידי הפוטנציאל האוסמוטי או לחץ הטורגור, ישנה עדיפות לאגירת סוכרוז על פני הקסוזות, מאחר שהאוסמולריות של סוכרוז הינה מחצית מזו של הקסוזות ( Yelle et al. 1988). פירות בשלים רבים ואיברי אגירה שונים, בהם תכולת הסוכרים גבוהה, אוגרים סוכרוז, לדוגמא: קנה סוכר (Giaquinta 1979), סלק סוכר (Hatch and Glasziou 1963), מלון (Schaffer et al. 1987, Lingle et al. 1985), הדריס (Kato et al. 1978), פפינו (Schaffer et al. 1989) וכן עגבנית הבר *L. chmielewskii* (Yelle et al. 1988). המצאות הסוכרוז עשויה לנבוע מפרוק של עמילן במהלך ההבשלה, כפי שקורה בבננה או תפוח, או על ידי קליטה במהלך ההתפתחות (Hawker 1985). תפוחים, אפרסקים, בננות, אננס, מלונים, תפוזים, משמשים, אננס ושזיפים, מכילים 3%-8 סוכרוז על בסיס משקל טרי. אולם ישנם גם יוצאים מן הכלל כגון ענבים המכילים 0.2%-1 סוכרוז וכמויות גדולות של גלוקוז ופרוקטוז (עד 8% מכל אחד) (Whiting 1970).

#### ה. פעילות המבלע כאתר בקרה בהובלת וחלוקת המוטמעים

כמות הסוכרים המגיעה אל הפרי ונאגרת, נקבעת על ידי פעילויות משולבות ברקמות המקור והמבלע, והיא מהווה מכלול של רמת פעילות בתגובה לשינויים סביבתיים ופנימיים. עלי המקור מבקרים את כמות ואת זמינות הסוכרוז להובלה לאזורי גדילה ואגירה ומספקים את האנרגיה הדרושה לטעינה לשיפה (Fondy et al. 1983). כמות הסוכרוז הזמינה ליצוא, נקבעת על פי המטבוליזם של הפחמן ומידורו בעלי המקור. תהליכים אלה משפיעים באופן עקיף על יצוא המוטמעים (Daie 1985). תהליכים מסוימים בעלי המקור מבקרים את החלוקה בין עמילן לסוכרוז ובכך משפיעים על ההובלה (Fondy et al. 1983). לדוגמא, הבקרה על פעילות האנזים מסנתז הסוכרוז - סוכרוז פוספט סינתז עשויה להשפיע על החלוקה בין עמילן לסוכרוז (Huber et al. 1982). כמו כן היחסים בין  $Pi/(PGA+DHAP)$  בציטופלסמה מבקרים ככל הנראה את קצב זרימת הפחמן המקובע לעמילן בעלים (Portis 1982). אולם, במקרים רבים גם למבלעים מתפתחים תפקיד מפתח בקביעת קצב יצוא הסוכרוז מן העלים. יכולתו של המבלע לקלוט מוטמעים, משפיעה על קצב וכיוון היצירה של תוצר הפחמן הסופי בעלי המקור (Daie 1985). הראו כי העלאת קצב הפוטוסינתזה לא בהכרח תורמת להובלת כמות מוטמעים גדולה יותר למבלעים מאחר שחלק גדול מהפחמן המקובע הופך לעמילן ולא מיוצא למבלעים (Ho 1977). הו (Ho 1979) מצא כי בפירות עגבניה, גם כאשר קצב קיבוע הפחמן היה

מינימאלי, נמשך איבוד משמעותי של פחמן מעלי המקור כתוצאה מדרישה מתמשכת על ידי המבלעים. הוא הסיק מכך שדרישת המבלע יכולה לגבור על זמינות המוטמעים באמצעות בקרה על הטרנסלוקציה. נמצא גם כי לדרישות המבלעים יש השפעה על חלוקה בין סוכרוז לפחמן בעלה, וכן על הפוטוסינתזה. תורן וקולר (Thorne et al. 1974) הראו כי העלאת הדרישה למוטמעים בצמחי סויה על ידי הצלת אברי הצמח השונים, פרט לעלה המקור, גרמה לעליה בריכוז הסוכרוז בעלה המקור על חשבון ירידה בריכוז העמילן. כמו כן נמצאה עליה משמעותית בקצב הפוטוסינתזה, בקצב הטרנסלוקציה וכן בריכוזי הפוספט האנאורגאני ופעילות Ribulose 1,5-diphosphate carboxylase. מחקר שנערך במוטנטים של תירס הראה כי העדר יכולת לצבור עמילן באנדוספרם, דבר המוביל ליצירת מבלע בעל קיבולת נמוכה, גרם לצבירת עמילן לריכוזים גבוהים יותר בעלים (Koch et al. 1982).

גם כיוון ההובלה והחלוקה של המוטמעים המובלים בשיפה, מבוקרים בעיקר על ידי תהליכים הממוקמים בקצה המבלע של המערכת מקור-הובלה-מבלע (Walker et al. 1977). ברגע שסוכרוז נטען לתאי כברה / תאי לוואי, יעדו הסופי יקבע ככל הנראה על פי החוזק היחסי של המבלעים השונים (Fondy et al. 1983). לא קיימות עדויות שלרקמת המקור יש השפעה בבקרת היעד הסופי של המוטמעים (Gifford et al. 1981). צורת החלוקה של סוכרוז בין המבלעים השונים מבוקרת על ידי תחרות בין המבלעים השונים, ומכאן שכמות המוטמעים שתגיע לכל מבלע תלויה ביכולתו היחסית של כל מבלע להתחרות על המוטמעים. לדוגמא, כאשר בניסיונות בהם הורדו שני שליש מהתפרחות של צמח עגבניה היו הצמחים גדולים יותר ובעלי מספר קטן יותר של פירות גדולים, שיבולם לא היה קטן בהרבה לעומת צמחי הביקורת. בצמחים בהם לא הורדו תפרחות נמצאה ירידה משמעותית בצמיחה הוגטטיבית כתוצאה מהפניית המוטמעים, בעקבות תחרות, לפירות המתפתחים, וכ-90% מהעליה במשקל הטרי בזמן זה היתה בפירות המתפתחים. בנוסף לכך נמצא כי התפתחות התפרחות מעוכבת במצבים בהם התפרחות המוקדמות יותר עמוסות פרי (Hurd et al. 1979).

כדי לבדוק השפעתם של אנזימים על חוזק המבלע, עשו Tang et al. (1999) שימוש בטכניקת אנטיסנס, על מנת ליצור צמחים טרנסגניים בהם פעילות אנזימתית מופחתת. שימוש בעיכוב אינברטאזות חללית וקשורות לדופן התאים בגזר, הראו שינויים פנוטיפיים כבר בשלבי ההתפתחות הראשוניים של העובר. נבטי הגזר הצעירים לקו מאוד בהתפתחותם. רקמת עלים, הנחשבת כמבלע בצעירותה, שבה בוטא אנטיסנס mRNA של אינברטאז דופן פיתחה תוספות עלעלים אשר אגרו רמות מוגברות של סוכרוז ועמילן. התפתחות רקמת מבלע נוספת, שורש הגזר, הופחתה בצורה ניכרת והכילו כמויות נמוכות יותר של פחמימנים. בהשוואה לצמחי ביקורת, יחס המשקל היבש בין עלים לשורש הגזר הוסט בצורה חדה לטובת העלים בצמחים שביטאו אנטיסנס לאינברטאז דופן. בצמחים שביטאו אנטיסנס mRNA לאינברטאז חללי, גם כן נצפו יותר עלים מאשר בצמחי הביקורת והתפתח שורש קטן יותר ביחס למסת העלים. כמו כן תכולת הפחמימנים היתה גבוהה יותר בעלים ומופחתה בשורש, המרמזים על תפקיד האינברטאזות החומציות בהרכב הסוכרים והשטף המטאבולי של המבלעים (Tang et al. 1999).

שימוש בעיכוב סוכרוז סינתאז באמצעות אנטיסנס של הגן בעגבניה, גרם לירידה ניכרת בפעילות החלבון בפרי וירידה קלה בהצטברות העמילן (D'Aoust et al. 1999), אך, in-vitro, יבוא הסוכרוז לפרי לא הופחת. לעומת זאת, בפירות בהם פעילות הסוכרוז סינתאז היתה נמוכה, הפריקה לפרי הופחתה משמעותית. כמו כן, חלה ירידה ניכרת בכמות הפרי לצמח, המצביעה על מעורבותו של הסוכרוז סינתאז בשליטה על חוזק המבלע של פרי העגבניה, בקביעת כמות היבול והתפתחות הפרי (D'Aoust et al. 1999). בעבודה דומה שנעשתה בצמחי עגבניה טרנסגנית המבטאת אנטיסנס לאינברטאז חומצי, מסיס ותוך תאי (TIV), הראו Klann et al. (1996) הבדלים לצמחי עגבנית בר גודלו בתנאים זהים. בעקבות ירידת רמת האינברטאז החומצי בעגבניות הטרנסגניות היה ריכוז גבוה של סוכרוז וריכוז נמוך של הקסוזות. בהתאם לעליה ברמות הצטברות הסוכרוז בשלבים האחרונים של התפתחות העגבניה, היו הפירות קטנים יותר בכ-30% (Klann et al. 1996). על סמך הנתונים המתוארים לעיל נראה כי כמות הפחמן הסופית שתקלט במבלע תלויה בכמות הפחמן המיועדת ליצוא, המושפעת מהחלוקה בין עמילן לסוכרוז בעלי המקור ומבוקרת על ידי תהליכים המתבצעים במקור ומדרישת המבלע, וכן מיכולת המבלע לייבא מוטמעים שהוא פונקציה של חוזק המבלע, כפי שהוצע בעבר (Daie 1985).

חוזק המבלע מוגדר כ"יכולת התחרותית" או "כח המשיכה" של מבלע בתוך המסגרת הכללית של הצמח השלם (Wolswinkel 1990). למרות שחוזק המבלע האמיתי מושפע מהזמינות של אספקת המוטמעים ומהקרבה של המבלע למקור, המרכיב העיקרוני ביותר הוא היכולת הפנימית של המבלע לקבל או למשוך מוטמעים. יכולת פנימית זו של המבלע היא חוזק המבלע הפוטנציאלי. הוא נקבע גנטית ובא לידי ביטוי במלואו, כאשר היצע המוטמעים עונה על הביקוש, וכאשר התנאים הסביבתיים לפעילות המטבולית במבלע הינם מיטביים (Ho 1988).

חוזק המבלע של הפרי הוא פונקציה של גודל המבלע ופעילותו, כפי שמבוטה בנוסחא הבאה (Warren-Wilson 1967):

**חוזק המבלע (גר/יום) = גודל המבלע (גר') X פעילות המבלע (גר/גר'יום)**

קיים ויכוח לגבי הגורם המהותי ביותר בקביעת קצב ההובלה למבלע. מספר מחקרים מראים שבעגבניה הגורם החשוב ביותר הינו פעילות המבלע. Moorby et al. (1974), תוך שימוש ב- $^{14}\text{CO}_2$ , הביאו עדות להשפעת פעילות המבלע על ההובלה. הם הראו שההובלה קטנה ב-30%-15 כאשר פעילות המבלע ירדה כתוצאה מקרור הפרי.

בעגבניה נמצא אף אתר האחראי לתכונה כמותית (QTL) המתבטא בעליה הדרמתית בגודל הפרי של הזנים המתורבתים לעומת זני הבר. כאשר שובט והועבר האתר – *fw2.2* מזן הבר לזן המתורבת נצפה הבדל ברמת חלוקת התאים בשחלות, כמו כן הופחת גודל הפרי במידה כמותית קבועה של כ-30% (Frery et al. 2000). ניסויי שדה בזנים התרבותיים המותמרים הראו כי כפיצוי על גודל הפרי והשחלות המוקטנים נצפה מספר רב יותר של פרי, כתוצאה ממספר משמעותי גדול יותר של תפרחות. סך מסת היבול נשאר קבוע. כאשר הוסרו תפרחות עודפות, נותר גודל הפרי שונה מזה של הקוים המקוריים. מכאן שלאחר - *fw2.2* יש השפעה על חלוקת מוטמעים לפרי ובדיעבד גם על גודלו, אשר כל השפעה הקשורה למופע הפנוטיפי שניה לה (Nesbitt et al. 2001). בבחינה של QTL (Quantitative Trait Loci) אחר שערכו Fridman et al. (2000) בעגבניה, שביטוי מושפע מתנאי הסביבה, נבדק הבסיס המולקולרי לשוני הפנוטיפי. ה-QTL שאופיין הופק מזן עגבניה ירוקה, שאלל הבר שלה העלה את תכולת הגלוקוז והפרוקטוז בפירות זני טיפוח של עגבניה תחת רקע גנטי וסביבתי שונה. בדיקה של הקוים המותמרים הגבילה את השוני הגנטי לכדי בסיס בודד אחד, בעל כמה מופעים (פולימורפיזם), המייצר איזור מועד לשיחלוף (רקומבינציה) של 484 בסיסים, המתפרסים על פני אקסון ואינטרון של אינברטאז אפופלסטי ספציפי לפרי. תוצאות ההכלאות בין הזנים מדגימות כיצד מופעים שונים של אינטרון אינברטאז מווסת את חוזק המבלע של פרי העגבניה וקובע את הפנוטיפ של תכונה הקשורה ביבול הכללי (Fridman et al. 2000). בעזרת חמישה קוים שבהם שולבו שני הזנים, המשך ניתוח המופעים הפונקציונליים של האתר והוגבל לכדי חומצה אמינית אחת ליד האתר הקטליטי של קריסטל האינברטאז, אשר השפיעה הקינטיקה האנזימתית וחוזק המבלע של הפרי (Fridman et al. 2004).

בצמחים אחרים, כגון מלון (Hurd et al. 1979) וחיטה (Cook et al. 1983), הראו שלגודל הפרי והקרבה למקור השפעה מכרעת על חוזק המבלע. הגורמים התורמים לפעילות המבלע, אינם ברורים דיים, אך הם כוללים: פריקה מהשיפה, קליטת המוטמעים על ידי רקמת המבלע, מטבוליזם ואחסון פחמימות באיזורי המבלע.

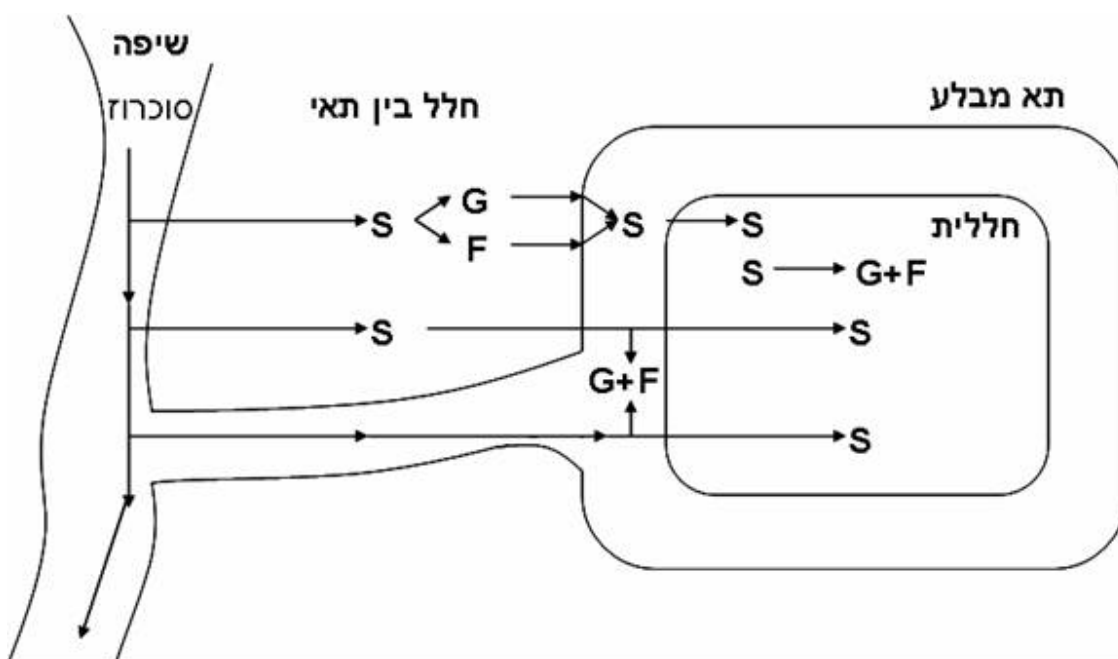
### 1. פריקה מהשיפה

פריקת סוכרוז מהשיפה הינה נקודת בקרה חשובה בקביעת צורת ההובלה של פחמן. ריכוז מאגר הסוכרוז באתר הפריקה מהשיפה עשוי להשפיע על קצב הפריקה (ראה סעיף 3). בצמחים היבשתיים, כ-90% מהמסה של הסוכרים, המועברים ברובו של השטף כתמיסה, מונעת דרך השיפה באופן אוסמוטי על ידי הבדלי לחצים הידרוסטטיים בין קצה המקור (המייצא) וקצה המבלע (המייבא) של השיפה. טעינה במקור ופריקה במבלע של סוכרים נעשית בזכות הריכוזים האוסמוטיים ובכך שינויי הלחץ שלאורך השיפה. הסוכרים המובלים בשיפה עשויים להיפרק באחת משתי דרכים. הם עשויים להיות מובלים לתאי המבלע במסלול סימפלסטי דרך פלסמודסמטה בצורה שכיחה ברוב סוגי המבלע. או לחילופין להיפרק לאפופלסט לפני הכניסה לתאי המבלע, שמור בדרך כלל כצעד



ביניים לרקמות הרחוקות, במצבים מיוחדים, מן המקור (Daie, Giaquinta et al. 1983, 1985, Lalonde et al. 2003) (תמונה 2).

סוכרוז נפרק לאפופלסט של המבלע במספר סוגי צמחים כגון: תירס (Felker et al. 1980), סויה (Thorne 1982), קנה סוכר (Glasziou et al. 1972) ותפוח (Zhang et al. 2004). קיימים גם נשאים חלבוניים המשחררים סוכרוז לסביבת האפופלסט באתרי פריקה מהשיפה, כמה אף שובטו (ראה סעיף 2). ההתנהגות הפיזיולוגית של נשאים אלה מאופיינת במעבר, מעוגן ממברנלית, שיכול להיות מצומד אנרגטית. כמו כן ידועים תפקודם של מנגנונים המווסתים מעבר סימפלסטי, אשר להם בקרה משמעותית על פריקת סוכרוז מן השיפה (Lalonde et al. 2003). ברקמות מסוימות כמו בפרי תפוח עץ מתפתח, פריקה אפופלסטית הינה מחויבת המציאות מאחר שלא קיים חיבור של פלסמודסמה בין צרוורות הצינורות לרקמות המוזנות לאורך התפתחות פרי התפוח (Zhang et al. 2004). לעומת זאת קיימות עדויות לפריקה סימפלסטית במבלעים מתפתחים. בעלים צעירים של סלק סוכר נמצא קשר סימפלסטי בין תאי הכברה לרקמות ההיקפיות (Giaquinta 1977). כמו כן בשורשי אפונה ישנה עדות לתנועה סימפלסטית של סוכרוז (Dick et al. 1975). בדומה לכך, קיימת תמיכה למסלול פריקה סימפלסטי בשורשי תירס (Giaquinta et al. 1983).



תמונה 2: מסלולים אפשריים לפריקת סוכרוז מהשיפה. S- סוכרוז, G- גלוקוז, F- פרוקטוז (מתוך Giaquinta et al. 1983).

במידה שהפריקה מהשיפה נעשית לאפופלסט, הסוכרוז הנפרק עשוי להיקלט כפי שהוא, או לעבור פרוק לפני כניסתו לתאים (תמונה 2). סוכרוז נכנס לרקמת האגירה של גידולים מסוימים ללא פרוק. הדבר נכון, למשל, בסויה (Thorne 1982), שורש בוגר של סלק סוכר (Wyse 1979) וגזר בוגר (Daie 1984).

בגידולים אחרים, הסוכרוז נפרק לאפופלסט, ועובר פרוק על ידי האנזים אינברטאז חומצי הקשור לדופן התא. באגוזי מלך, למשל, צרורות הצינורות מבודדים מבחינה סימפלאסטית מרקמת הפריקארפ הברשנית. כמו כן, נמצאה נוכחות מובהקת של אנזים אינברטאז חומצי בדפנות תאי הלוואי של הכברה וכן בתאי הפרנכימה הצמודים להם, המעידים על כך שהפריקה ברקמת הפריקארפ הברשנית של האגוז נעשית דרך האפופלסט (Wu et al. 2004). בגבעולי קנה סוכר צעירים ובוגרים, יש עדות לכך שהסוכרוז הנפרק לאפופלסט עובר פרוק לפני כניסתו לתאי הפרנכימה. נמצא שקצב הקליטה של הסוכרוז לתאים אלה תלוי בפעילות האינברטאז לפרוק הסוכרוז להקסוזות (Glasziou et al. 1972). גם בתירס נמצא שסוכרוז נפרק לאפופלסט ומשם הוא נקלט לתאי העברה בבסיס האנדוספרם (basal endosperm transfer cells), שם הוא עובר פרוק על ידי אינברטאז חומצי (Doehlert et al. 1987).

## 2. קליטת סוכרים דרך קרום התא והטונופלסט

קליטה, מטבוליזם ואגירה של סוכרים על ידי תאי המבלע הינם הצעדים הסופיים בחלוקת הפחמן. בסוגי מבלעים מסוימים נמצאה מערכת קליטה פעילה דרך קרום התא, ברקמות בהן הפריקה הינה לאפופלסט. מנגנון מעין זה עשוי להוות אתר בקרה באיזור המבלע ולהסביר את השפעת המבלע על חלוקת הסוכרים בצמח השלם (Gifford et al. 1981). בצמחים אחדים כגון סלק סוכר (Saftner et al. 1983), שורשי תירס (Daie 1984), וזרעי סויה (Lichtner et al. 1981, Thorne 1982), נמצא עקום קליטה בי-פאזי לסוכרים דרך קרום התא ברקמות המבלע. כאשר ריכוז הסוכרוז באפופלסט נמוך, מתבצעת קליטה פעילה בעלת עקום המגיע לרוויה. בריכוז סוכרוז גבוה, הקליטה הינה קווית (לינארית) (Daie 1985). קליטת סוכר אקטיבית אפשרית דרך קוטרנספורט (cotransport) עם פרוטונים. במחקר שנערך על ידי Griffith et al. (1987) לגבי קליטת הסוכרוז לתוך אנדוספרם של תירס נמצאה הקליטה לינארית לריכוז הסוכרוז החיצוני, ללא מרכיב הניתן לרוויה. כמו כן לא היתה השפעה למעכבים מטבוליים ולטיפול טמפרטורה. בניגוד לזאת מצאו Thomas et al. (1992), תוך שיפור שיטות הבדיקה למניעת הפציעה של הרקמה, כי הקליטה לאנדוספרם של תירס הינה אקטיבית ונעשית ככל הנראה על ידי נשא חלבוני. בדיסקיות פרי של עגבנייה נמצא תוך שימוש בסוכרים מסומנים שהקליטה דרך קרום התא אינה ספציפית לגבי סוכר מסוים. כמו כן נמצא שהקליטה אינה מעוכבת על ידי מעכבים מטבוליים שונים וכן שפעילות ה-ATPase ברקמת הפרי היתה נמוכה. מתוצאות אלו הסיקו שהקליטה דרך קרום התא אינה דורשת נוכחות של נשא ממברנלי או ATPase לאספקת אנרגיה לקליטת הסוכרוז, והיא נעשית ככל הנראה לפי מפל הריכוזים (Johnson et al. 1988, Damon et al. 1988). ניתוח גנטי שנשמך על הכלאות בין שני זני עגבניות, האחת מתורבתת - אוגרת הקסוז לעומת אחרת מזן בר שאוגרת סוכרוז, הראה כי ריכוז הסוכרוז נשלט על ידי פעולת גן רצסיבי אחד או שניים (Yelle et al. 1991). ניתוח ביו-כימי הראה כי ריכוז הסוכרוז בעגבנית הבר קשור בעיקר ברמות המופחתות של האינברטאז החומצי,

בהבדל מן רמה הנורמלית של הסוכרוז סינתאז. אינברטאז מהזן האוגר הקסוז בודד ואופיין לשלושה איזו-אנזימים שונים. רמות האינברטאז הנמוכות בזן האוגר סוכרוז נובעות מכמות נמוכה של החלבון ולא כתוצאה מנוכחות מעכב (Yelle et al. 1991). כדי לבדוק את היחס בחשיבות של האינברטאז החומצי והסוכרוז סינתאז לכח המבלע של העגבנייה, נבדקו פעילותם לאורך התפתחות הפרי. נמצא שבשלבים המוקדמים, דווקא הסוכרוז סינתאז ולא האינברטאז נקשר באופן חיובי לרמת הגדילה היחסי של פרי העגבנייה וכן לתכולת העמילן ברקמת הפריקרה. מכאן שלסוכרוז סינתאז תפקיד מכריע בשינוע ויבוא סוכרוז בתחילת התפתחות העגבנייה (Wang et al. 1993). כמו כן נמצא ששיא mRNA של סוכרוז סינתאז בפרי העגבנייה מגיע ימים לפני שנראה שיא ברמות החלבון. חוסר ההתאמה בין רמות ה-mRNA והחלבון מצביע על כך שביטוי הסוכרוז סינתאז בעגבנייה נשלט הן ברמת השעתוק והן ברמת התרגום (Wang et al. 1994).

במבלעים שאוגרים סוכרים פשוטים כגון בקנה סוכר (Thom et al. 1985), סלק סוכר (Saftner et al. 1983), סלק אדום (Willenbrink et al. 1979) וגזר, הובלת הסוכרים דרך הקרום מסובכת יותר. סוכרוז מאוחסן בחלליות של תאי הפרנכימה ברקמות אלה בריכוזים גבוהים ביותר, המגיעים עד 800mM (בסלק סוכר). לכן, בנוסף למעבר דרך קרום התא יש צורך גם במעבר דרך הטונופלסט כנגד מפל הריכוזים תוך השקעת אנרגיה. בשורשי סלק סוכר נמצאו שני מנגנונים שונים לקליטת סוכרוז לחללית. מנגנון אחד הקולט סוכרוז ישירות ותלוי ב-MgATP וכולל ככל הנראה אנטיפורט עם  $H^+$ . מנגנון שני המסתז סוכרוז פוספט מ-UDP-Glucose תוך כדי העברתו לתוך החללית (group translocator). מנגנון זה תלוי בסדרת פעילויות אנזימטיות המשתמשות ב-UDP-

Glucose כפרקורסור הן לגלוקוז והן לפרוקטוז המרכיבים את הסוכרוז (Thom et al. 1986). בקנה סוכר נמצא מנגנון קליטת סוכרוז לחלליות האוגרות סוכרוז, דומה למנגנון השני שנמצא בסלק סוכר (Thom et al. 1985). בפירות עגבניה לעומת זאת, תוך שימוש בוזיקולות של טונופלסט, נמצא כי הקליטה לחללית אינה ספציפית לגבי סוכר מסוים וכי אינה תלויה ב-ATP. עיכוב קליטת הקסוזות לוזיקולות אלה על ידי PCMBs מעידה על כך שהקליטה נעשית על ידי נשא חלבוני. עדויות לפריקה של סוכרוז אל האפופלסט הוצגו במספר זני צמחים כמו: טבק, תפוח אדמה וארבידופסיס (Li et al. 2003). בידוד ואפיון הגן הראשון לנשא חלבוני של סוכרוז נעשה בתרד. ניתוח תפקידם של נשאי סוכרוז כחלבונים הקובעים את מידור הפחמימנים נערך במספר צמחים כמו תפוח אדמה וארבידופסיס. נמצא כי נשאי הסוכרוז הם חלבונים הנתונים תחת בקרה צמודה. בהדרים בודדו ואופיינו שני נשאי סוכרוז. האחד מתבטא בעלים תחת בקרה של סוכרים, המעידים על מעורבות בתהליך מעבר אותות בתיווך הקסוקינאז. השני מבוטא יותר במבלעים, איברים מייבאי סוכר ומרמז בכך על תפקידו הפיסיולוגי השונה מנשא הסוכרוז הראשון (Li et al. 2003).

### 3. תהליכים במבלע המבקרים את הובלת הסוכרים

התהליכים האחראיים לבקרת ההובלה של סוכרים בצמחים עדיין לא ברורים דיים. קיימות מספר גישות ביחס לגורם המבקר את קצב זרימת המוטמעים למבלע. גישה אחת סוברת כי קצב הזרימה של המוטמעים למבלע תלוי במפל הריכוזים של הסוכרוז בין המקור למבלע. על פי גישה זו ניתן להגביר את הזרימה בשיפה באחת משתי דרכים:

**א.** העלאת ריכוז הסוכרוז באתר הטעינה לשיפה. דבר זה עשוי להגביר את קצב ההובלה בשיפה אך יקטין את הפרשת הסוכרוז על ידי תאי המזופיל וישפיע על צבירת עמילן בעלה.

**ב.** הקטנת ריכוז הסוכרוז באתר הפריקה מהשיפה במבלע. במקרה שהפריקה נעשית לחלל הבין-תאי, ריכוז הסוכרוז באתר זה ישפיע על הפרש הריכוזים בין המקור למבלע ש"יורגש" על ידי השיפה. לפיכך, היכולת של המבלע לשמור על ריכוז סוכרוז נמוך באפופלסט, תגביר את הגרדיאנט בין המקור למבלע ולפיכך תגביר את זרימת הסוכרוז אל המבלע (Wyse et al. 1986).

כאשר הפריקה מהשיפה נעשית על ידי דליפה עם מפל הריכוזים באמצעות נשא חלבוני, קצב הדליפה יקטן ככל שריכוז הסוכרוז באפופלסט יגדל. בניסיונות בהם ניתן סוכרוז מסומן לעלים של *Vicia faba* ושלושים דקות לאחר מתן הסימון נחתך הגבעול ונבדקה הדליפה ממנו לתוך תמיסות עם ריכוזים שונים של סוכרוז או גלוקוז, נמצא כי ריכוזים עולים של סוכרוז עכבו את הדליפה בעוד שלריכוז הגלוקוז לא היתה כל השפעה (Wyse 1983). ניתן לשמור על ריכוז סוכרוז נמוך באפופלסט על ידי הידרוליזה של הסוכרוז באמצעות אינברטאז הקשור לדופן התא או הרחקה פיזית של הסוכרוז מאתר הפריקה. על פי גישה זו פרוק אפופלסטי של הסוכרוז עשוי להגביר את הפריקה מהשיפה במספר דרכים: א. שמירה על ריכוז סוכרוז נמוך באפופלסט. ב. מניעת טעינה של הסוכרוז לשיפה מאחר שהטעינה ספציפית לסוכרוז. ג. העלאת הריכוז האוסמוטי באפופלסט ובכך זירוז פריקה של המים מהשיפה (Wyse 1983). בניסיונות שנערכו בטבק על איזו-אנוים, הידוע כמקודד לאינברטאז דופן המאופיין בדגם ביטוי תקופתי ומרחבי מסויים, הושתק הגן על ידי אנטיסנס ספציפי לרקמה, המבוקר פרומוטר מתאים לטבק (Goetz et al. 2001). התוצאות נראו בדמות חסימה בשלבים הראשונים של התפתחות גרגרי האבקה ובכך גרמו לעקרות זכרית. תוצאות אלו מדגימות את תפקידו הקריטי של האינברטאז החוץ תאי ומחזקות את הגישה לפיה ביקוע סוכרוז חוץ תאי הינה פעולה חיונית לאספקת פחמימנים אל רקמות מבלע דרך האפופלסט (Goetz et al. 2001). מחקר נוסף העוסק בהשפעות אינברטאז הדופן על המעבר מצמיחה וגטטיבית לרבייתית בדק יצירת זרעים בצמח המודל – ארבידופסיס, המבטא אינברטאז דופן תחת פרומוטר ספציפי למריסטמה. נמצא שפעילות אינברטאז דופן מוגברת גורמת להאצת הפריחה ולעליה של כ-30% בתפוקת הזרעים. עליה זו היא תוצאה של מספר תרמילים גבוה, שנגרמת על ידי הסתעפות מוגברת של התפרחת. גם כאן מודגמת חשיבותו של האינברטאז בויסות תהליכים התפתחותיים על ידי קביעת חוזק המבלע של איברים אוגרים (Heyer et al. 2004).

על פי הגישה השנייה, חוזק מבלע מוגדר כיכולת להוריד את ריכוז המומסים באתר פריקת המוטמעים מהשיפה. במקרה זה ההתייחסות הינה לכלל המומסים, ולא באופן ייחודי לסוכרוז (Geiger et al. 1975). לפיכך מבלע חזק יאופיין בקיום מערכת יעילה לסילוק מהיר של המומסים מאתר הפריקה, ויכולת לבודדם בשיטות ביוכימיות או פיזיקליות (Wardlaw 1993). פרוק הסוכרוז על ידי אינברטאז באפופלסט ללא הרחקת תוצרי הפרוק יקטין את קצב הפריקה מהשיפה. במקרים מסוימים נמצא שריכוז הסוכרים באיזורי הפריקה מהשיפה במבלע גבוה מזה שבתאי הכברה או בתאי המקור (Huisinga 1979), לדוגמא, בקנה סוכר (Welbaum et al. 1990). במקרים אלו הזרימה למבלע לא יכולה להיות מוסברת על ידי הפרש בריכוז הסוכרים בין המקור למבלע. יתכן שהמפל האוסמוטי בצינור הכברה עשוי להיות הגורם הקובע, בזרימת לחץ על פי התאוריה של Münch. המפל האוסמוטי עשוי להיות מבוקר על ידי גורמים השונים מההיצע והביקוש של סוכר במקור ובמבלע (Lang et al. 1986). לאור חילוקי הדעות בין החוקרים לגבי הגורם המבקר את קצב הזרימה של מוטמעים בשיפה, נשאלת השאלה אם רמה גבוהה של מומסים באפופלסט של המבלע צפויה להיות קשורה בפעילות מבלע מוגברת. הצפי תלוי בנקודת ההשקפה. אם קצב זרימת המוטמעים נשלט על ידי גרדיאנט בריכוז מומסים או הסוכרוז בין המקור למבלע, צפוי ריכוז מומסים או סוכרוז נמוך. לעומת זאת, אם קצב הזרימה נשלט על ידי הפרש בפוטנציאל המים במערכת ההובלה בין המקור למבלע, ההפך הוא הנכון (Lang et al. 1986). בכל מקרה, על פי שתי הגישות, ישנה חשיבות מכרעת למטבוליזם של הסוכרים בפרי לקביעת ריכוז הסוכרוז באפופלסט.

#### 4. מטבוליזם של הסוכרוז בפרי

##### 1. פרוק הסוכרוז

סוכרוז הוא הפחמימן העיקרי המובל בשיפה במיני צמחים רבים. הוצע כי בצמחים אלה, בקרת הפרוק של סוכרוז במבלע מהווה סמן ביוכימי לחוזק מבלע (Ho 1988). באיברים אלה, בלא תלות אם הסוכרוז המובל נאגר כסוכרוז, הקסוזות או עמילן, פרוק סוכרוז הוצע כצעד ביוכימי הכרחי במסלול הצריכה או האגירה של מוטמעים המיובאים למבלע. לפיכך, אנזימים המפרקים סוכרוז במבלע, יקבעו את יכולת המבלע לייבא מוטמעים, ובכך את חוזק המבלע. בעגבניה למשל, ריכוז הסוכרוז בפרי הוא שקובע את קצב וכיוון ההובלה בצמח (Walker et al. 1978). הקשר המוצע בין מטבוליזם של פחמן במבלע והובלת הפחמן הוא הידרוליזת הסוכרוז, ועל כן צפוי שהוא יהווה מרכיב חשוב בתהליך הפריקה מהשיפה. המרכיב השני הוא הרחקה פיזית של הפחמן מאתר הפריקה לאתר בו הוא מנוצל או נאגר (Walker et al. 1978).

האנזימים מפרקי הסוכרוז הנפוצים ביותר בצמחים הם אינברטאז חומצי ובסיסי

( $\beta$ -D-Frucfuranoside fructohydrolase; EC 3.2.1.26)

וסוכרוז סינתז (UDP-glucose: D-fructose 2-glucosyltransferase; EC 2.4.1.13)

הפירוק של סוכרוז על ידי אינברטאז איננו הפיך, והאנרגיה של הקשר הגליקוזידי אובדת במהלכו. לעומת זאת, הפירוק על ידי סוכרוז סינתז הינו הפיך ואנרגית הקשר נשמרת בתוצר הפירוק (Ho et al. 1991). UDP-glucose

האיזו-אנזימים לאינברטאז מקודדים על ידי משפחות גנים מצומצמות, המכילות עד שני אינברטאזות מסיסות ושישה אינברטאזות דופן בהתאמה. האירגון הגנומי ומבנה האינטרון-אקסון נראה שמור בין הגנים לאינברטאזות מחד פסיגיים ודו פסיגיים. מרכיב מיוחד הוא המיני-אקסון של תשעה חומצות גרעין בלבד, אשר נמצא בכל הגנים לאינברטאז חוץ מאחד (Roitsch et al. 2004). הוא מקודד לשלוש חומצות אמינו של האיזור השמור N-DPN-G/A, אשר נפרש על פני שלושה אקסונים ונמצא באינברטאזות מצמחים, בקטריות ושמרים. הסידור העוקב בטאנדום של אינברטאז דופן מתפוח אדמה ועגבניה, כנראה, שמור גם בזנים אחרים. כניסת טרנספוזון זוהתה באינטרון הארוך (עד 2400 bps) הראשון, של אינברטאז מסיס מגזר ואינברטאז דופן מעגבניה (Roitsch et al. 2004).

לרב מייחסים תפקיד לפירוק סוכרוז בבקרת החלוקה של מוטמעים תוך התבססות על פעילות אנזימים אלה במבלעים, בהקשר לקצב צבירת החומר היבש במבלע (Johnson et al. 1988), או למסלול הביוכימי לניצול או אגירה של מוטמעים המיובאים לרקמת המבלע (Doehlert 1990). המיקום של פירוק הסוכרוז במדורים השונים של התא- דופן התא, ציטופלסמה או חללית, עשוי לרמוז על התפקידים השונים של תהליך זה בבקרת היבוא של מוטמעים. לדוגמא, אם פרוק סוכרוז בדופן התא של תאי אגירה הינו אתר בקרה ביבוא מוטמעים, הדבר עשוי להיות על ידי בקרה על פריקת הסוכרים מצינורות הכברה, או קליטה סלקטיבית של סוכרים בקרום התא האוגר. לעומת זאת, אם פרוק הסוכרוז בציטופלסמה מהווה גורם מגביל, למשל כאשר יש קליטה סלקטיבית של סוכרים על ידי הטונופלסט, המידור של סוכרוז לעמילן או סוכרים עשוי להיות נקודת הבקרה.

בהתבסס על ה-pH המיטבי של אנזימים אלה, אינברטאז חומצי עשוי לפעול בדופן התא או בחללית, בעוד שסוכרוז סינתאז עשוי לפעול בציטופלסמה. אינברטאז בסיסי עשוי לפעול בציטופלסמה (Koch et al. 2002). בשמרים גן אחד המקודד לאינברטאז יכול לפעול באיזורים מגוונים בתא לעומת זאת בצמחים, גנים שונים מקודדים לאנזימים הפועלים במדורים שונים בתא (Koch et al. 2002). המיקום התוך תאי והמאפיינים של אנזימים מפרקי סוכרוז מסוכמים בטבלה מס' 1 (Ho et al. 1991).

<u>אינברטאז</u>	<u>סוכרוז סינתז</u>
מיקום תאי	ציטופלסמה
דופן התא (חומצי) ציטופלסמה (בסיסי) חללית (חומצי)	
פעילות	
$Sucrose + H_2O \rightarrow$ glucose + fructose	$Sucrose + UDP \leftrightarrow$ UDP-glucose + fructose
pH מיטבי	7 (בכיוון פרוק) 8 (בכיוון סינתזה)
	4.5 (בדופן) 5-5.5 (בחללית) 7-8 (בציטופלסמה)
Km לסוכרוז (mM)	13-40
	1-9 (בדופן) 2-16 (בחללית) 2-6 (בציטופלסמה)

**טבלה מס' 1:** איפיון אנזימים מפרקי סוכרוז ברקמות מבלע (מתוך Ho et al. 1991).

#### התפקידים האפשריים לפירוק סוכרוז בבקרת היבוא והמטבוליזם של סוכרוז במבלע

א. חשיבות הפרוק של סוכרוז בחלל הבין-תאי

1. במידה שסוכרוז נפרק לאפופלסט, הוא עשוי להשאר שלם ב-pH נייטרלי או בהעדר פעילות אינברטאז, ולהכנס חזרה לשיפה. לעומת זאת, ב-pH נמוך האינברטאז פעיל והסוכרוז יתפצל לשני ההקסוזות. הוצע שהאינברטאז, המופעל על ידי pH נמוך, משמש כשסתום המונע טעינה מחדש של סוכרים לשיפה, וכתוצאה מפעילותו נוצרת תנועה חד-כיוונית של פריקה מהשיפה (Eschrich 1980).
2. במידה שלריכוז מומסים פעילים אוסמוטית באפופלסט חשיבות בפריקת הסוכרוז מהשיפה, עשוי להיות לאינברטאז חומצי באפופלסט תפקיד נוסף. (Wolswinkel & Ammerlaan 1984) מצאו שבזרעי קטניות, במהלך פריקת סוכרוז מהשיפה נוצר פוטנציאל מים נמוך יחסית

באפופלסט כתוצאה מזרימת הסוכרוז כתמיסה. אולם, פוטנציאל זה אינו נמוך דיו על מנת לאפשר המשך זרימת סוכרוז בקצב רגיל בשיפה. הפיכת הסוכרוז להקסוזות על ידי אינברטאז חומצי באפופלסט, עשוי להוריד את הפוטנציאל האוסמוטי של תמיסת האפופלסט, ובכך לאפשר את המשך ההולכה בשיפה (Wolswinkel 1985). ניסויים שנערכו בזרעי תירס על איזו-אנזים ספציפי לאנדוספרם המקודד לאינברטאז דופן, הראו כי במוטנטים בהם ירדה פעילות האנזים לרמה של כ-6% מתירס הבר, הופרעה ההתפתחות הנורמלית (Cheng et al. 1996). אינברטאז הדופן מפקח הן על כוח המבלע של האנדוספרם המתפתח והן על היציבות ההתפתחותית של תאי האם בגבעול בצורה המגבילה על פי רמתו. תצפיות אלה מספקות תובנה משמעותית לגבי תפקידו הפיזיולוגי של האינברטאז בקביעת הכוח האוסמוטי ובבקרה שלו על ההתפתחות בזרע (Cheng et al. 1996). בעבודה אחרת על קטניות שונה מאזן הסוכרים במהלך התפתחות הזרע, על ידי ביטוי של אינברטאז ממקור שמרי בשעועית תחת פרומוטר מתאים. רצף אותות הנחה את האינברטאז לאפופלסט בעוברים מתבגרים. רמת הסוכרוז ירדה בעוד הקסוזות רבות נצטברו בקוטיילדון, כמו כן נצפתה ירידה משמעותית בעמילן, חלליות התאים היו מוגדלות וזרעים יבשים התקמטו. גם כאן הראו כי שינוי בריכוז הסוכרוז שנובע מביטוי יתר של אינברטאז בשעועית טרנסגנית גורם לשינויים בריכוז הסוכרים (Weber et al. 1998).

3. אם, בניגוד למוצע בסעיף 2, קצב הזרימה של סוכרוז תלוי במפל הריכוזים של סוכרוז בין המקור למבלע, ריכוז סוכרוז נמוך באפופלסט יגביר את הזרימה למבלע, כאשר הפריקה הינה לאפופלסט. לפיכך פעילות אינברטאז גבוהה באפופלסט, עשויה להוריד את ריכוז הסוכרוז באפופלסט ובכך להגדיל את קצב הזרימה למבלע. (Wyse 1983)
4. במידה שקיימת קליטה סלקטיבית של סוכרים דרך קרום התא של המבלע, לפירוק הסוכרוז על ידי אינברטאז חומצי באפופלסט עשוי להיות תפקיד בבקרת הקליטה של סוכרים (Ho et al. 1991). לדוגמא, בגבעולי קנה סוכר הראו שפרוק הסוכרוז מהווה דרישה מוקדמת לקליטתו. כאשר עוכבה פעילות האינברטאז על ידי הוספת נוגדן כנגד האינברטאז, נמצאה ירידה משמעותית בקליטה של סוכרוז אך לא של גלוקוז (Bowen et al. 1972). בניגוד לזאת מצאו Thom & Maretzki (1990) שפלאורוסוכרוז, שאינו מתפרק על ידי אינברטאז נקלט בתאי גבעול של קנה סוכר. בדיסקיות פרי של עגבניה נמצא כי פלאורוסוכרוז יכול להכנס לתא (Damon et al. 1988). נראה כי הן סוכרוז והן הקסוזות נקלטים על ידי תאי אגירה של קנה סוכר ועגבניה. מאחר שקצב קליטת גלוקוז גדול בהרבה מקצב קליטת סוכרוז, הידרוליות הסוכרוז גם אם אינה צעד הכרחי לקליטת סוכרוז, עדיין מהווה שלב בקרה לקליטתו (Ho et al. 1991).



פירוק סוכרוז בחלל הבין תאי נחקר ואף בודדו אינברטאזות קשורות דופן. בעגבניה שובט ורוצף אינברטאז שהראה פעילות בפרקציה שהופקה מדופן תאי הפרי (Sato et al. 1993). השבט שרוצף היה בעל 2363 bps והכיל מסגרת קריאה שהכילה 1908 bps שקודדה לפוליפפטיד של 636 חומצות אמינו. כמו כן Sato et al. (1993) הראו כי ביטוי האנזים משתנה לאורך התפתחות פרי העגבניה, כך שהרמה נמוכה בפרי ירוק והיא עולה במשך הבשלת הפרי.

#### ב. פרוק סוכרוז בציטופלסמה

בתאי מבלע האוגרים סוכרוז בוקואולה, אין ככל הנראה תפקיד לפרוק סוכרוז על ידי סוכרוז סינתז בהעברת סוכרוז דרך הטונופלסט, במידה שסוכרוז הוא הסוכר שקליטתו מועדפת. בצמחים האוגרים הקסוזות בחללית, כגון עגבניה וענבים, עשוי פירוק ציטופלסמטי של הסוכרוז על ידי סוכרוז סינתז להוות צעד הכרחי, במידה שהקליטה דרך הטונופלסט ייחודית להקסוזות. דבר זה עשוי להיות הכרחי במידה שהקליטה לתאים הינה סימפלסטית או אינה כוללת פרוק על ידי אינברטאז חומצי באפופלסט. תפקיד נוסף עשוי להיות לסוכרוז סינתז באספקת אבני בנין ליצירת עמילן (Ho et al. 1991).

#### ג. פרוק סוכרוז בחללית

איברים האוגרים כמויות ניכרות של סוכרוז בוקואולה מאופיינים ככל הנראה באיבוד פעילות האינברטאז החומצי בחללית (Schaffer et al. 1987). מאחר שהסוכרוז נאגר באותו מדור בו ממוקם האינברטאז החומצי המסיס (Leigh et al. 1979), אין באפשרותו להאגר ללא איבוד פעילות האינברטאז. ברקמות האוגרות סוכרוז נמצא במקרים רבים כי מתרחש שינוי מטבולי במהלך ההתפתחות. בשלב ההתפתחות הראשוני, רמת האינברטאז החומצי המסיס גבוהה באופן יחסי, והיא יורדת במקביל לאגירת הסוכרוז. מעבר מטבולי כזה נמצא בקנה סוכר (Hatch et al. 1963), סלק סוכר (Giaquinta 1979), מלון (Schaffer 1987), גזר (Ricardo et al. 1970), פפיו (Schaffer et al. 1989), הדרים (Kato et al. 1978), ובצמחים נוספים (Avigad 1982).

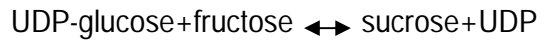
#### 2. ביוסינתזה של סוכרוז

בצמחים מסוימים נמצא שיש אפשרות לסינתזה של סוכרוז בפרי, הן בעבודות עם פרי שלם, הן עם דסקיות פרי, והן עם פרוטופלסטים מבודדים. בדיסקיות פרי של מלון מתוק, צמח המוביל סטכיוז בשיפה ואוגר סוכרוז בפרי, נמצא כי היתה סינתזת סוכרוז מגלוקוז מסומן שניתן לדיסקיות (Schaffer 1987). בצמח העגבניה המוביל סוכרוז נמצא שיש סינתזה של סוכרוז למרות שבעגבנית התרבות אין אגירה של סוכרוז. בפירות שלמים של עגבניה להם הזרק גלוקוז מסומן נמצאה סינתזה סוכרוז שהוגברה עם קרור הפרי (Walker et al. 1978).

בצמחים קיימים שני מנגנונים המובילים לסינתזת סוכרוז. בשניהם, תורם הגלוקוז הינו UDP-glucose:

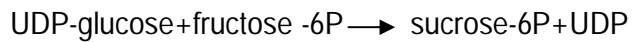
א. סוכרוז סינתז

(UDPglucose:D-fructose-2-glucosyltransferase; EC2.4.1.13)



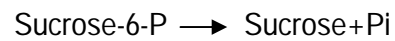
ב. סוכרוז פוספט סינתז

(UDPglucose:D-fructose-6-phosphate 2-glucosyl-transferase; EC 2.4.1.14)



אנזים זה פועל במשותף עם האנזים סוכרוז פוספט פוספטז

(Sucrose-6-phosphate phosphohydrolase, EC 3.1.3.0) ליצירת סוכרוז



(Salerno et al. 1978).

למרות הקיום של שני מנגנונים ליצירת סוכרוז בצמחים, נוטים ליחס את התפקיד המרכזי בסינתזת סוכרוז לסוכרוז פוספט סינתז. התפקיד הפיזיולוגי של סוכרוז סינתז הינו ככל הנראה בכיוון של פרוק הסוכרוז (Doehlert et al. 1991). השערה זו מבוססת על עדויות ניסיוניות, נתונים קינטיים אודות שני האנזימים, ומיקומם ברקמות השונות של הצמח במהלך ההתפתחות. המיקום התוך תאי של שני האנזימים הוא ככל הנראה ציטופלסמטי (Avigad 1982). אולם למרות זאת, במקרים מסוימים עשוי להיות לסוכרוז סינתז תפקיד בסינתזת סוכרוז. בטונופלסטים של סלק נמצאה סינתזת סוכרוז על ידי סוכרוז סינתז והוצע כי אנזים זה קשור באופן רופף לטונופלסט (Goldschmidt et al. 1977). בפקעות של תפוחי אדמה הוצע כי *in vivo* האנזים פעיל הן בכיוון הפירוק והן בכיוון הסינתזה בהתאם לריכוזי המטבוליטים המצויים בכל פרק זמן (Geigenberger et al. 1993). משפחת הגנים המקודדים לאנזים בודדה בשלמותה בארבידופסיס, שישה גנים מקודדים לאנזים סוכרוז סינתז במגוון רחב של רקמות, שלבים התפתחותיים ותנאי סביבה שונים (Baud et al. 2004). שלושה גנים בודדו ואופיינו בהדרים (Komatsu et al. 2002).

סוכרוז פוספט סינתז מוכר כאנזים המשתתף בבייסינתזה של סוכרוז בעלי המקור וחשיבותו ברקמת המבלע לא נחקרה במידה רבה. בניגוד לסוכרוז סינתז שפעיל הן בכיוון הפרוק והן בכיוון הסינתזה של סוכרוז (Geigenberger et al. 1993), האנזים סוכרוז פוספט סינתז פעיל בכיוון הסינתזה בלבד ופעילותו כמעט אינה הפיכה (Barber 1985). לינגל ודנלופ (Lingle et al. 1987), מצאו עליה במידה מסוימת בפעילות סוכרוז פוספט סינתז במהלך הבשלת פרי מלון במקביל לאגירת הסוכרוז, אולם עליה זו לא היתה משמעותית ביותר. ברמה המולקולרית בודדו 3 משפחות גנים המקודדות לסוכרוז פוספט סינתז, הגנים ממשפחה A – הם הדומיננטיים ביותר ונמצאו מקודדים לאנזים במספר מגוון של רקמות ותנאי סביבה (Langenkamper 2002), גם הגנים הקשורים למשפחה B נפוצים מאוד ברקמות צמחים. בהדרים בודד גן אחד מכל משפחה (Komatsu et al. 1999).

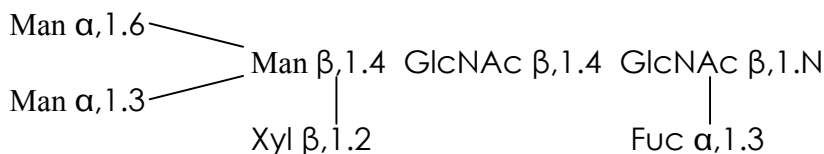
## ו. אינברטאז חומצי

### 1. משקל מולקולרי, pH ומבנה

האנזים אינברטאז נפוץ בעולם הצמחים ומספר רב של מחקרים המתארים את נוכחותו פורסמו. העבודה והידע המפורטים ביותר על המבנה המולקולרי והפעילות של אינברטאז מקורה במחקר בשמרים ובאנזים ממקור פטרייתי. אינברטאז שבודד משמרים, נמצא בעל טווח משקלים מולקולריים בין 150-300 kDa בהתאם לתכולת הסוכר בו. האנזים מכיל שתי תת-יחידות חלבוניות במשקל מולקולרי של כ-60 kDa כל אחת. (Avigad 1982).

הנסיגות הראשונים לנקות חלקית את האינברטאז מצמחים, היו מענבים (Arnold 1965), משעועית (Frost et al. 1968) ותפוחי אדמה (Pressey 1966, Frost et al. 1968). מאוחר יותר, נוקה האנזים אינברטאז מחיטה ונמצא כי משקלו המולקולרי 100 kDa (Roberts 1973), משעורה (Prentice et al. 1976) במשקל מולקולרי 92 kDa (Prentice 1972), מפירות הדורים במשקל מולקולרי 69 kDa (Kato et al. 1978), סלק סוכר במשקל מולקולרי 28 kDa (Masuda et al. 1980), מפירות בננה במשקל מולקולרי 22 kDa (Sum et al. 1980), מנבטי צנון במשקל מולקולרי 48.5 kDa (Faye et al. 1981), מ-*Heliantus tuberosus* (ארטישוק ירושלים), במשקל מולקולרי 51 kDa (Goupil et al. 1988), מפירות אגס יפני במשקל מולקולרי 80 kDa (Hashizume 2003), מעלי קנה סוכר במשקל מולקולרי 130 kDa (Sampietro et al. 1980), וממיץ קנה סוכר במשקל מולקולרי 380 kDa (Rosario et al. 1977). באינברטאז שנוקה מעלים של קיקיון נמצא כי הצורה הפעילה של האנזים מורכבת משלוש תת יחידות, שמשקלן המולקולרי הוא 11 kDa כל אחת. הוצע כי האנזים מורכב משתי תת יחידות יחידה אחת מפעילה במשקל כולל של 33 kDa (Prado et al. 1985). בגזר נוקה אינברטאז הקשור לדפנות מתאים בתרבית, ומשקלו המולקולרי נמצא 63 kDa (Laurière et al. 1988). מפפאיה בודד אנזים קשור דופן בגודל 73 kDa (Zhou et al. 2003). מפירות עגבניה נוקו שתי פרקציות של אינברטאז הקשור לדופן התא שניהן במשקל 58 kDa (Nakagawa et al. 1971). ממלון בודדו מספר יחידות של אינברטאז מסיס בגדלים של 75 kDa, 52 kDa, 38 kDa ו-25 kDa (Lester et al. 2001). יחד עם התפתחות הפרי נצפתה גם ירידה בפעילות האנזים וכן העלמות הדרגתית של היחידות הגדולות בהתאם. גודלן של רוב היחידות שנוקו קטן בכשליש מהגודל שהיה צפוי להתקבל על פי השבטים שבודדו. יתכן שכל יחידה ממלאת תפקיד שונה, הבדל של חומצה אמינית אחת יכול לשנות את ה-pH האופטימלי ולקבוע את ייחודיות המצע של אנזים קשור דופן או מסיס בחללית. לא ברור אם יחידה אחת או כולן תורמות לפעילות האנזימתית שנמדדת במקביל, כיוון שהימצאות יחידה כזו או אחרת אינה בהכרח מרמזת על כך שהיא זו הפעילה.

במחקרים שהוזכרו לעיל, בהם נוקה האינברטאז מצמחים שונים, נמצא כי ה-pH המיטבי לאינברטאז החומצי נע בטווח הרחב שבין 3.5 ל-5.6 והוא נחשב בכל המקרים לאינברטאז חומצי. בשמרים, נמצאו שלוש מולקולות שונות של אינברטאז: 1. אנזים בעל משקל מולקולרי גבוה שהינו בעל שייר סוכרי וממוקם בחלל הפריפלסמי של התא. 2. אנזים תוך תאי חסר שייר סוכרי או בעל שייר סוכרי קטן ביותר. 3. אנזים בעל שייר סוכרי בינוני הקשור לקרום התא. שלושת סוגי האינברטאז מקורבים, מאחר שהם מייצגים שלבים שונים במסלול הסינתזה של מולקולת גליקופרוטאין אחת. תרומת שייר הסוכר למשקל האינברטאז משמרים נעה בין 30% ל-60%. כל תת-יחידה של האנזים מכילה תשע שרשראות סוכריות הקשורות בקשר N-אספרגין. השרשראות בנויות מיחידות מסועפות של  $\alpha$ -מנופירנוזיל. טיפוס האנזים המכיל את הרמה הגבוהה ביותר של סוכר מהווה ככל הנראה את הפרקציה החוץ תאית המסיסה (Avigad 1982). גם בצמחים אינברטאז חומצי הינו גליקופרוטאין. עוד בשנת 1966, הראה ארנולד (Arnold 1966) כי האינברטאז שנוקה חלקית מענבים מכיל כ-25% פחמימות. גם בצמחים אחרים נמצא מרכיב פחמימני באנזים המנוקה כגון: ממיץ קנה סוכר 22% סוכר (Rosario et al. 1977), משעורה 49% סוכר (Prentice et al. 1976), מזרעי צנון 7.7% (Faye et al. 1981), ובעגבניה 5.3%-9.1%, בהתאם לפרקציה (Nakagawa et al. 1971). בנוסף לממצאים אלה, נמצא כי מיצוי אינברטאז משעורה (Prentice et al. 1976), קנה סוכר (Rosario et al. 1977), צנון (Faye et al. 1981), ובננה (Sum et al. 1980), הינו בעל זיקה גבוהה ללקטיין Concanavalin A הקושר באופן ייחודי חד סוכר - מנוז. Laurière et al. (1989) פרסמו את המבנה המוצע לשייר הסוכרי של מולקולת האינברטאז הקשור לדופן התא בגזר. הם השתמשו בנוגדנים שהוכנו נגד החלק הסוכרי של האנזים. נוגדנים אלה נקשרו לשייר הסוכרי של גליקופרוטאינים צמחיים מסוימים בעלי מבנה סוכרי דומה. בנוסף לכך, בדקו את קשירתו של הנוגדן הנ"ל לשיירי סוכר שונים המקובעים לקולונת ספרוז ואת עיכוב הקשירה על ידי הפטנים שונים. על סמך ניסיונות אלו הוצע כי מבנה השייר הסוכרי של האינברטאז הקשור בגזר, עשוי להיות דומה לזה של מספר גליקופרוטאינים וקואולריים צימחיים, שבהם הסוכר קשור לאספרגין. מבנה זה מתואר בתרשים 1.



**תרשים 1:** מבנה אופייני של שייר סוכרי מורכב הקשור לאספרגין במספר גליקופרוטאינים (Laurière et al. 1989).

המרכיב הסוכרי אינו חשוב ככל הנראה לפעילות האינברטאז (Faye et al. 1981), וכן נראה כי אינו בעל חשיבות בהכוונת האנזים למדור הסופי. תפקידו של השייר הסוכרי של האינברטאז הינו כפי הנראה לייצב את האנזים ולהגן עליו מפני עיכול פרוטאוליטי. נמצא כי כאשר מעוכבת יצירת השייר הסוכרי על גבי האינברטאז על ידי טוניקמיצין, הוא מופרש מפרוטופלסטים מבודדים אך נראה כי הוא עובר פירוק לאחר מכן (Faye et al. 1981).

## 2. מידור

מספר רב של מחקרים נערכו אודות המיקום התוך תאי של האינברטאז (Faye et al. 1981). שטיפות חוזרות של דפנות תאים מבודדות הכילו חלק ניכר מהאינברטאז החומצי שבריקמה (Little et al. 1973). ניסיונות ראשוניים לשחרר את האנזים ממקטעי דפנות תאים לא הוכתרו בהצלחה. (Edelman et al. 1965). בתאי סלק סוכר נמצא אינברטאז מסיס, וכן שלושה טיפוסים של אינברטאז הקשורים לדפנות התאים. הראשון ניתן לשחרור מהדפנות על ידי מלח, השני על ידי EDTA, והשלישי נותר קשור בחוזקה לדפנות התאים (Masuda et al. 1988). עדויות ניסיוניות רבות עשויות להצביע על כך ש- *in vivo* האינברטאז ממוקם לפחות בחלקו באפופלסט (Koch et al. 2002). אמיתות המסקנות לגבי מידור האינברטאז, המבוססות על מיצוי בלבד, מוטל בספק. המצאות אינברטאז קשור למקטעי דפנות תאים לאחר פרקציונציה, אינו בהכרח מעיד על המצאות האנזים במיקום זה *in vivo*. לדוגמה, בענבים המצאות אינברטאז קשור, עשוי לנבוע מארטיפקט הנוצר במהלך מיצוי האנזים. האנזים המסיס יוצר קשר עם טנינים המצויים במיצוי ונקשר דרכו לדפנות התאים (Hawker 1969). טנינים נקשרים לחלבונים בשני סוגי קשרים: קשר מימני בין קבוצת ההידרוקסיל של הפנול בטנין, לבין הקשר הפפטידי של החלבון, וקשר קוולנטי בין קבוצת הקווינון בטנין לקבוצה פעילה בחלבון (Rhodes 1977). בענבים, כאשר נעשה המיצוי בתוספת בורט, המפרק את הקשר בין הטנינים לחלבון, נמצא כל האינברטאז במקטע המסיס (Hawker 1969). בנוסף לכך נמצא כי לחוזה היוני של בופר המיצוי וכן ל-pH, ישנה השפעה על מידת הקשירה של האינברטאז לדפנות התאים.

בריקמת אגירה של גזר, נמצא כי מיצוי האינברטאז ב-pH חומצי גרמה להכללת מרבית האנזים במקטע של דפנות התאים. לעומת זאת, במיצוי בבופר ניטרלי או בסיסי נמצאה מרבית הפעילות במקטע המסיס (Ricardo et al. 1970). ב-*Heliantus tuberosus*, נמצא כי הגדלת החוזה היוני של בופר המיצוי גורמת לשחרור אינברטאז חומצי מדפנות תאים (Little et al. 1973). קיימות הוכחות עקיפות לגבי המידור של אינברטאז. לדוגמה, בקנה סוכר נמצא כי ה-pH המיטבי וכן ה-Km של האינברטאז המסיס שונה באופן מהותי מזה של האנזים הקשור (Hatch et al. 1963). יתכן שקשירת האנזים לדפנות תאים עשויה לגרום לשינוי בתכונות אלה, אולם, מאחר שההבדלים הם כה משמעותיים, לא סביר כי זהו ארטיפקט. ניסיונות שנעשו בפרוטופלטים מבודדים של שורשי סלק, תירס ותאי טבק הראו כי האינברטאז ממוקם ברובו בחללית התא (Avigad 1982). בסלק סוכר, בודדו חלליות מרקמת האגירה. על סמך הניצולת של בטנין, הממוקם באופן בלעדי בחללית, הוכח כי חלק ניכר מהאינברטאז ממודר אף הוא בחללית (Leigh et al. 1979).

על מנת לקבל הוכחה ישירה יותר לגבי המידור של האינברטאז, ניקו Iki et al. (1977) אינברטאז קשור מפירות עגבניה, והכינו נגדו נוגדנים. נוגדנים אלה שימשו לאיפיון המיקום של האנזים בשיטות אימונו-פלוואורסנציה במיקרוסקופ אור. התקבל סימון פלוואורסנטי בדפנות התאים, אולם השיטה אינה אמينة דיה בגלל רקע הנובע מאוטו-פלוואורסנציה ומחוסר המיקוד של הסימון (Iki et al. 1977).

Chapman et al. (1988), פיתחו שיטה ציטוכימית לאיתור המיקום של פעילות אינברטאז ברקמות צמחיות. בעזרת שיטה זו הראו כי ב-*Heliantus tuberosus* מתקבלת צביעה לפעילות אינברטאז בדפנות התאים של חתכים למיקרוסקופ אור שהוכנו מהפקעת. גם בשיטה זו הצביעה אינה ממוקדת. מכל המחקרים אודות המיקום של אינברטאז בתא ישנן ראיות המצביעות על כך שהוא ממודר בצורה מסיסה בוקואולה ובצורה קשורה לדופן התא.

הוכחות למידור איזו-אנזימים של אינברטאז הוצגו בזני עגבניה (Miron et al. 2002), על ידי בחינה של אנזים מסיס ומשפחה של אנזימים אפופלסטיים. Miron et al. (2002) הראו כי ביטוי האנזימים האפופלסטיים אינו תואם את ההבדלים בפעילות אינברטאז קשור דופן ולא יכול להסביר את העליה בפעילותו בפרי הבוגר. דווקא דגם הביטוי של האנזים שנחשד כמסיס הוא זה שיכול להחשב כגורם לשינויים ברמת הפעילות של האנזים המסיס וכן גם הקשור. מכאן שפעילות אינברטאז קשור היא תוצר של הגן לאינברטאז שנחשב היה כמסיס. כדי לאשר ממצא זה נבדק מיקומם בתא של חלבוני האינברטאז המסיס *in vivo* באמצעות נוגדנים. Miron et al. (2002) הוכיחו כי האנזים שנחשד כמסיס נמצא גם בחללית התאים וגם באפופלסט לאורך התפתחות פרי העגבניה.

בנוסף למאמץ לאפיין את פעילות האנזים במקטעים השונים נעשה מאמץ מולקולרי לשיבוט הגנים המקודדים לאנזים, כיום ניתן לשער את ייעוד האנזים במקטעים השונים לפי הרצף של הגן המקודד לו (Koch et al. 2002).

### 3. בקרת הפעילות של אינברטאז

פעילות אינברטאז חומצי גבוהה בדרך כלל ברקמות הנמצאות בשלב גידול נמרץ כגון: קודקוד השורש, עלים, מפרקי הגבעול, קודקודי הגבעול בזמן התפתחות הגבעול, תרבויות קאלוס מתפתחות ופירות מבשילים. ברקמות בוגרות, בהן נאגר סוכרוז, רמת האינברטאז לרב נמוכה ביותר (Hawker 1985), (Avigad 1982). בפירות עגבניה, נמצא כי במהלך ההבשלה ישנה עליה משמעותית בפעילות אינברטאז חומצי (Manning et al. 1975). העליה בפעילות האנזים עשויה לנבוע מסינתזת החלבון *de novo*, משפעול של צורה לא פעילה של האנזים, או מהעלמות של מעכב אנדוגני. Iki et al. (1978) הראו בעזרת נוגדנים כנגד אינברטאז קשור, כי ישנה עליה בפעילות האימונולוגית של האנזים במקביל לפעילות המטבולית במהלך ההבשלה. הם הסיקו כי העליה בפעילות נובעת ככל הנראה מעליה בביוסינתזה של האנזים עם ההבשלה. מסקנה דומה עלתה באנזים קשור דופן בפפאיה (Zhou et al. 2003), כאשר נצפתה עליה ברמת ה-mRNA ובסימון האימונולוגי לאורך ההתפתחות וירידה עם הבשלת הפרי, לעומת זאת פעילות האינברטאז דווקא עלתה עם הבשלת הפרי. התופעה מוסברת בכך שישנה בקרה שלאחר התרגום, על ידי הצטברות אינברטאז לפני שיא הפעילות האנזימית.

בצמחים אחרים נמצא כי פעילות אינברטאז מבוקרת באמצעות מעכבים. מעכב האינברטאזות הראשון בודד מפקעות תפוחי אדמה עוד בשנת 1966 (Pressey 1966). נמצא כי מעכב זה יעיל לא רק לאינברטאז מתפוחי אדמה אלא גם לאינברטאזות מצמחים אחרים בהם ה-pH המיטבי הינו בסביבות

4.5 (Pressey 1967). מאוחר יותר, בודדו מעכבים גם מסלק סוכר, סלק אדום ושורשי בטטה (Pressey 1968), מאנדוספרם של תירס (Jaynes et al. 1971), מטבק (Greiner et al. 1998) וכן מארבידופסיס (Rausch et al. 2004). בעגבניה, אובחנה נוכחות גבוהה של אינברטאז לאורך התפתחות הפרי, יחד עם זאת ניכר שינוי רב ברמת פעילות החלבון אשר מתגברת לקראת הבשלת הפרי (Husain et al. 2001), הבדל זה נובע עקב שינוי ברמת האקטיבציה של האינברטאז ופחות כתוצאה מהכמות הכללית של החלבון בתא. Husain et al. (2001) הציעו שההבדל ברמת הפעילות, שבין שלבי התפתחות הפרי, נגרם על ידי שינויים בכמות חלבונים מעכבי אינברטאזות.

המבנה הכימי של המעכב הוגדר בפקעות תפוחי אדמה. המעכב אופיין כחלבון במשקל מולקולרי נמוך 17-19 kDa, אשר נקשר באופן בלתי הפיך לאנזים (Matsushita et al. 1976, Pressey 1967), בדומה שובט ואופיין מעכב בגודל 18 kDa מטבק, אשר נקשר באופן ספציפי לאינברטאז אפופלסטי וביטויו משתנה לאורך ההתפתחות בהתאם לכל איבר בצמח (Greiner et al. 1998). לאחר הבנת המבנה שלו הועלו השערות באשר לתפקידו הפיסיולוגי בצמח.

לימוד היחסים בין רמת פעילות אינברטאז ורמת המעכב בפקעות תפוחי אדמה ובטבק, תומך בהשערה שלקשר זה תפקיד בבקרת פירוק הסוכרוז ברקמה. הוצע כי עליה בפעילות אינברטאז הנגרמת מטיפול בקור, או פציעה מכנית, נובעת בחלקה מירידה בקשירה של המעכב (Pressey 1967), (Ewing et al. 1977, Matsushita et al. 1977, Pressey 1966). נראה גם כי הרמה והמידור של האינברטאז והמעכב עשוי להשתנות במהלך השלבים השונים של התפתחות השורש (Avigad 1982).

עקה הנגרמת כתוצאה ממחסור במים היא גורם נוסף המשפיע על רמת שיעתוק ופעילות אינברטאז (Kim et al. 2000). בניסויים שנערכו באיברי מקור ומבלע וגטטיביים של תירס הראו הצטברות של חלבון, פעילות גבוהה וכן עליה בכמות השעתוק של אינברטאז בתאים הסמוכים לצרורות צינורות ההובלה. הציעו לאינברטאז תפקידים כמבקר מערכת האותות המועברים על ידי הקסוז וכן בבקרת שינוע סוכרוז ויצירת איברי מבלע תחת לחץ של מחסור במים. כנראה שפעילותו של אחד מהאיזו-אנזימים, הפועלים בחללית של תאי עלי תירס תחת עקת מחסור במים, עולה בהתאם להצטברות חומצה אבסיסית בעצה (Trouverie et al. 2003). נמצא שלסוכרוז אין קשר עם עליית פעילות האינברטאז ודווקא העליה בריכוז החומצה האבסיסית היא שמשפיעה כמשרן ומגבירה את שיעתוק האינברטאז ופעילותו בחללית.

#### 4. מטבוליזם של סוכרוז בפירות הדר

אינברטאז - Kato et al. (1978) חקרו את הפעילות של אינברטאז בפירות מנדרינות מהזן סטצומה. בשקיקי מיץ של פירות לא בשלים הם מצאו אינברטאז חומצי ואינברטאז ניטרלי כאשר רמת הסוכרוז היתה נמוכה. עם זאת בשקיקי המיץ הלא בשלים רמת אינברטאז חומצי היתה גבוהה יותר מאשר האינברטאז הניטרלי. עם התקדמות ההבשלה הם מצאו שבשקיקי המיץ היתה פעילות של אינברטאז ניטרלי והיתה ירידה בפעילות של אינברטאז חומצי. פעילות אינברטאז חומצי בשקיקי מיץ של פירות סטצומה צעירים, שנבדקה לאחר ריסוק ומיצוי עם בופר פוספאט ציטראט, היתה בעיקר במקטע המסיס (של המיצוי). רב האנזים החומצי מוצה בקלות, בהבדל ממקרים אחרים בהם אינברטאז חומצי קשור בצורה יותר חזקה לדופן. פעילות אינברטאז ניטרלי היתה במקטע הבלתי מסיס של המיצוי. חוסר המסיסות שלו במים ואחרי כן בבופר, הראה שהאנזים הניטרלי קשור בחזקה לדפנות התאים. התפלגות אינברטאז ניטרלי בין המקטע המסיס לבלתי מסיס השתנתה במשך התפתחות הפרי (Tomlinson et al. 1991, Kato et al. 1978). טענו, שבהסתמך על התוצאות של אינברטאז ניטרלי בסטצומה ובהשמטת ההידרוליזה של סוכרוז, קשה לתת הסבר ברור על פעילות האנזים.

פעילות אינברטאז נבדקה באשכוליות בפרי בשל, הבדיקות נעשו באלבדו, בצורות הצינורות שליד הזירים של שקיקי המיץ, באפידרמיס ובשקיקי המיץ. לא נמצאו הבדלים משמעותיים בפעילות בין הרקמות בין אינברטאז ניטרלי מסיס לבין אינברטאז חומצי מסיס, באלבדו לא נמצאה כל פעילות של אינברטאז (Lowell et al. 1989). פעילות אינברטאז חומצי מסיס אופיינה במספר עבודות שבחנו את מעורבות האנזימים במטבוליזם של סוכרוז בשלבי התפתחות הפרי במיני הדרים שונים (Lowell et al. 1989, Tomlinson et al. 1991, Tzur et al. 1992, Echeverria et al. 1997, Echeverria 1990, Kubo et al. 2001). בכל העבודות הנ"ל נראו רמות גבוהות של פעילות אינברטאז מסיס בשלב ההתפתחותי הראשון של פירות הדר. באשכולית נראית ירידה חדה ברמות פעילות האנזים עם המעבר לשלב התארכות התאים (Lowell et al. 1989). לפיכך מוצגת ירידה ברמת האינברטאז המסיס כתנאי לצבירת סוכרוז בפרי, תופעה הידועה גם במערכות אחרות (Koch 2004). מגמה דומה של ירידה בפעילות האנזים עם התפתחות הפרי נראית בסטצומה (Kubo et al. 2001). עם זאת עליה מחודשת ברמת פעילות האנזים מופיעה במינאולה ובמורקוט בשלב הבשלת הפרי (Tzur et al. 1992), לאחר הירידה האופיינית בפעילות האנזים שבין שני השלבים הראשונים. בליים מתוק מוצגת פעילות האנזים לאורך כל שלבי התפתחות הפרי בציפה, בניגוד למה שנראה באשכולית ובמנדרינות. כמו כן רמת הסוכרוז בליים המתוק נמוכה ביותר ומהווה רק 20% מכלל הסוכרים (Echeverria et al. 1997). בעבודה הנ"ל הוצע שתפקיד האנזים בבניית מפל ריכוזים של סוכרוז לצורך קליטה פאסיבית (ללא צורך בהשקעת אנרגיה) של סוכרוז בחלליות של שקיקי המיץ. בדומה לעבודה בליים המתוק, בעבודה מוקדמת יותר שנעשתה לאורך התפתחות ליים חמוץ (Echeverria 1990), נצפו בשלבים הראשוניים כל האנזימים מפרקי הסוכרוז. פעילות האנזימים ירדה בצורה תלולה עד היעלמותם



בשלב שלקראת הבשלת הפרי, אך לא לפני שה-pH בחללית ירד בקירוב ל-2.5 (Echeverria 1990) הראה כי בשלב זה סוכרוז מתפרק על ידי הידרוליזה חומצית. בדרך זו מתקיימת מערכת מיוחדת ומתואמת לפירוק הסוכרוז, אשר בה מעורבים גם תהליכים אנזימטיים וגם תהליכים שאינם אנזימטיים. בשלב הראשון להתפתחות הפרי האנזים יכול להיות מעורב בהספקת אנרגיה לצורך חלוקת התאים (Koch 2004). לא ברור האם יש קשר בין פעילות האנזים בשלב הנ"ל ליכולת הפרי לקלוט סוכרוז ממערכת ההובלה בהתאם למפל ריכוזים (Roitsch et al. 2004).

פעילות אינברטאז נבדקה גם באשכוליות בשלושה שלבים של התפתחות הפרי באותן הרקמות בפרי צעיר ופרי בשל (Tomlinson et al. 1991). הפעילות הספציפית של אינברטאז ניטרלי היתה גדולה יותר בשלב השני בשקיקי המיץ, בזמן התרחבותם וכן באלבדו וזאת בהשוואה לצרורות הצינורות ולאפידרמיס. הפעילות הכללית של אינברטאז ניטרלי, המסיס והלא מסיס, היתה גדולה יותר בשקיקי המיץ בהשוואה לצרורות הצינורות שבאלבדו. פעילות אינברטאז ניטרלי בכל הרקמות בשלב הראשון היתה קטנה בהשוואה לפעילות אינברטאז חומצי, אולם בשלב השני התוצאות היו הפוכות (Tomlinson et al. 1991). עם זאת, ראוי לציין כי האינברטאז הניטרלי נחקר הרבה פחות מאשר האנזימים החומציים ממשפחתו (Koch et al. 2002). פעילות גבוהה של אינברטאז חומצי נמצאה באשכולית בפרי צעיר שהלכה וירדה לקראת השלב של אגירת הסוכרים. האנזים היה פעיל ברקמות הובלה ומבלע בשלב הראשון של התפתחות הפרי וירד אחרי 12 שבועות עד גבול אפשרות הזיהוי. הפעילות בשקיקי המיץ היתה קטנה בהשוואה לצרורות הצינורות ולאלבדו וגם ירדה בשלב השני והשלישי עד גבול הזיהוי (Tomlinson et al. 1991). בדומה לאינברטאז המסיס, גם אינברטאז דופן התא נמצא פעיל באשכולית רק בשלב הראשון של התפתחות הפרי (Lowell et al. 1989), פעילות האנזים ברמה גבוהה מעידה על פירוק מאסיבי של סוכרוז בחלל האפופלסטי. בעבודה של Lowell et al. (1989) הוצע שפעילות האנזים קשורה להקניית כוח המבלע של הפרי הצעיר. איך איננה קשורה באופן ישיר לפריקה אפופלסטית של מערכת ההובלה. בשלב התפתחות הפרי שבו מואטת התרחבות התאים, תפקיד אינברטאז הדופן חשוב למניעת לחץ אוסמוטי המעכב מעבר סימפלסטי, כמו גם חשיבותו בהורדת הלחץ באיזורי הפריקה מהשיפה.

**סוכרוז סינתאז** – פעילות סוכרוז סינתז כמפרק סוכרוז וכמסנתז סוכרוז נחקרה במערכות ההובלה של הפרי (Lowell et al. 1989, Tomlinson et al. 1991). הוא הנחקר ביותר בהקשר להתפתחות פרי ההדר ואף נחשב כאנזים הפעיל ביותר לאורך שלבי התפתחות פרי ההדר. פעילות סוכרוז סינתז המפרק סוכרוז נמצאה בשלב הראשון של התפתחות הפרי באשכולית, פעילות האנזים בשלב זה היתה גדולה יותר בשקיקי המיץ (שאינם קשורים לשיפה) בהשוואה לפעילות בצרורות הצינורות ובאלבדו. פעילות זו של סוכרוז סינתז ירדה בשלב השני והשלישי. בשלב השני והשלישי השתנה היחס כאשר פעילות האנזים היתה גדולה יותר בצרורות הצינורות מאשר בשקיקי המיץ. באלבדו לא זוהתה פעילות של סוכרוז סינתז. גם פעילות האנזים כמסנתז סוכרוז היתה גדולה יותר בשלב הראשון של התפתחות הפרי בצרורות הצינורות וירדה לקראת השלבים השני והשלישי. בשקיקי המיץ היתה פעילות מועטה בשלב הראשון, עלתה לקראת השלב השני וירדה בשלב השלישי (Lowell et al. 1989). רמת פעילות האנזים בכוון סינתזת סוכרוז גבוהה בהרבה מרמת הפעילות הקטליטית של האנזים בסטצומה (Kubo et al. 2001). לכן הוצע שהאנזים מסנתז סוכרוז בשקיקי המיץ תוך שימוש בהקסוז שמקורו במערכת השיפה.

ממצאים דומים של פעילות סוכרוז סינתז המפרק סוכרוז באשכולית נמצאו על ידי Tomlinson et al. (1991), שקבעו שהעליה ברמת הפעילות של האנזים בצרורות הצינורות, מסבירה את מפל הסוכרוז אחרי הפריקה מהשיפה. פעילות ומיקום האנזים משויכת לתאי הלוואי של מערכת ההובלה (Tomlinson et al. 1991). תפקיד האנזים בתאי הלוואי יכול להיות אספקת סובסטרט למערכת הנשימה ולייצור ATP הנצרך בתאי הלוואי לצורך פריקת המוטמעים (Koch 2004). תפקיד אחר לאנזים במערכת ההובלה יכול להיות באספקת UDPG הנצרך לסינתזה של קאלוז הקשור להתפתחות השיפה וסביבתה, סינתזה של קאלוז במערכת ההובלה אופיינית כתגובה לתנאים חיצוניים ובעיקר פציעה (Koch 2004). תפקיד נוסף לפעילות האנזים במערכת ההובלה יכול להיות קשור לויסות רמות הסוכרוז בנקודת פריקת השיפה, דבר היכול לאפשר קליטת סוכרוז בפרי, בהתאם למפל הריכוזים (Komatsu et al. 2002). בעבודה של Komatsu et al. (2002) בודדו שלושה גנים משתי משפחות סטצומה, הגן *Cit SUS1* מראה הומולוגיה למשפחת גנים שהתפתחו בצמחים זו פסיגיים והוא מבוטא בקליפה ובציפה בשלבים הראשונים של התפתחות הפרי. לעומת זאת, מקורו של הגן *Cit SUSA* בצמחים חד פסיגיים וביטויו בפירות ההדר בקליפה ובציפה מתאפיין בשלבים המתקדמים של התפתחות הפרי. פעילות האנזים מוצגת הנ"ל בהתאם לביטוי הגן (Komatsu et al. 2002), לפיכך נראית ירידה בפעילות עם תום השלב הראשון של התפתחות הפרי בקליפה ובציפה ולאחר מכן עלייה בפעילות האנזים במקביל להתפתחות הפרי בקליפה ובציפה.

## - שיטות וחומרים -

### 1. חומר צמחי

במחקר זה השתמשנו בשחלות, חנטים ופירות הדר שנאספו באקראי ממספר עצים מהזנים: קליף אור-1 (Citrus reticulata x temple - Or-1), נלקח מחלקת ניסוי בצפריה. תפוז וושינגטון טבורי (Citrus sinensis [L.] Osbeck cv. Washington Navel), מחוות צריפין. לימטה מתוקה (Citrus limmetioides), מחלקת מרכז וולקני. לימון חמוץ (Citrus limon [L.] Burm cv. Eurika), נלקח מחלקת מרכז וולקני.

### 2. סריקת סיפריית cDNA

בעבודה מקדימה שנעשתה במעבדתו של פרופ' E. Blumwald, בודדו מתוך ספריית cDNA של שקיקי מיץ מתפוז טבורי, שני שבטים בעלי הומולוגיה גבוהה לאינברטאז חומצי מסיס. הם נקראו בכינויים: Vac1 ו-Vac2, תוך הערכה כי הם פעילים בחללית. cDNA של שני השבטים הוחדר לפלסמיד pCR-BluntII-TOPO (Invitrogene), בעל עמידות לקנמיצין. שבטים אלה שימשו כגלאים מסומנים רדיואקטיבית ב- $[\alpha^{32}\text{P}]$  dCTP לסריקה בספריה שהופקה משקיקי מיץ של לימון (הוכנה בעבודה מקדימה של ד"ר אבי צדקה), בקונסטראקט של ספריית cDNA ב-Lambda Zap (Stratagene, La Jolla, CA, USA). השבטים שהתקבלו בודדו על פי הפרוטוקול של Stratagene ונשלחו לריצוף. בעזרת הפריימרים T3 ו-T7 נעשה ריצוף דו כווני במחלקת השירותים הביולוגיים, במכון ויצמן למדע, ברחובות. השבטים שבודדו מלימון עברו טרנספורמציה כווקטורים לחיידקי *E. coli* מין DH5 $\alpha$ , בעלי עמידות לאמפיצילין, בשיטת ה-Heat shock. החיידקים המותמרים נשמרים בהקפאה ב-70°C.

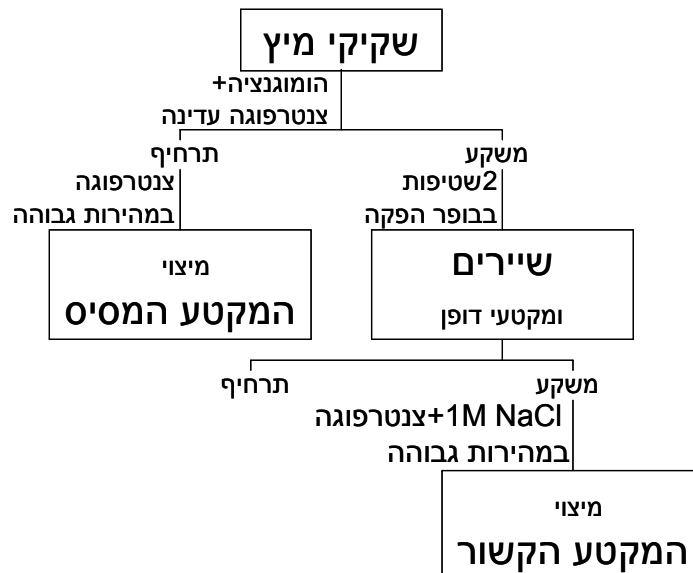
### 3. מיצוי חלבונים

#### 1.3. מיצוי חלבונים מסיסים

מיצוי החלבונים נעשה על ידי ריסוק 5 גרם שחלות, חנטים או רקמת פריקרב קפואה בחנקן נוזלי, על ידי עלי ומכתש, עד טחינתם לאבקה דקה. לאבקה הוספו 10ml של בופר ריסוק: Tris-HCl 100mM (pH 7.5), בתוספת PMSF 1mM, DTT 5mM, PVPP 2% ו-Protease Inhibitor 0.1%. הריסוק נעשה בהומוגניזר מסוג פוליטרון (Kinematica, Basel, Switzerland). המיצוי סורכו ב-18,000g למשך 20 דקות ב-4°C. התרחיף שהתקבל שימש לבדיקת פעילות אינברטאז מסיס, או להמשך טיפול עבור אנליזת חלבונים בגיל על ידי immuno blot. התרחיף שנאסף רוכז על ידי הוספת אצטון ב-0.6 מנפחו, התמיסה עורבבה למשך 10 דקות על הקרח והושקעה על ידי סירכוז עדין ב-5,000g למשך 10 דקות ב-0°C. המשקע הורחף שנית ב-500 $\mu$ l של בופר הריסוק (ללא PVPP).

### 2.3. מיצוי חלבונים קשורים

לשחרור החלבונים הקשורים מהמשקע שהתקבל לאחר מיצוי החלבונים המסיסים, נשטף המשקע פעמיים נוספות בבופר ריסוק, לאחר סרכוז הורחף בבופר ריסוק בתוספת 1M NaCl המשחרר 80% אנזימים הקשורים בקשרים אלקטרוסטטיים לדפנות תאים, סרכוז ב-18,000g למשך 20 דקות ב-4°C. התרחיף הושקע על ידי הוספת אמוניום סולפט באיטיות, תוך כדי ערבוב, עד לריכוז 80% מרוויה. בתום ההוספה, הושארה הדוגמה לערבוב ב-4°C למשך הלילה. לאחר מכן סורכזה התמיסה ב-10,000g למשך 20 דקות ב-4°C. המשקע שהתקבל הומס בבופר 50mM Hepes-NaOH (pH 7.5) והושם לדיאליזה ללילה כנגד בופר הריסוק (ללא PVPP). לאחר ניקוי בעמודת ספרוז (ראה סעיף 3.3), שימש המיצוי לבדיקת פעילות אינברטאז קשור, או להמשך טיפול עם נוגדנים כנגד אינברטאז ב-Western Blot. המיצוי נשמרו ב-20°C.



**תרשים 2:** סכימת שלבי הפקת חלבונים תוך הפרדה לפרקציות של המקטע המכיל את החלבונים המסיסים והמשך המיצוי ממשקע השיירים לקבלת המקטע של החלבונים הקשורים, בעזרת 1M NaCl המשחרר קשרים אלקטרוסטטיים לדפנות תאים.

### 3.3. הרצה על עמודה לסילוק מלחים

לפני הרצה בגיל ובדיקת פעילות חלבונים, סולקו המלחים מהמיצוי. הסילוק נעשה בעמודת PD-10 בגודל 8cm, שבה נארו Sephadex G-25 (Amersham Biosciences), לפי הוראות היצרן. ה-Sephadex הותפח במים מעוקרים למשך לילה וסונן דרך פילטר CA 22µm בכוס צלולוז אצטאט מחוברת למשאבה. העמודה נשטפה פעמיים ב-0.2M NaOH לפני כל שימוש חוזר. על העמודה הועמסה הדוגמה, נאספו פרקציות בנות 500µl בהן נקראה תכולת החלבון ונבדקה פעילות האינברטאז.

**4.3. בדיקת תכולת החלבון במיצוי**

מדידה כמותית של החלבון נעשתה באמצעות מגיב Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) על פי הוראות היצרן. הריאגנט נמהל 1:5 עם מים מזוקקים פעמיים. ל-8  $\mu\text{l}$  דוגמא הוספו 500  $\mu\text{l}$  ריאגנט מהול. להכנת עקום כיוול שימש BSA 80-20  $\mu\text{g}$  בנפח 80  $\mu\text{l}$ . הדוגמאות נקראו בספקטרופוטומטר באורך גל 595nm.

**4. הרצת מיצוי החלבונים בג'ל****1.4. הכנת ג'ל פוליאקרילאמיד 10%**

<u>ג'ל תחתון</u>	<u>נפח - 8ml</u>
מים מזוקקים פעמיים	3.3ml
1.5M Tris-HCl (pH 8.8)	2ml
30% אקרילאמיד	2.6ml
SDS 10%	150 $\mu\text{l}$
10% אמוניום פרסולפט	150 $\mu\text{l}$
TEMED	7 $\mu\text{l}$

מעל הג'ל טופטפה טיפת אתנול לשמירת פני שטח ישרים בג'ל. לאחר קרישת הג'ל התחתון, נמזג הג'ל העליון והושם בו מסרק.

<u>ג'ל עליון</u>	<u>נפח - 3ml</u>
מים מזוקקים פעמיים	2.2ml
0.5M Tris-HCl (pH 6.8)	2ml
30% אקרילאמיד	0.4ml
SDS 10%	50 $\mu\text{l}$
10% אמוניום פרסולפט	50 $\mu\text{l}$
TEMED	5 $\mu\text{l}$

**2.4. הטענת הדוגמאות בג'ל**

לאחר בדיקת כמות החלבון, נלקח מהמיצוי נפח המכיל 20  $\mu\text{g}$  חלבון, שנמהל לקבלת בבופר ההטענה: 0.001% , glycerol 10% ,  $\beta$ -mercaptoethanol 5% , SDS 3% , Tris-HCl (pH 6.8) 62.5mM bromophenol blue. כמו כן, הוטענו בדרך קבע סמני משקל מולקולרי בצד הג'ל ( BioLabs, New England, USA).

**3.4. הרצת הג'ל**

הרצת הדוגמאות נעשתה במכשיר Mini PROTEAN II slab cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) על פי הוראות היצרן. הג'ל הורץ בבופר הרצה ב-80V למשך כ-10 דקות לכניסת הדוגמאות לג'ל העליון, V120 עד לריכוז הדוגמאות בפס בקצה הג'ל העליון ו-200V עד סיום ההרצה בג'ל התחתון.

**בופר הרצה (pH 8.3)**

Tris	25mM
Glycine	0.2M
SDS	0.1%

**4.4. העברת חלבונים מהג'ל לניטרולולוז (Western blot)**

העברת החלבונים מהג'ל לניטרולולוז נעשתה במכשיר Mini Trans-Blot (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). הג'ל הונח על הקסטה של המכשיר, על גבי ספוג ו-3 שכבות נייר סופג (Whatman 3MM), ספוגים בבופר העברה. על גבי הג'ל הונחה חתיכת ניטרולולוז בעובי 3µm (Schleicher & Schuell), שלוש שכבות נוספות של נייר סופג וספוג. ההעברה נעשתה ב-100V, עם בופר העברה קר ותבנית קרח למניעת התחממות, למשך שעה.

**בופר העברה**

Tris	25mM
Glycine	192mM
methanol	20%

**5.4. צביעת הממברנה**

צביעת החלבונים על גבי הניטרולולוז נעשתה על ידי השרייתו למספר דקות בתמיסת 0.1% צביעת החלבונים על גבי הניטרולולוז לאחר הצביעה נעשתה ב-1% (Sigma) Poncaeu-S חומצה אצטית. שטיפת הניטרולולוז לאחר הצביעה נעשתה ב-1% חומצה אצטית.

**5. נוגדנים כנגד אינברטאז חומצי**

זיהוי התוצרים החלבוניים של שני שבטי האינברטאז שבודדו, נעשה בעזרת נוגדנים שהתקבלו באדיבותו של פרופ' E. Blumwald מאוניברסיטת דיוויס בקליפורניה. הנוגדנים הוכנו בארנבות כנגד פוליפפטיד סנטתי, מאתר ספציפי של החלבון, על פי רצף ה-DNA של שבטי Vac1 ו-Vac2.

## 6. הגבת הנוגדנים כנגד Inv1 ו-Inv2 עם Western Blot

הגבת הנוגדן נעשתה עם מערכת (ECL) Enhanced Chemiluminescence (Amersham, Buckinghamshire, UK) לפי הוראות היצרן.

### 1.6. חסימת הממברנה

ממברנת הניטרוצלולוז נחסמה ב-1% חלב למשך שעה בטלטול, בטמפרטורת החדר.

### 2.6. הגבה עם הנוגדן

I. לאחר החסימה הוגבה הממברנה עם הנוגדן הראשוני במיהול 1:3000, למשך שעה בטמפרטורת החדר. המיהול נעשה עם בופר שטיפה.

II. הממברנה נשטפה 3 פעמים, עשר דקות כל שטיפה, בבופר שטיפה.

III. הממברנה הוגבה עם נוגדן שניוני goat anti rabbit שאליו קשור horseradish peroxidase (HRP), במיהול 1:20,000 למשך שעה.

IV. הממברנה נשטפה 3 פעמים עשר דקות בבופר שטיפה.

### בופר שטיפה

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.58M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.17M
NaCl	0.68M
Tween 20	0.1%

### 3.6. זיהוי הנוגדן

זיהוי הנוגדן בשיטת כמיהולומינסנציה (ECL). הממברנה הושרתה למשך 5 דקות בתמיסת המגיבים במהול 1:40 שהינם סובסטרט לאנזים HRP, הפולט אור במהלך התגובה. נעשתה חשיפה של הממברנה למצלמה בתא חושך (FluorChem, Alpha Innotech) למשך דקות בודדות, עד לפיתוח תמונה דיגיטלית ברורה.

## 7. מידור האינברטאז החומצי

### 1.7 immunolocalization של אינברטאז חומצי ב-TEM

#### I. הכנת הדוגמאות

שקיקי מיץ הופרדו בזהירות מפלחי תפוז טבורי צעיר (40mm קוטר פרי חיזוני) ותפוז בוגר (65mm קוטר פרי חיזוני) שנדגמו באקראי ממספר עצים. שקיקי המיץ נחתכו במרכזם לרוחב כדי להקל על חדירת המקבע. הם הושרו ב-2% גלוטראלדהיד ו-3% פורמאלדהיד למשך לילה לקיבוע. מספר שקיקי מיץ אף הושרה בנוסף ב-1% אוסמיום למשך שעתיים. לאחר מכן נשטפו הדוגמאות 5 פעמים, 10 דקות כל פעם, בבופר שטיפה (ראה סעיף 2.6). שקיקי המיץ הועברו לדהידרציה בסדרת ריכוזים עולים של אתנול עם ירידה בטמפרטורה. שעה ב-30% אתנול בטמפרטורת החדר, שעה ב-50% אתנול ב-4°C, שעה ב-70% אתנול ב-0°C, שעה ב-90% אתנול ב-20°C, ולילה ב-100% אתנול ב-20°C. לאחר הדהידרציה נעשה embedding ב-(The London Resin Co.) L. R. White (medium grade). תחילה הוסף L. R. White בנפח זהה לנפח האתנול והאתנול נודף כשעה עד לשקיעת השקיקים. לאחר מכן הוספה כמות קטנה של resin לקבלת יחס 1:2 עם האתנול והם הושארו לנידוף במשך שעתיים. שוב הושלם הנפח שנודף ב-resin טרי והדוגמאות הועברו לשמירה בקפסולות ג'לטין סגורות למשך יומיים ב-4°C. הקפסולות יובשו בתנור למשך 24 שעות ב-60°C. הקפסולות הותכו במים רותחים והבלוק שהתקבל נחתך במיקרוטום (LKB) Pyramitome, להכנת חתכים בעובי 2-5µm למיקרוסקופ אלקטרוני חודר. החתכים הונחו על גבי זכוכיות מצופות ב-Bio-bond (Bio-Lab) לפי הוראות היצרן.

#### II. Immunogold labelling

על הזכוכיות עם החתכים הושם 10% (NGS) normal goat serum (Bio-Lab) שעבר אינאקטיבציה בחום לחסימת האתרים הלא ספציפיים, מהול בבופר שטיפה (ראה סעיף 2.6). למשך שעה. לאחר מכן הועבר תחת 50mM גליצין בבופר שטיפה למשך 30 דקות. החתכים נשטפו למשך 5 דקות בבופר עבודה: 1% NGS, 1% BSA בבופר שטיפה. לאחר מכן הודגרו החתכים עם נוגדנים כנגד Inv2, Inv1 או תת יחידה E של חלבון ה-vATPase (התקבלו ממעבדתו של ד"ר משה ראובני) במיהול 1:100 למשך לילה ב-4°C. לאחר לילה נשטפו הזכוכיות שש פעמים בבופר עבודה, 10 דקות כל שטיפה. לאחר השטיפות הונחה טיפת נוגדן שניוני הקשור לחלקיקי זהב בקוטר 5nm (Amersham) במיהול 1:50 על כל חתך למשך שעה. בתום האינקובציה נשטפו הזכוכיות שלוש פעמים בבופר עבודה, 10 דקות כל שטיפה. שלוש פעמים בבופר פוספט ושש פעמים במים מעוקרים למשך 5 דקות כל פעם. לאחר הסימון בחלקיקי זהב, נצבעו החתכים ב-4% Uranyl acetate במים למשך 15 דקות. נשטפו חמש פעמים במים מעוקרים למשך 5 דקות. צביעה נוספת ב-Lead citrate למשך 5 דקות ונשטפו שוב חמש פעמים במים למשך 5 דקות. החתכים הועברו להסתכלות במיקרוסקופ אלקטרוני חודר.



## 2.7 immunolocalization של אינברטאז חומצי במיקרוסקופ קונפוקלי

בדומה להכנת הדוגמאות והסימון ל-TEM, שקיקי מיץ הופרדו בזהירות מפלחי תפוז טבורי בוגר (70mm קוטר פרי חיצוני). שקיקי המיץ עברו קיבוע ודהידרציה כמו בסעיף 1.7. לאחר הדהידרציה נעשה embedding ב-4% אגרוז בעל טמפרטורת התכה נמוכה. תחילה קוררה תמיסת האגרוז הנוזלי ל-60°C והשקיקים הוספו לו להשריה במשך לילה בטמפרטורה זו. התמיסה נמוגה לצלחת פטרי, תוך סידור שקיקי המיץ עד להתמצקות הגיל. הבלוק שהתקבל נחתך בויברוטום בעל סכין חיתוך רוטטת, להכנת חתכים בעובי 300-400µm, לשם הסתכלות על המבנה האנטומי של שקיק המיץ במיקרוסקופ אור, או להמשך סימון עבור מיקרוסקופ קונפוקלי. החתכים הונחו על גבי זכוכיות נושא ונשמרו לחים. החסימה נעשתה על ידי 1% BSA בבופר שטיפה (ראה סעיף 2.6). למשך שעה. לאחר מכן הודגרו החתכים עם נוגדנים כנגד Inv1, Inv2 או עם preimmune serum במיחול 1:100 למשך שעה. לאחר מכן נשטפו בבופר שטיפה שלוש פעמים, 10 דקות כל פעם. הדגרה עם נוגדן שניוני goat anti CY3 rabbit (Jackson) במיחול 1:100 למשך שעה. בתום ההדגרה נשטפו הזכוכיות שלוש פעמים בבופר שטיפה, 10 דקות כל שטיפה. החתכים הודבקו עם Elvanol, נאטמו עם זכוכית מכסה והועברו לערוור פלואורוסצנטרי בלייזר, במיקרוסקופ הקונפוקלי.

## 8. אנליזת RNA

### 8.1 הפקת RNA

על מנת לבדוק את דגם הביטוי של הגנים Inv1 ו-Inv2 ברקמות שונות ובשלבם התפתחותיים שונים, נדגמו שחלות, חנטיים ושקיקי מיץ מאור-1, תפוז טבורי, לימטה ולימון בשלבים שונים של התפתחות. הרקמה שנדגמה הושמה במכתש מקורר, והוסף מעט חנקן נוזלי. הרקמה נכתשה תוך הוספת חנקן נוזלי מדי פעם עד לקבלת אבקה דקה. כ-10g אבקה הורחפו במבחנה עם 25ml בופר כתישה TLE (Tris-HCl (pH 8.2) 0.2 M, LiCl 0.1 M, EDTA 5mM), בתוספת 8ml פנול ועברה הומוגניזציה בעזרת פוליטרון למשך כ-2 דקות במהירות בינונית. המבחנה הועברה להדגרה באמבט מים ב-50°C למשך 20 דקות. התמיסה סורכזה בצנטריפוגה 7500g למשך 10 דקות ב-4°C. 20ml מהפרקציה העליונה הועברו למבחנה חדשה. למבחנה הוספו 10ml פנול, ולאחר ערבוב הוספו עוד 10ml כלורופורם. התמיסה סורכזה בצנטריפוגה 4500g למשך 10 דקות בטמפרטורת החדר. הפרקציה העליונה הועברה למבחנה חדשה והוספו 7ml (כ-1/3 מהנפח הסופי) LiCl 8M, לקבלת ריכוז סופי של LiCl 2M. המבחנה נשמרה בקרח במקרר למשך הלילה. למחרת, התמיסה סורכזה בצנטריפוגה 7500g למשך 30 דקות ב-4°C, הנוזל נשפה מיידית תוך שמירה על הפלט. הפלט נשטף ב-LiCl 2M ולאחר סירכוז בצנטריפוגה 4000g ב-4°C למשך 20 דקות, הנוזל נשפה מיידית תוך שמירה על הפלט והמבחנה נשמרה בקרח. הפלט הומס ב-300µl מים מטופלים ב-DePc. הנוזל הועבר למבחנת

אפנדורף נקייה. נעשתה חזרה על השלב האחרון עם 100µl מים מטופלים ב-DePc (להמסת שאריות הפלט שבמבחנה) שהוספו למבחנת האפנדורף. המבחנה סורכזה בצנטריפוגה במהירות 18000g למשך 4-3 דקות ב-4°C. הנוזל הועבר למבחנת אפנדורף נקייה והפלט נזרק. למבחנה הוסף עשירית הנפח, כ-45µl 3M NaAc מטופל ב-DePc. התמיסה עורבבה בוורטקס והוספו 2.5 נפחים אתנול. לאחר ערבוב נשמרה המבחנה בהקפאה. לאחר 24 שעות המבחנה הוצאה מההקפאה וסורכזה ב-14000g למשך 20 דקות ב-4°C. הנוזל נשפה והפלט יובש במנדף. לאחר יבוש הפלט הוספו 100-400µl מים מטופלים ב-DePc, בהתאם לכמות המשקע. בדיקת ריכוז ה-RNA נעשתה בספקטרופוטומטר באורכי גל 260nm ו-280nm. לאחר חישוב ריכוז ה-RNA, חולקה התמיסה למבחנות אפנדורף, כ-100µg בכל אחת. המבחנות נשמרו ב-20°C.

## 2.8. אנליזה של RNA (Northern)

**הכנת ג'ל אגרוז ל-RNA:** (Sambrook and Russell, 2001 – עמודים: 7.31–7.33). הוכן ג'ל אגרוז בריכוז סופי של 1.2% המכיל פורמאלדהיד בריכוז סופי של 2.2M. תמיסת 1xTAE שמשה כבופר הרצה.

**הטענת RNA בג'ל:** (Sambrook and Russell, 2001 – עמודים: 7.33 – 7.34). הוכנו דוגמאות RNA להטענה בג'ל. ההרצה בג'ל נעשתה תחת מתח של 96V. לאחר ההרצה נעשה צילום של הג'ל במצלמת U.V, על מנת לבדוק את יעילות ההפקה.

**הכנת הבלוט:** לאחר ההרצה בג'ל, הוכן בלוט על ידי העברה של ה-RNA מהג'ל לממברנת ניטרצולוזה בשיטה הקפילארית (Sambrook and Russell, 2001 – עמודים: 7.35–7.40).

**פרהיברידיזציה והיברידיזציה:** הבלוט הוכנס לתמיסת פרהיברידיזציה (5xSSC, 5xdenhardt's, SDS 1%, denatured Salmon sperm DNA-100µg/ml). לאחר הדגרה במשך 3 שעות בתמיסת הפרהיברידיזציה, הוסף לתמיסת הפרהיברידיזציה גלאי רדיואקטיבי מסומן ב- $[\alpha^{32}\text{P}]$  dCTP עם הקסונוקליאוטידים רנדומליים (Roche) כתחלים (Sambrook and Russell, 2001 – עמודים: 9.4–9.8). שלב הפרהיברידיזציה ושלב ההיברידיזציה נעשו בתנור גלילים ב-68°C. ההיברידיזציה נמשכה 16 שעות, שלאחריהן נשטפה הממברנה פעמיים בתמיסת SDS 0.1%, 2xSSC בטמפרטורת החדר למשך 20 דקות, ולאחר שטיפה בתמיסת SDS 0.1%, 1xSSC ב-68°C למשך 30 דקות. במידה וקרנית הרקע היתה חזקה נעשתה שטיפה שלישית בתמיסת SDS 0.1%, 1xSSC ב-68°C למשך 20 דקות. הממברנה נחשפה לנייר צילום (FUJIFILM Super RX). פיתוח נייר הצילום נעשה בחדר חושך תוך שימוש בחומרים מתאימים (fixer ו-developer) של חברת Kodak. לאחר מכן נעשתה השוואה לעוצמת U.V של 18S rRNA כסטנדרט לנירמול כמות ההטענה בבארות.

## 9. פעילות אינברטאז בג'ל

בדומה להרצת המיצויים בג'ל (ראה סעיף 4), הורצו מיצויים לצביעת פעילות בג'ל נאטיבי (ללא תוספת SDS בג'ל ובבופר ההרצה) וללא תוספת  $\beta$ -mercaptoethanol ו-SDS לבופר ההטענה.

### 1.9. צביעה אנזימתית לפעילות אינברטאז על גבי ג'ל נאטיבי

לאחר ההרצה נשטף הג'ל הנאטיבי במים ונצבע לפעילות בתמיסה שהכילה:

בופר 85mM פוספט-ציטרט (pH 4.5)

סוכרוז 100mM

(Roche) glucose oxidase 10U/ml

(Sigma) horseradish peroxidase 10U/ml

(Sigma) 3,3'-diaminobenzidine 0.3mg/ml

הצביעה נמשכה כ-3 שעות ב- $37^{\circ}\text{C}$ . הפסקת הצביעה נעשתה על ידי השריית הג'ל ב-5% חומצה אצטית. מאחר ולא התקבלו צביעות ספציפיות לאיזורי ריצת החלבונים בג'ל, נעשתה צביעה בשיטה שונה, עם מגיבים כימיים (סעיף 2.9).

### 2.9. צביעה כימית לפעילות אינברטאז על גבי ג'ל נאטיבי

פעילות אינברטאז נבדקה בג'ל נאטיבי בדומה לסעיף 1.9, הג'ל הושרה בתמיסה שהכילה:

בופר 0.1M אצטט (pH 5) ו-0.1M סוכרוז, למשך 30 דקות ב- $30^{\circ}\text{C}$ . לאחר מכן נשטף הג'ל במים מעוקרים. פיתוח הג'ל נעשה על ידי הדגרה בתמיסה רותחת של 0.5M NaOH שמכיל 0.1%-2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) למשך כ-3 דקות. הריאקציה הופסקה, עם הופעת פסים אדומים, על ידי 7.5% חומצה אצטית.

### 3.9. הרצת הג'ל הנאטיבי במימד שני (הפרדת 2D)

על מנת לבדוק את ספציפיות צביעת הפעילות למקום המצאות האינברטאז בג'ל הנאטיבי, בוצעה הפרדה למימד שני. רצועה, בה רצו החלבונים בג'ל הנאטיבי, נחתכה והושרתה בבופר הטענה דנאטוריטיבי (ראה סעיף 2.4). למשך שעה. לאחר מכן, הוטענה הרצועה בצורה אופקית על ג'ל SDS דנאטוריטיבי (ראה סעיף 1.4). בעל באר טורית אחת רחבה. הג'ל הורץ והועבר לממברנה כמתואר בסעיף 3.4-4.4. בהמשך הוגבו נוגדנים כנגד Inv1 ו-Inv2 על הממברנה (ראה סעיף 6). צביעת פעילות, של מיצוי זהה שרץ במקביל בג'ל נאטיבי נפרד, הושוותה לתמונת הממברנה בה זוהו חלבוני האינברטאז על ידי הנוגדנים הספציפיים. נבחן מיקום החלבונים Inv1 ו-Inv2 שרצו במאונך בג'ל הדנאטוריטיבי, ביחס לאיזור שבו התקבלה צביעת הפעילות בג'ל נאטיבי זהה.

## - תוצאות -

### 1. בידוד הגנים Inv1 ו-Inv2

בעבודה מוקדמת (נערכה ע"י דר' אבי צדקה) בודדו ורוצפו שני שבטים - Inv1 ו-Inv2, מספריית ציפה של תפוז טבורי, שהראו הומולוגיה לאינברטאז חומצי ולכן נחשדו כאינברטאזות של החללית. כמו כן, ניסיון למצוא שבטים המראים הומולוגיה לאינברטאז הקשור לדופן, נכשלו ולא נמצאו בסיפריה שהופקה מציפת הפרי. בנוסף, במאגר המרכזי של רצפי EST's מהדרים (HarvEST), המכיל למעלה מ-225,000 שבטים שונים, מצויים שבטים המראים הומולוגיה לאינברטאז דופן, אולם כולם בסיפריות של איברים אחרים (עלים, פלבדו), אך לא בסיפריות משקימי מיץ. הוחלט לבדוק לעומק את ביטוי שני השבטים הנ"ל וכן לבחון את האפשרות לכך שהם מקודדים לאנזימים המצויים גם בדופן. פפטידים נבחרים, מתוך השבטים שבודדו משקימי מיץ של תפוז טבורי, בוטאו בחיידקים והוכנו כנגדם נוגדנים (במעבדתו של פרופ' בלומולד, אוניברסיטת דייויס), על מנת להיעזר בהם בהמשך ככלי לזיהוי מיקום החלבונים בתא ומידת השינוי בכמותם לאורך התפתחות הפרי. ראשית, נבדקה מידת הזהות, ברצף המקודד לחלבוני Inv1 ו-Inv2, בין תפוז טבורי – ממנו שובטו, לבין זני הדרים שונים, שיבחנו בעבודה זו. ההשוואה מאפשרת לקבוע אם ניתן יהיה להשתמש באותם כלים מולקולריים (גלאי DNA, נוגדנים) לגבי האנזימים הנ"ל, בפירות הדר מזנים שונים. בדיקת ההתאמה נערכה על ידי השוואה בין רצף ה-mRNA של תפוז טבורי לבין זה של לימון, שמידת קירבתם הטקסונומית אינה נחשבת לגבוהה בתוך הסוג *Citrus* (משפחת *Rutaceae*).

#### 1.1. סריקת ספריית cDNA של ציפת לימון בעזרת גלאים רדיו-אקטיביים מתפוז טבורי

מסריקה של הגנים Inv1 ו-Inv2 במאגרי מידע, המרכזים רצפי סיפריות שהופקו מציפת פירות הדר מזנים שונים (HarvEST), עולה כי ישנו דימיון רב בין זנים אחדים שנבדקו, אם כי מספר מגוון הזנים מהם הופקו ספריות מצומצם ולא בכולן נעשה מידור לציפת הפרי בנפרד. למען הסר ספק, נערכה השוואה מסודרת בין שני זני הדרים שונים, על ידי סריקת ספריית cDNA שהופקה על ידי דר' אבי צדקה מציפת פרי הלימון, בעזרת גלאים רדיו-אקטיביים מתוך הגנים Inv1 ו-Inv2 שבודדו מציפת תפוז טבורי במעבדתו של פרופ' בלומולד, אוניברסיטת דייויס. ממברנות שעברו הכלאה עם גלאי הגן ל-Inv1 "נדלקו" – הגיבו חיובית עם הגלאי במספר מושבות, בעוד שאלה שעברו הכלאה עם הגלאי ל-Inv2 לא נדלקו כלל. סיבה סבירה לאי ההצלחה בבידוד Inv2 מן הספרייה היא שהספרייה נלקחה בשלב שרמת ה-RNA ל-Inv2 היתה אפסית או שבספרייה זו, שהוגברה בעבר מספר פעמים, אבד במהלך ההגברות השבט שהכיל את הגן. עם התקדמות הסריקה נבחרו המושבות שנדלקו ונרעו שוב, עד אשר כולן נדלקו. המושבות הללו נשלחו לריצוף ע"י הפריימרים המובנים בפלסמיד הספרייה לפני הגן ואחריו.

בבדיקה התקבלו רצפים של כ-800 בסיסים משני צידי הגן, 3' ו-5', ובאמצע נותר חלל לא מרוצף של כ-800 בסיסים נוספים. החלק שרוצף לבדיקת התאמה בין ה-Inv1 מן התפוז הטבורי לזה שמצאנו בספריית ה-cDNA מן הלימון, כפי שנראה בתרשים 3.

NAVAL	CCCCGTTTCTTCTATAAATAGACCCGCGTTC--TCTTAACTTTCCTCCCAATTATTATTGAAACCAACAAATTTATCAAGCAGCAGCCCTCTAGTGGCCCATACATTCGTTA	117
LEMON	-----TGCAGCTCGCGCCCTCCAGGTCGACACATAGTGGATCCAGAAATTCGGACCGAGAAACCAACAAATTTATCAAGCAGCAGCCCTCTAGTGGCCCATACATTCGTTA	108
NAVAL	ATCAATGGCAGATTCTAATGTATCCTACAATCCTCTCCCGGACGGGGAACCTCCGGCCCAACTCCCGGGAGATCCAATCGTCTTGGTTCTATCCGGTTTGTGGTCGTTGGTTTTTACT	237
LEMON	ATCAATGGCAGATTCTAATGTATCCTACAATCCTCTCCCGGACGGGGAACCTCCGGCCCAACTCCCGGGAGATCCAATCGTCTTGGTTCTATCCGGTTTGTGGTCGTTGGTTTTTACT	228
NAVAL	TGCATTATTATCCGATAATGGATCTATACCCCTACTAACTTATTGATAAATGACAAATAAATGTTAATGATAAATGCAAAAAATGGGCTTAATGATGTCTGTCGTCGCGTCCGAAAGACC	357
LEMON	TGCATTATTATCCGATAATGGATCAATAACCCCTGCTAACTTATTGATAAATGACAAATAAATGTTAATGATAAATGCAAAAAATGGGCTTAATGATGTCTGTCGTCGCGTCCGAAAGACC	348
NAVAL	CGAGAGACTCCGGCCGTTTACGAGTGCCTCGTCCGGCCGGGGTGTCTGAGAAATCGAAACCCGGCGTTTGGTCAAGGAAGGGCTCGTATCCCTGGACCAATAATATGCTGCTGGCAAAAG	477
LEMON	CGAGAGACTCCGGCCGTTTACGAGTGCCTCGTCCGGCCGGGGTGTCTGAGAAATCGAAACCCGGCGTTTGGTCAAGGAAGGGCTCGTATCCCTGGACCAATAATATGCTGCTGGCAAAAG	468
NAVAL	GACGCCCTTCCACTTTCAACCCCAAAAAGAAATGGATGAATGATCCTAATGGTCCACTGTTTTTACAAAGGATGCTACCAATTTGTTTACCACTACAAACCAAAATGGCCAAATATGGGCTGA	597
LEMON	GACGCCCTTCCACTTTCAACCCCAAAAAGAAATGGATGAATGATCCTAATGGTCCACTGTTTTTACAAAGGATGCTACCAATTTGTTTACCACTACAAACCAAAATGGCCAAATATGGGCTGA	588
NAVAL	CATAGTGTGGGGCCATGCTGTCTCAAAGGACCTGATCCATTGGTATCACCCTCCCGTTGGCCATGGTCCGATCAATGGTATGATATTTATGGTGTCTGGAACCCGCTCTGCTCAATCCT	717
LEMON	CATAGTGTGGGGCCATGCTGTCTCAAAGGACCTGATCCATTGGTATCACCCTCCCGTTGGCCATGGTCCGATCAATGGTATGATATTTATGGTGTCTGGAACCCGCTCTGCTCAATCCT	708
NAVAL	ACCTGATGGAAAACCTTATGATCTGTGTAACACTGGATCCACCAACGACTCTGTGCAGTCCAAAATCTCCGATATCCCTGCCAGCCCATCTGATCCTCTACTCATCAAAATGGGTCAAAATACCC	837
LEMON	ACCTGATGGAAAACCTTATGATCTGTGTAACACTGGATCCACCAACGACTCTGTGCAGTCCAAAATCTCCGATATCCCTGCCAGCCCATCTGATCCTCTACTCATCAAAATGGGTCAAAATACCC	828
NAVAL	CGGAAACCCCTG 728bp AAGGCGGCTTTAGAGAAAACAGGGGACTCCAAATCTGGAGTTTAGCTCCAGTCCAGCGAAGGATCTGCTGAAGCCGGCAATAGGCCCTTTGGCCCTGCT	1677
LEMON	CGGAAACCCCTG GAP AAGGCGGCTTTAGAGAAAACAGGGGACTCCAAATCTGGAGTTTAGCTCCAGTCCAGCGAAGGATCTGCTGAAGCCGGCAATAGGCCCTTTGGCCCTGCT	940
NAVAL	GGTCTTGCAGATGACAGCCCTATCCGAGCAAACTCCAGTCTATTTCTCAATTGGGAAAAGAAAAGGATGGAAGCTCAAGACTTACTTCTGCACTGATCAATCAAGATCTTCTGAGGCAAA	1797
LEMON	GGTCTTGCAGATGACAGCCCTATCCGAGCAAACTCCAGTCTATTTCTCAATTGGGAAAAGAAAAGGATGGAAGCTCAAGACTTACTTCTGCACTGATCAATCAAGATCTTCTGAGGCAAA	1060
NAVAL	TGATCTCAATAAATCAAAATATGCTAGCTTTCTTCCAGTACTGGAAAGCCGAGAAAATCTCAATGAGAGTATTTGGTGGATCATTTCGATAGTCCGAAAGCTTTGCTCAAGGTGGGAGAACAA	1917
LEMON	TGATCTCAATAAATCAAAATATGCTAGCTTTCTTCCAGTACTGGAAAGCCGAGAAAATCTCAATGAGAGTATTTGGTGGATCATTTCGATAGTCCGAAAGCTTTGCTCAAGGTGGGAGAACAA	1180
NAVAL	TATTACTTCCAGGGTTTATCCAAACAAAGGCAATTTATGGAGCCCTCCGGTATTTTTCTTCAACAAATGCTACCGGGCCAGGCTTACAGCTCACTCAAGCATGGCAAAATGAATTCG	2037
LEMON	TATTACTTCCAGGGTTTATCCAAACAAAGGCAATTTATGGAGCCCTCCGGTATTTTTCTTCAACAAATGCTACCGGGCCAGGCTTACAGCTCACTCAAGCATGGCAAAATGAATTCG	1300
NAVAL	ATTTCATCCGTCATACCCGATGATGATGATGAACGGCACTCCGGGACGAAACCAACAAATGAAGTTAGAGGGAGCAAAACTAAATATCTCCGCAATTTGTTGACGAGTTCTTTGTTATT	2157
LEMON	ATTTCATCCGTCATACCCGATGATGATGATGAACGGCACTCCGGGACGAAACCAACAAATGAAGTTAGAGGGAGCAAAACTAAATATCTCCGCAATTTGTTGACGAGTTCTTTGTTATT	1420
NAVAL	TCTAAAACGCCCGCAACAAATTTCTATAGAATACATGTTTATTGCAAAACAAATTTCAAAGCTTTGGCACCGGCCCTCTTTGTTAAATTTCTCCCCAGAGTTGTAGAAAGATGGCCAAATCT	2277
LEMON	TCTAAAACGCCCGCAACAAATTTCTATAGAATACATGTTTATTGCAAAACAAATTTCAAAGCTTTGGCACCGGCCCTCTTTGTTAAATTTCTCCCCAGAGTTGTAGAAAGATGGCCAAATCT	1540
NAVAL	TCCACAAACAAAAGTAGTCTCTTAAATTTCTTATTTTGTCAATTGACCGTTGCTAGTTGGGAGAGAAATTTATTTGTGA-ATTGTGATTCCTCCCAAGATCTAAA-ATTGCAGCTCT	2395
LEMON	TCTGACCAAAAT--TAGTCTCTTAAATTTCTTATTTTGTCAATTGACCGTTGCTAGTTGGGAGAGAAATTTATTTGTGA-ATTGTGATTCCTCCCAAGATCTAAAAGATTGCAGCTCT	1657
NAVAL	C-TTCAATTCGATGTTTCAATCGGAATAGCTTTTTTCAAACTCTTATGCATTTGCCGAGTGAAGT 2462	
LEMON	NC-TTCAATTCGATGTTTCAATCGGAATAGCTTTTTTCAAACTCTTATGCATTTGCCGAGTGAAGT 1725	

**תרשים 3:** השוואת רצף הגן Inv1 מתפוז טבורי (התקבל מאוניברסיטת דיוויס) – למעלה, לזה שבודד מספריית ה-cDNA של פרי הלימון החמוץ – למטה. כאשר במרכז חלל לא מרוצף של 728 בסיסים. אחוז הזהות בין הרצפים >97%.

על בסיס ההתאמה בין הרצפים של Inv1 משני פירות ההדר השונים, זהות שהגיעה לכדי יותר מ-97%, ניתן להניח כי מידת השונות בין זני ההדרים השונים זניחה וכי ניתן להמשיך ולהשתמש באותם גלאים ובאותם נוגדנים לבחינת ביטוי הגנים לאינברטאז החומצי בזני ההדרים השונים.

## 2. שימוש בנוגדנים ספציפיים למיקום אנזימי Inv1 ו-Inv2 בתאי שקיקי המיץ

זיהוי החלבונים התאפשר באמצעות נוגדנים ספציפיים (התקבלו מאוניברסיטת דיוויס באדיבות E. Blumwald), כנגד איזורים ייחודיים ברצף חומצות האמינו, לשם הבדלה בין שני שבטי האינברטאז החומצי Inv1 ו-Inv2 בינם לבין עצמם ולבין חלבונים אחרים. כמו כן, ספציפיות גבוהה מושגת כאשר מקטעי רצפי חומצות האמינו הייחודיים הינם בעלי שונות גבוהה ביחס לאינברטאזות קשורות דופן וביחס לצמחים ממינים שונים, **תרשים 4**.

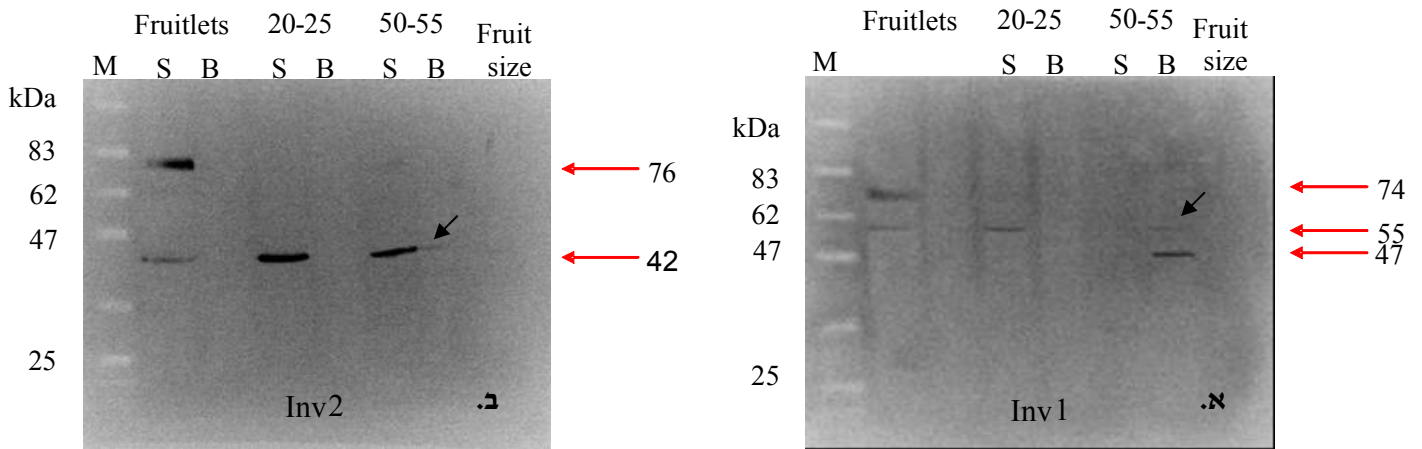
CitrusInv1	457	TELKPGSVMPLELVGSAIQLDIVLFFELDK-AALEKTAE-----SNVDFSCSSSECSAERCALGPFGLI VLADDSLSBPTPVVIFYI
CitrusInv2	456	VVVEPGSVVPLDIGVATQLDISFFETEL-LGSG-----AMEEGYGCSCSAIDRSAMGPFGLI VNAHDSLSBLTPIFFRS
CarrotVac1	469	VELKPGSLVPLKISSAQLDIVASFEVDE-EAFKGTYE----ADAS-YNCTASBGAAGRCILGPFGLI VLADDSLSBLTPVIFYI
MungBeanVac1	454	LKAKPGSVVSLDIETATQLDVAFEFIDT-ESLEKTAE-----SNEEFTCSSSGCAACRCALGPFGLI VLADDEGLSBYTPVIFYV
ArabiVac4	460	LEVPGSVVVPDVGSAQLDIEAFEFINK-ESLDKIIGNASVVAEAEFSCERKSGSSTVRCALGPFGLI VLADDSLSBPTPVVIFYV
TomatoVac1	443	VDLQPGSIELLRVDSAAELDIEAFEFVDK-VALOGIIE----ADHVGFCSTSGCAASRCILGPFGLI VLADQTLSELTPVIFYI
CarrotCW1	401	QDLKSGHILVEVKGITAAQADVEVTFSEFKS---LAKREPFDPKWLEYDAEKICSLKSGSTVCGVGGPFGLI TLASERLBETPVVFRV
MaizeCW1	396	KLVKPGDHFEVIGIATYQADVEVSRLEAGTSLLEKAEAFDPAYDDDAQKLCGVKADARCGVGGPFGLI VLASADLCEBETAVFRV

**תרשים 4:** רצפי חומצות אמינו מאיזור שנבחר להפקת נוגדנים כנגד חלבוני Inv1 ו-Inv2 (הקטע הממוסגר), בעל שונות גבוהה בין אינברטאזות קשורות דופן וכן בין אינברטאזות שנלקחו מצמחים שונים.

הוחלט לבדוק מיקום האינברטאזות הנ"ל במהלך התפתחות הפרי. תחילה נוסו הנוגדנים הספציפיים כנגד חלבונים שהופקו מחלקים שונים של תאי פרי - מסיסים וקשורים לדופן. לאחר מכן אף נעשה מאמץ רב כדי לנסות ולקבוע, באמצעות הנוגדנים שהוכלאו in-situ בחתכים למיקרוסקופ אלקטרוני חודר, את המיקום התוך תאי של חלבוני האינברטאזות.

### 1.1.2. קביעת מיקום החלבונים בחלקים שונים של תאי ציפת הפרי ב-"אור 1"

מעקב אחרי שינויים במיקום ביטוי החלבונים Inv1 ו-Inv2 לאורך התפתחות הפרי, נעשה על ידי הפקת חלבונים תוך פרקציונציה של התא למקטע מסיס ולמקטע של חלבוני דופן. מיצוי החלבונים המסיסים התבצע בשיטה המקובלת, בעוד השיירים של מקטעי הדופן (שבד"כ אינם שימושיים) נשטפו פעמיים נוספות. מהם נעשה מיצוי שני בעזרת בופר המכיל 1M NaCl, המשחרר חלבונים קשורי דופן. כך שניתן היה לבדוק בנפרד חלבונים מסיסים, אשר הופקו במיצוי הראשון וחלבונים קשורי דופן, שהופקו במיצוי השני (ראה **תרשים 2**). נאספו שלבי התפתחות תואמים של קליף מון "אור 1" – חנטים וציפה מתוך פירות בגדלי קוטר 20-25 מ"מ ו- 50-55 מ"מ, לגבי כל שלב נבדקו החלבונים שזוהו ע"י הנוגדנים Inv1 ו-Inv2 בנפרד לגבי שני הפאזות, מסיס וקשור לדופן לחוד, מוצג **בתמונה 3**.

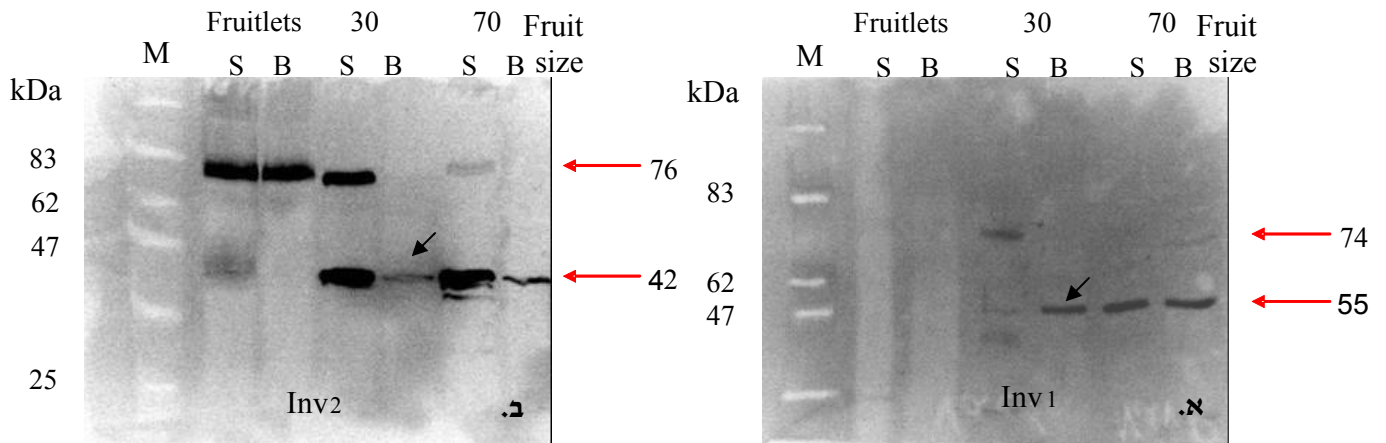


**תמונה 3:** התפלגות חלבוני Inv2 ו-Inv1 במקטע המסיס (S) ובמקטע קושר דופן (B) בתאי שקיקי המיץ לאורך התפתחות פרי "אור 1". א. מימין - Inv1, ניתן לראות התפלגות בגודל התוצרים החלבוניים שנותנים פסים בגדלים של 76kDa, 55kDa ו-47kDa. ב. משמאל - Inv2 תוצרים בגדלים של 76kDa ו-42kDa. M - סמן, Fruitlets - חנטים.

ניתן לראות שהתקבלו חלבונים בגדלים 74kDa ו-76kDa, המוערכים כגודלם הצפוי של שני החלבונים העיקריים, שמזוהים על ידי שני הנוגדנים Inv2 ו-Inv1 בהתאמה, בחנטים. ב-Inv1 מתקבלים בנוסף גם חלבונים בגדלים 55kDa ו-47kDa וב-Inv2 ומתקבל גם חלבון נוסף בגודל 42kDa. החלבונים Inv2 ו-Inv1 מראים דגם ביטוי דומה בחנטים ובגודל הפרי הקטן של 20-25 מ"מ, כאשר בגודל הפרי הגדול של 50-55 מ"מ נעלם ב-Inv1 החלבון המסיס והופיע חלבון קשור לדופן (מסומן בחץ). גם ב-Inv2 נראית ירידה קלה ברמת החלבון המסיס והופעת רמה נמוכה של חלבון קשור דופן, בשלב שלקראת ההבשלה. אנליזה של שינוי ברמת החלבונים לאורך שלבים מפורטים יותר של התפתחות פרי "אור 1", תוצג בהמשך (פרק 2.1.3). מבדיקה זו עולה אפשרות למיקום חלבוני Inv2 ו-Inv1 בתאי שקיקי המיץ, כך שכנראה משתנה מיקומם ממסיסים בחנטים ובשלבי התפתחות מוקדמים של הפרי, להיותם קשורים גם לדופן במקרה של חלבוני Inv2, או אף קשורים בעיקר ובאופן כמעט בלעדי לדופן במקרה של חלבוני Inv1. כדי לקבל תמונה מהימנה ורחבה יותר לגבי זני הדורים האחרים, הוחלט לבדוק באופן דומה את המיקום בעזרת הנוגדנים, גם בתפוז טבורי, ממנו הופקו הנוגדנים במקור.

### 2.1.2. מיקום החלבונים בחלקים שונים מתאי ציפת תפוז טבורי בעזרת נוגדני Inv2 ו-Inv1

מעקב אחרי שינויים במיקום ביטוי החלבונים Inv2 ו-Inv1 לאורך התפתחות הפרי נעשה על ידי הפקת חלבונים מחלקים שונים של התאים, בשיטה המוזכרת בפרק הקודם (חלבונים קשורי דופן שוחררו ע"י מיצוי נוסף בבופר המכיל 1M NaCl). נאספו שלבי התפתחות תואמים של תפוז טבורי - חנטים וציפה מתוך פירות בגדלי קוטר 30 מ"מ ו-70 מ"מ, לגבי כל שלב נבדקו החלבונים שזוהו ע"י הנוגדנים Inv2 ו-Inv1 בנפרד לגבי שני הפאזות, מסיס וקשור לדופן לחוד, מוצג בתמונה 4.



**תמונה 4:** התפלגות חלבוני Inv1 ו-Inv2 במקטע המסיס (S) ובמקטע קושר דופן (B) בתאי שקיקי המיץ לאורך התפתחות תפוז טבורי. א. מימין - Inv1, ניתן לראות התפלגות בגודל התוצרים החלבוניים שנותנים פסים בגדלים של 74kDa ו-55 kDa. ב. משמאל - Inv2 תוצרים בגדלים של 76kDa ו-42kDa. M – סמן, Fruitlets – חנטים.

ניתן לראות שהתקבלו חלבונים בגודל 74kDa ו-76kDa, המוערכים כגודלם הצפוי של שני החלבונים העיקריים, שמזוהים על ידי שני הנוגדנים Inv1 ו-Inv2, בהתאמה, בגודל פרי של 30 מ"מ. ב-Inv1 מתקבל בנוסף גם חלבון בגודל 55kDa וב-Inv2 מתקבל חלבון נוסף בגודל 42kDa. החלבונים Inv1 ו-Inv2 שונים בדגם כמות החלבון בחנטים, כאשר ב-Inv1 אין תוצרי חלבון כלל, לעומת Inv2 שמראה כמות גדולה במקטע המסיס וגם במקטע קשור הדופן. בגודל פרי הקטן של 30 מ"מ, מזוהה על ידי הנוגדנים ל-Inv1 ול-Inv2 כמות חלבונים גבוהה במקטע המסיס וגם כמות נמוכה במקטע קשור הדופן (מסומן בחץ). בגודל הפרי הגדול של 70 מ"מ נראית, בעיקר ב-Inv1, כמות חלבון שווה של אנזים מסיס וקשור לדופן. גם ב-Inv2 נראית ירידה קלה בכמות החלבון המסיס ונראית כמות נמוכה בחלבון הקשור, בשלב שלקראת הבשלת הפרי. אנליזה של שינוי ברמת החלבונים לאורך שלבים מפורטים יותר של התפתחות התפוז הטבורי, תוצג בהמשך (פרק 2.2.3).

מבדיקה זו עולה, שכנראה מיקומם של חלבוני Inv1 ו-Inv2 בתאי שקיקי המיץ של התפוז הטבורי אינו ממודר לאתר אחד בלבד, אלא הם מצויים בעת ובעונה אחת גם כמסיסים וגם כקשורים לדופן. נראה כי רמת החלבונים קשורי הדופן אף משתנה לאורך התפתחות הפרי (בעיקר ב-Inv2), כאשר בגודל פרי של 30 מ"מ מזוהה רמה נמוכה שעולה בשלב שלפני הבשלת הפרי.

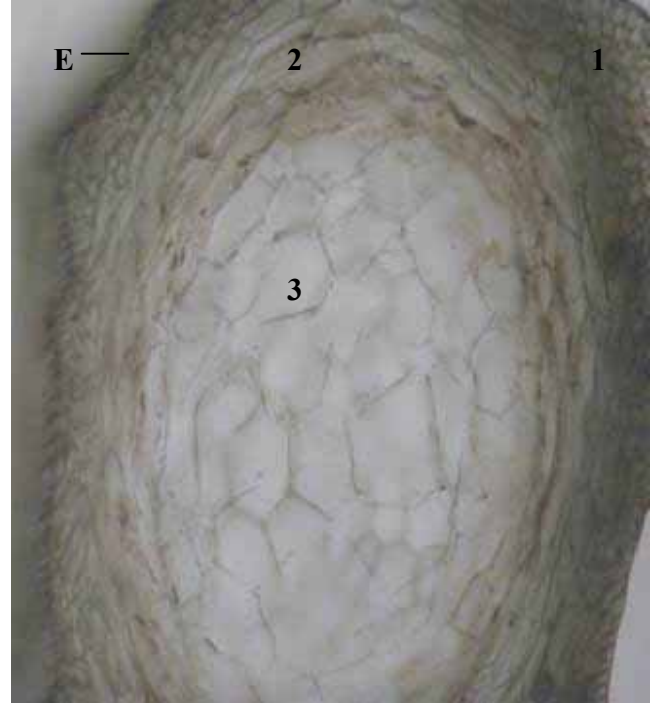


## 2.2. קביעת מידור של אנזימי Inv1 ו-Inv2 בתאי שקיקי המיץ באמצעות אימונו-לוקאליזציה

למיקום האינברטאז בתא חשיבות להבנת מנגנון הקליטה של סוכרוז לפרי. במידה שהקליטה נעשית על ידי מנגנון של פירוק הסוכרוז בחלל הבין תאי ע"י אינברטאז קשור לדפנות התאים וסינתזה מחדש בציטופלסמה, יש הכרח לקיום אינברטאז באפופלסט *in vivo*. מקובל להניח כי אינברטאז חומצי מצוי בתאים כאנזים מסיס. יחד עם זאת, בעבודות קודמות, שהתפרסמו בספרות המדעית, נמדדה פעילות של אנזימי אינברטאז בדופן תאי ציפת פירות הדר. כדי לתת משנה תוקף לתוצאות מידור האינברטאז, המבוססות על מיצויים של מקטעים שונים, הוחלט על אימות קיומו *in situ* של אינברטאז קשור לדופן, באפופלסט בדרך מיקרוסקופית. קביעת מיקום על ידי הסתכלות מיקרוסקופית, עוזרת להתגבר על האפשרות של נוכחות תוצר לוואי, הנובע מהקשרות האינברטאז לדפנות התאים לאחר שיחרורו מהחללית בעקבות הריסוק, שבמהלך המיצוי. התוצאות בתפוז טבורי וכן ב"אור 1", מראות כי האנזימים Inv1 ו-Inv2 אינם ממודרים במקטע המסיס בלבד, כפי שהיו חשודים עד כה, אלא עשויים להקשר ולתפקד גם בדופן התא. זאת, כנראה, בתהליך שמשתנה לאורך התפתחות הפרי. לכן הוחלט לבדוק את מיקומם בתא, ע"י שימוש בנוגדנים לאיתור החלבונים *in situ* בחתכים של תאי שקיקי המיץ עצמם ולבחון, בעזרת מיקרוסקופ אלקטרוני חודר, את האפשרות שהאנזימים קשורים לדופן התא, בשלבי הבשלת הפרי. לשם הבנת המבנה התאי האופייני לשקיק מיץ בשלבי הבשלת הפרי, נערכה תחילה סקירה חזותית במיקרוסקופ אור של התאים בחתך לרוחב השקיק, בה ניתן להבחין במבנה האנטומי של סידור התאים צוברי המיץ בשקיק.

### 1.2.2. מבנה אנטומי של שקיקי המיץ בפלחי פרי התפוז הטבורי

התיאור האנטומי ברמה של מיקרוסקופ אור ניתן רק על חתך רוחב בשקיקי מיץ מפרי לפני הבשלה של תפוז טבורי, היות והתוצאות זהות לגבי יתר הזנים שנבחנו. הקוטר החיצוני של הפרי שממנו נלקחו השקיקים היה 70 מ"מ. ההסתכלות נערכה בגודל פרי זה, שלפני הבשלה, בו נראית היטב חלוקה לאיזורים שונים בשקיק המיץ.



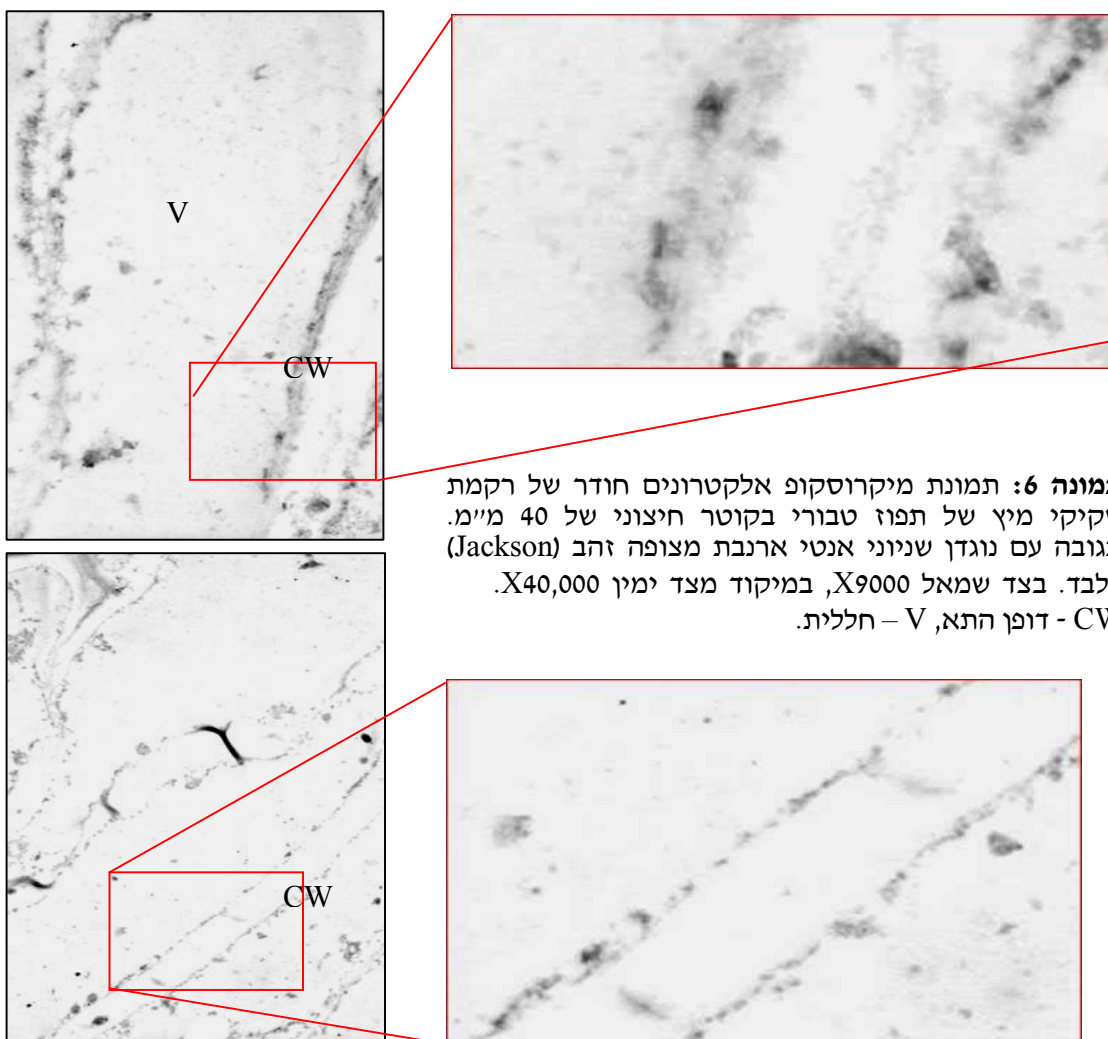
**תמונה 5:** תמונת מיקרוסקופ אור של רקמת שקיקי מיץ של תפוז טבורי בקוטר חיצוני של 70 מ"מ. חתך רוחבי דרך 4 אזורי תאים עיקריים שעברו קיבוע באגרוז. תאי אפידרמיס (E), תאים סובאפידרמאליים (1), תאים שטוחים גדולים המסודרים בצורה קונצנטרית (2) ותאים איזודיאמטריים (3). (ימין-X10, שמאל X5).

בתמונה 5 ניתן להבחין ב-4 אזורים של תאים המאורגנים בסידור קונצנטרי, בעלי מימדים פחות או יותר שווים. פנימה לאפידרמיס יש כ-1-3 שורות תאים סובאפידרמאליים פחות או יותר איזודיאמטריים, אחריהם, כלפי פנים, מופיעות כ-5 שורות תאים מאורכים בכיוון לרוחב השקיק. הדפנות של כל התאים האלה עבים יחסית והדופן החיצוני של התאים האפידרמאליים עבה במיוחד ואפשר להבחין בקוטיקולה רציפה המכסה אותם. איזור התאים היותר פנימי מכיל תאים איזודיאמטריים גדולים יותר ובעלי דופן דק יותר בהשוואה לתאים שבשכבות החיצוניות. אלה הם, כנראה, התאים העיקריים האוגרים את המיץ.

לאחר שנלמד מבנה התאים בשקיקי המיץ, ניבדק בעזרת מיקרוסקופ אלקטרוני חודר, באמצעות נוגדני אינברטאז ספציפיים, המיקום התוך תאי של חלבוני האינברטאזות בחתכים. המיקום נקבע בפירות תפוז טבורי צעירים ולקראת הבשלה (40 מ"מ ו-65 מ"מ קוטר פרי חיצוני בהתאמה) לגבי שני האיזו-אנזימים - Inv1 ו-Inv2.

### 1.2.2.2. ביקורת לנוגדני הסימון בחתכים למיקרוסקופ אלקטרוניים

כדי לבחון את הספציפיות של הנוגדנים בדוגמאות שנחתכו והוכנו להסתכלות במיקרוסקופ אלקטרוניים חודר, נערכו מספר ביקורות. ביקורת בה נעשה שימוש בנוגדן שניוני בלבד, נערכה בחתכים שהוכנו משקיקי מיץ של תפוז טבורי בקוטר 40 מ"מ, במטרה לשלול תגובה לא ספציפית של הנוגדן השניוני, שהיתה עלולה לגרום ליצירת רקע שימסך על פני החתך את הקישור האוטנטי לאינברטאזות.



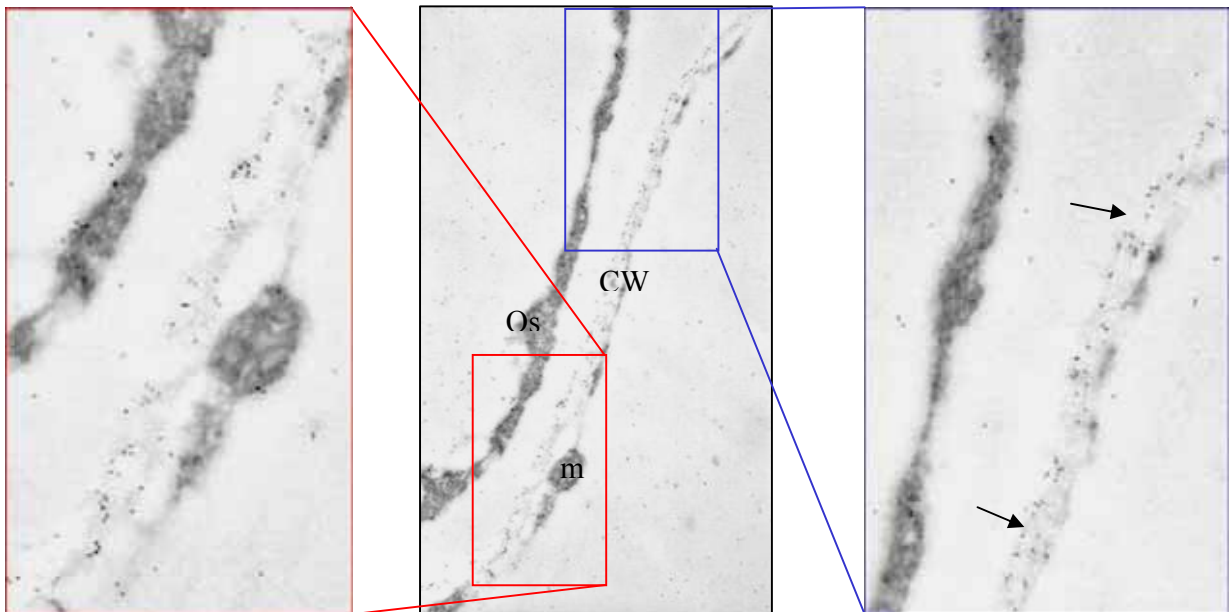
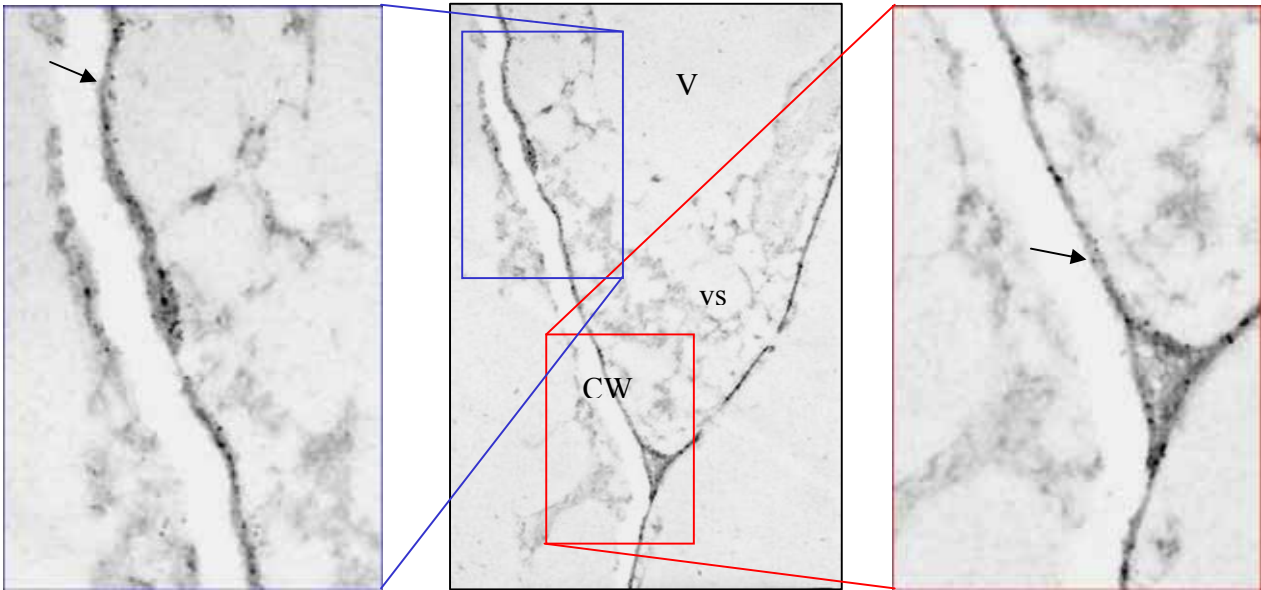
**תמונה 6:** תמונת מיקרוסקופ אלקטרוניים חודר של רקמת שקיקי מיץ של תפוז טבורי בקוטר חיצוני של 40 מ"מ. תגובה עם נוגדן שניוני אנטי ארנבת מצופה זהב (Jackson) בלבד. בצד שמאל X9000, במיקוד מצד ימין X40,000. CW - דופן התא, V - חללית.

בביקורת שלילית באמצעות נוגדן שניוני בלבד, לא נראה כל סימן לקישור לא ספציפי של נוגדן אנטי ארנבת מצופה זהב (Jackson) בחתכים מפרי של תפוז טבורי (תמונה 6). באנליזות חלבונים על פני ממברנות (western-blot) באמצעות סרום טרום התגובה החיסונית, נראה סימן לא ספציפי (לא מוצג). תוצאות אלה התקבלו בעקבות שימוש בארנבות שלא נבדקה תגובתן כנגד חלבוני הדרים, טרם פיתוח הנוגדנים לאינברטאז, בידי הצוות מ-UCDavis ממנו נתקבלו. על פניו יש מן התוצאות לפגוע בדבר אמינותם של ספציפיות הנוגדנים שהופקו. אך בגלל שיטת ניקיון הנוגדנים לאחר הפקתם ע"י זיכוך באמצעות קישור (Affinity-purification) והתוצאות הספציפיות, שמיוצגות באנליזות חלבונים דומים על פני ממברנות, הוחלט כי ביקורת באמצעות סרום לא רלוונטית. ביקורת זו אינה מייצגת את רמת הספציפיות הגבוהה של הנוגדנים לאחר הניקיון ולכן לא מוצגת בחתכים למיקרוסקופ אלקטרוניים, בהם נעשה שימוש לאימונו-לוקליזציה.

#### 2.2.2.2. מיקום מדורי התא בעזרת צביעה וסימון ממברנות החללית

גודלם של התאים אוגרי המיץ, שנמצאים באיזור המרכזי של השקיק, יוצרים קשיים טכניים בתמונת מיקרוסקופ האלקטרוני. קיים קושי להבחין במבנה התא, עקב אחוז המים הגבוה הגורם לחללית לתפוס את מירב מרחב התא ולעוות תמונת יתר האיברונים. כדי להבדיל בין האיברונים ולהתמקם טוב יותר במרחב התאי, נעשה שימוש בנוגדנים שהתקבלו ממעבדתו של ד"ר משה ראובני, שכבר הוכיחו את יעילותם בניסויים קודמים. הנוגדנים שנוסו, ספציפיים כנגד תת יחידה חיצונית E של חלבון ה-vATPase, הידוע כמשולב בממברנת החללית בתא. סימון הטונופלסט יסייע להסיק לגבי מידור יתר האיברים בתא. כמו כן נעשה שימוש בקיבוע חלק מהדוגמאות באוסמיום, הצובע דפנות תאים באופן כללי, כדי להדגיש את קוי מתאר התאים.

נראה היטב (תמונה 7) האיזור המסומן על ידי נוגדני ה-vATPase, בקרבת הדופן (שצבוע בכהה יותר בידי האוסמיום). מאחר וכאמור הנוגדנים מכירים תת יחידה E של ה-vATPase בטונופלסט, ניתן להסיק כי האיזור הצבוע הוא אכן ממברנת החללית. צמידות זו בין הטונופלסט לדופן נגרמת, כנראה, עקב תפוסת הנפח הרבה של החללית, המגיעה עד לכדי 90% מנפח התא הכללי. הנפח הרב דוחק את כל האיברונים לפריפריית התא ומקרבים לדופן. אף יתכן כי הלחץ הגדול, שמפעיל הנוזל הרב על הקרום שעוטף את חללית תאי שקיקי המיץ, גורם לקריעתו של הטונופלסט בשעת הכנת הרקמה לחיתוך. קרעים אלה נמצאים בקרבת הדופן ולכן נראים צמודים.

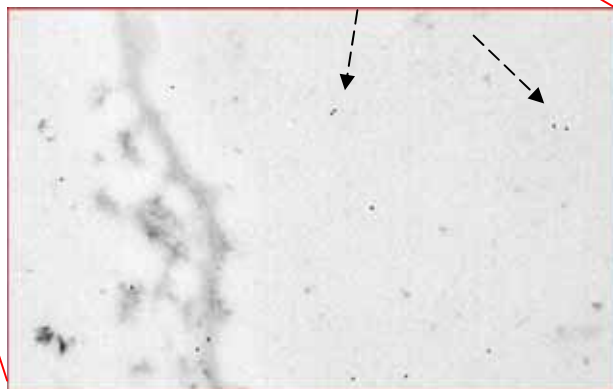
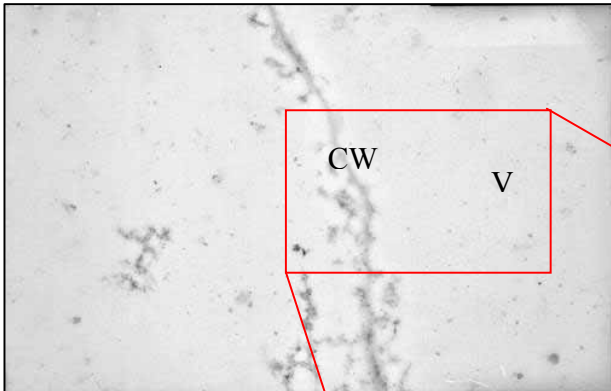
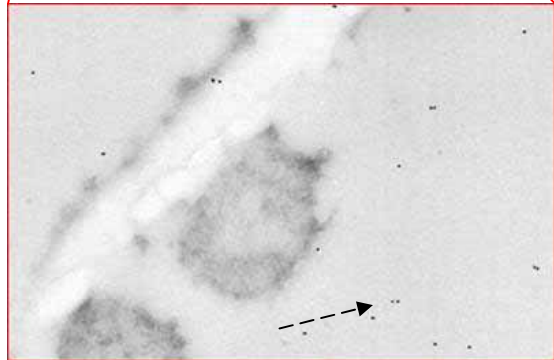
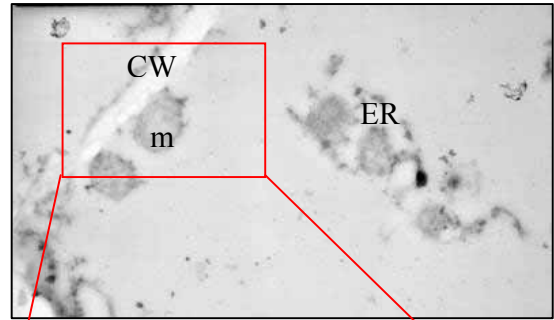
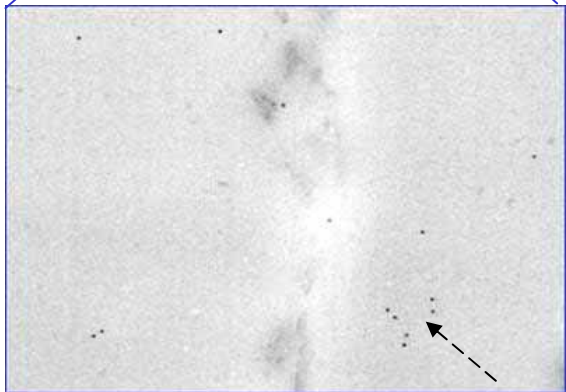
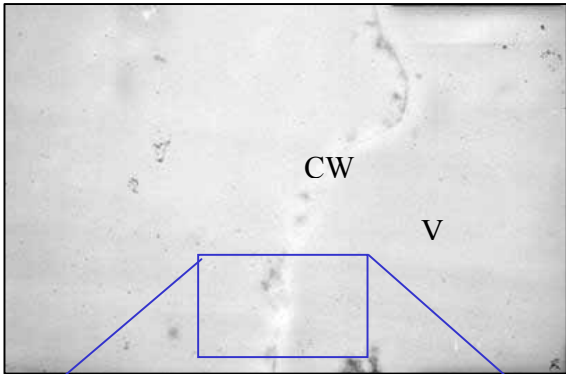


**תמונה 7:** תמונת מיקרוסקופ אלקטרוני חודר של רקמת שקיקי מיץ של תפוז טבורי בקוטר חיצוני של 65 מ"מ, שעברו קיבוע באוסמיום. תגובה עם נוגדנים ליחידה E של vATPase קשור לממברנת החללית. במרכז X9000, משני הצדדים X40,000. CW - דופן התא, Os - חומר אוסמיופילי, V - חללית, vs - וסיקולה, m - מיטוכונדריה.

בניסוי עם נוגדני ה- vATPase ניתן לראות יפה את ספציפיות הנוגדנים לממברנת חללית התא, כאשר הם מצומדים ברציפות לאורך הממברנה וכמעט אינם נראים בשום מדור אחר בתא. התאים שלמים ולמרות הצביעה באוסמיום לאורך דופן התא, לא נראית פגיעה בקישור הנוגדן.

### 3.2.2. קביעת מיקום Inv1 ו-Inv2 בתאי שקיקי מיץ מתפוז טבורי צעיר (בקוטר 40 מ"מ)

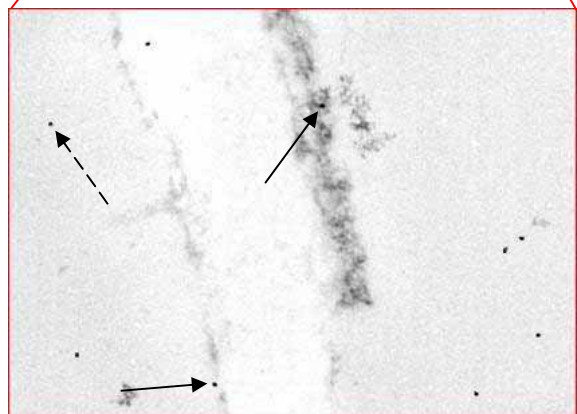
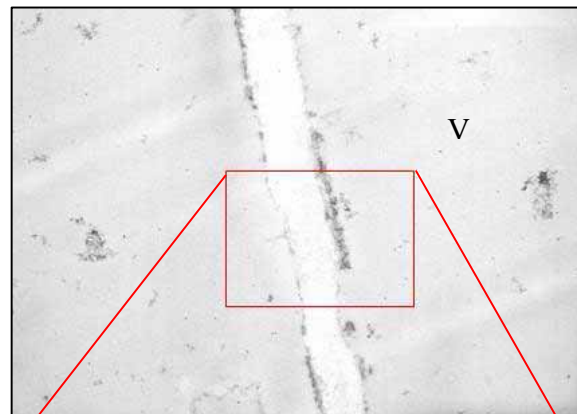
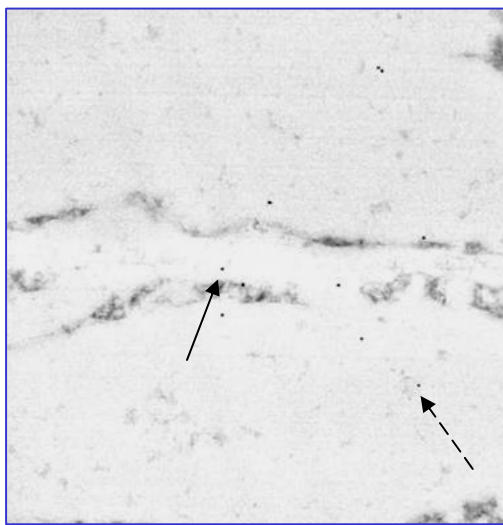
מבנה התאים באיזור המרכזי של שקיקי המיץ שלאחר הדיפרנציאציה מאפשר להבדיל בסוג תאים גדולים שהציטופלסמה שלהם צפופה מאוד ובעלת ER חלק וארוך, המפריש חומר אוסמיופילי כהה המופיע בין הדופן לפלסמה ומכילה מיטוכונדריות רבות וגדולות (תמונה 8). חלק ניכר מהציטופלסמה נעלם, כנראה, כתוצאה מתהליך החיתוך ובין הדופן והציטופלסמה נוצר רווח. בדופן יש שני אזורים כהים ואזור בהיר ביניהם. לעיתים נראות גם בליטות של דופן ולפעמים בגלל מישור החיתוך הן נראות כדופן מנותק אשר נמצא בתוך "אי" ציטופלסמתי. הדופן דק אך שלם ורציף ולעיתים בסמוך אליו יש אזורים מרובי וסיקולות (תמונה 7).



**תמונה 8:** תמונת מיקרוסקופ אלקטרוניים חודר של רקמת שקיקי מיץ של תפוז טבורי בקוטר חיצוני של 40 מ"מ. תגובה עם נוגדנים כנגד אינברטאז חומצי, למעלה - Inv1, למטה - Inv2. נראה כי קיים גם סימון של אינברטאז חומצי קשור דופן, אך רוב הסימון מסיס וניתן לשער, על פי ניתוח התמונה, כי נמצא בחללית. למעלה - X9000, במיקוד מלמטה - X40,000. CW - דופן התא, V - חללית, ER - רטיקולום אנדופלסמי, m - מיטוכונדריה.

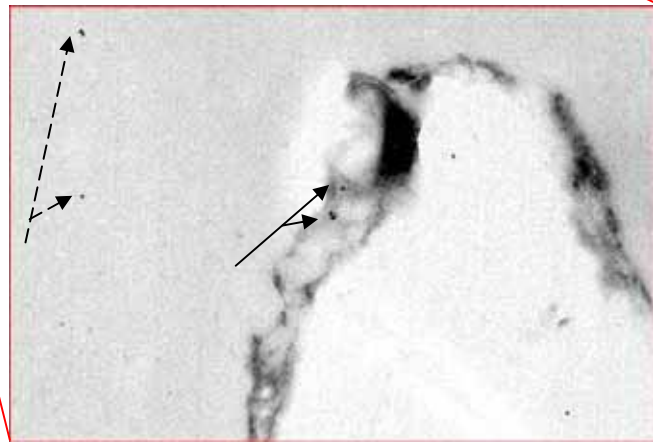
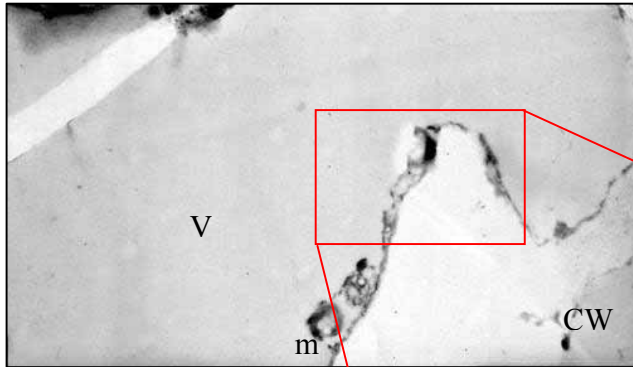
בתגובה של חתכי פרי תפוז טבורי צעיר עם נוגדנים ל-Inv1 ו-Inv2, נראה סימון רב כמסיס באיזור החשוד כחללית התאים ומעט מאוד נראה ספציפי לדופן התאים. מכאן ניתן לשער שהמיקום התוך תאי של האינברטאז החומצי בשלבי התפתחות ראשוניים של הפרי הוא בעיקר בחללית התא והדבר תואם ממצאי אנליזות המקטעים (תמונה 4).

**4.2.2. קביעת מיקום Inv1 ו-Inv2 בתאי שקיקי מיץ מתפוז טבורי לקראת הבשלה (בקוטר 65 מ"מ)**  
 בחתך הרחוב בפרי לקראת הבשלה, נצפה במיקרוסקופ אור איזור עם תאים בעלי מבנה המשתנה ממאורך עד למבנה לא ברור במרכז (תמונה 5). בהסתכלויות שנעשו בפרי לקראת הבשלה במיקרוסקופ אלקטרוני, מתגלה האיזור המרכזי של שקיות המיץ כאיזור המכיל בעיקר תאים מאורכים. כנראה, שהתאים שבמרכז שקיקי המיץ לא שרדו יפה את הקיבוע ונהרסו במהלך החיתוך בשל גודלם הרב והיותם מורכבים בעיקר מנוזל החללית, המפותחת מאוד בשלב זה. דפנות התאים שנותרו ללא פגע נראים שלמים ובעלי עובי משתנה. הפלסמה בחלק מהמקרים התרחקה מהדופן או נהרסה. גם הטונופלסט בחלק מהמקרים לא נראה. לעיתים נראים שרידי המטריקס הציטופלסמטי או שהוא נעלם לגמרי (תמונה 9).



**תמונה 9:** תמונת מיקרוסקופ אלק' חודר של רקמת שקיקי מיץ של תפוז טבורי בקוטר חיצוני של 65 מ"מ. תגובה עם נוגדנים כנגד Inv1. קיים סימון של אינברטאז חומצי וניתן לשער, על פי ניתוח התמונה, כי נמצא **מסיס** (חץ מקווקו) באיזור החשוד כחללית וגם סימון של אינברטאז שכנראה נמצא **כקשור לדופן** (חץ רציף). מימין למעלה X9000, במיקוד למטה ומשמאל X40,000. CW - דופן התא, V - חללית.





**תמונה 10:** תמונת מיקרוסקופ אלקי חודר של רקמת שקיקי מיץ של תפוז טבורי בקוטר חיצוני של 65 מ"מ. תגובה עם נוגדנים כנגד Inv2. קיים סימון של אינברטאז חומצי שכנראה, על פי ניתוח התמונה, נמצא **מסיס** (חץ מקווקו) באיזור החשוד כחללית וגם סימון של אינברטאז **קשור לדופן** (חץ רציף). למעלה X9000, במיקוד למטה X40,000. CW - דופן התא, V - חללית, m - מיטוכונדריה.

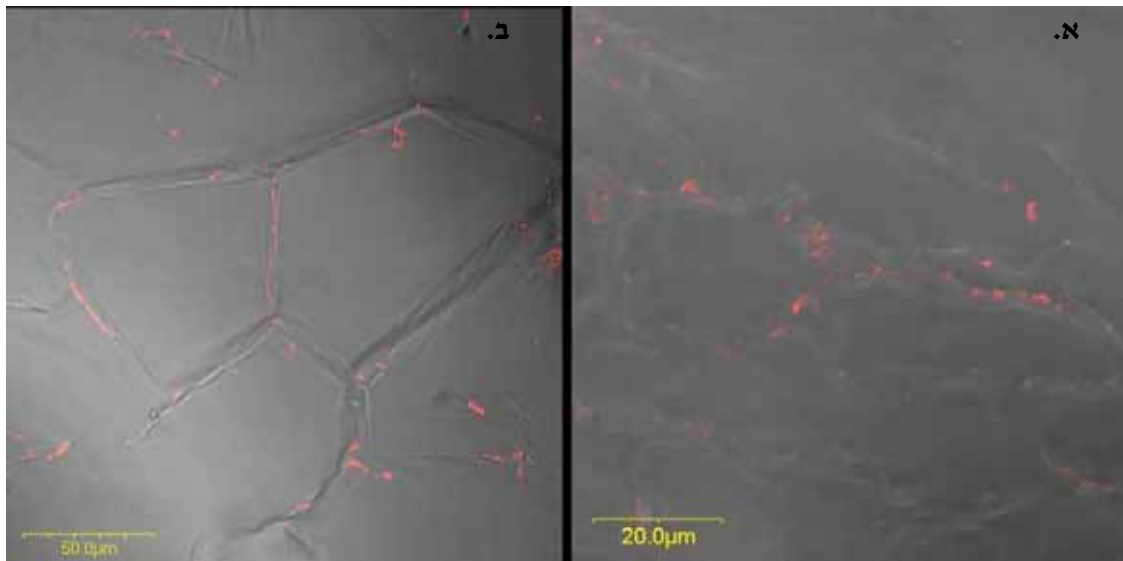
בתגובה של חתכי פרי תפוז טבורי לקראת הבשלה עם נוגדנים ל-Inv1 ו-Inv2, נצפה סימון כלשהו כמסיס באיזור החשוד כחללית, כמו כן נראה סימון במה שניתן להעריך כדופן. מכאן שכנראה המיקום התוך תאי של האינברטאז החומצי, בשלבים שלפני הבשלת הפרי, הוא גם קשור לדופן התא. הדבר תואם ממצאי אנליזות המקטעים, בה נראה בבירור סימון של אינברטאזות במקטע הקשור לדופן כמו גם במקטע המסיס (תמונה 4).

### 3.2. אישוש קביעת מידור של אנזימי Inv1 ו-Inv2 באמצעות אימונו-לוקאליזציה נוספת

תוצאות מידור האינברטאז, המבוססות על אימונו-לוקאליזציה בחתכים למיקרוסקופ אלקטרוני, מראות קיומו in situ של אינברטאז קשור לדופן, באפופלסט, בעיקר בפרי שלפני הבשלה. כדי לאשש את התוצאות הנ"ל בחתכים, נבדק המיקום התוך תאי של חלבוני האינברטאזות, תוך שימוש במיקרוסקופ קונפוקאלי, באמצעות נוגדני אינברטאז ספציפיים. המיקום נקבע בפירות תפוז טבורי לקראת הבשלה (70 מ"מ קוטר פרי חיצוני) לגבי שני האיזו-אנזימים - Inv1 ו-Inv2, תוך שימוש בנוגדנים שניוניים פלואורוצנטריים אדומים מסוג CY3 (Jackson).

### 2.3.2. ביקורת לנוגדני הסימון בחתכים למיקרוסקופ קונפוקאלי

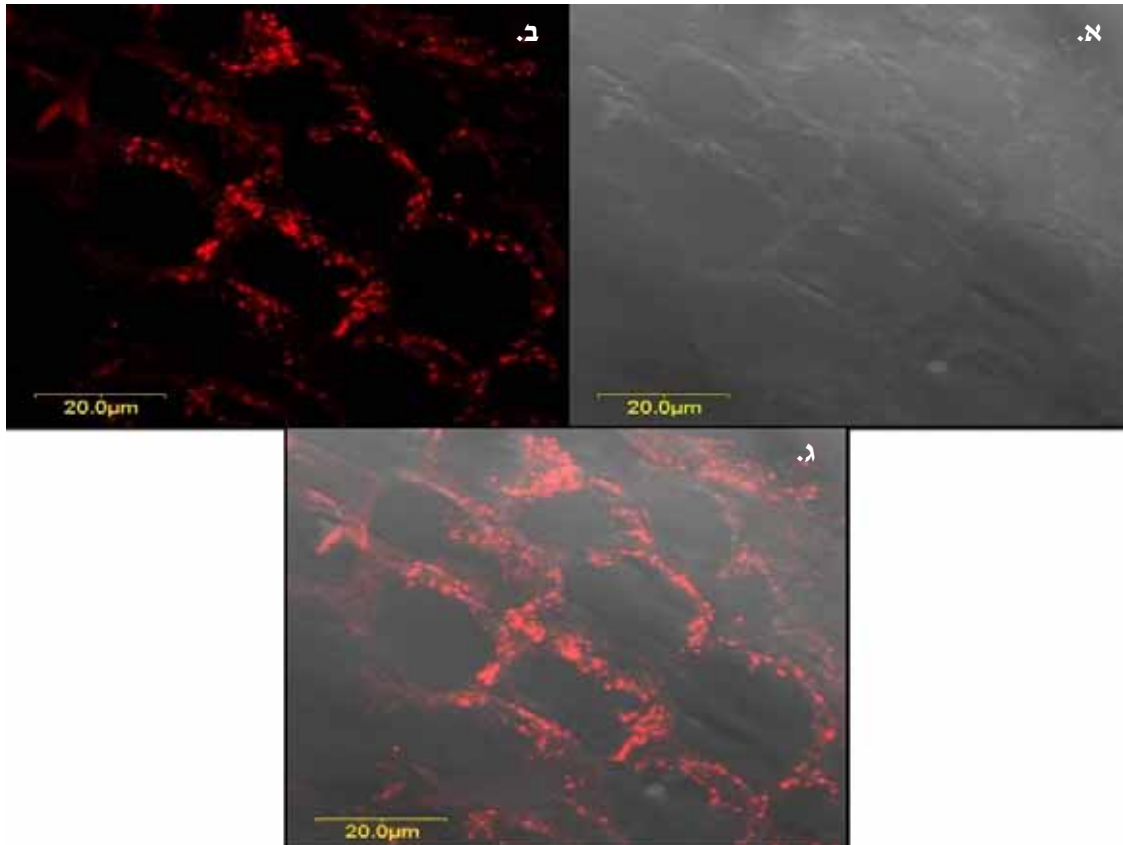
כדי לבחון את הספציפיות של הנוגדנים בדוגמאות שנחתכו והוכנו להסתכלות במיקרוסקופ קונפוקאלי, נערכו מספר ביקורות. ביקורת באמצעות סרום טרום התגובה החיסונית מארנבות וכן ביקורת בה נעשה שימוש בנוגדן שניוני בלבד. הביקורות נערכו בחתכים שהוכנו משקימי מיץ של תפוז טבורי בקוטר 70 מ"מ, במטרה לשלול תגובה לא ספציפית של הסרום ו/או הנוגדן השניוני, שעלולה לגרום רקע שימסך את הקישור האוטנטי לאינברטאזות על פני החתך, **תמונה 11**.



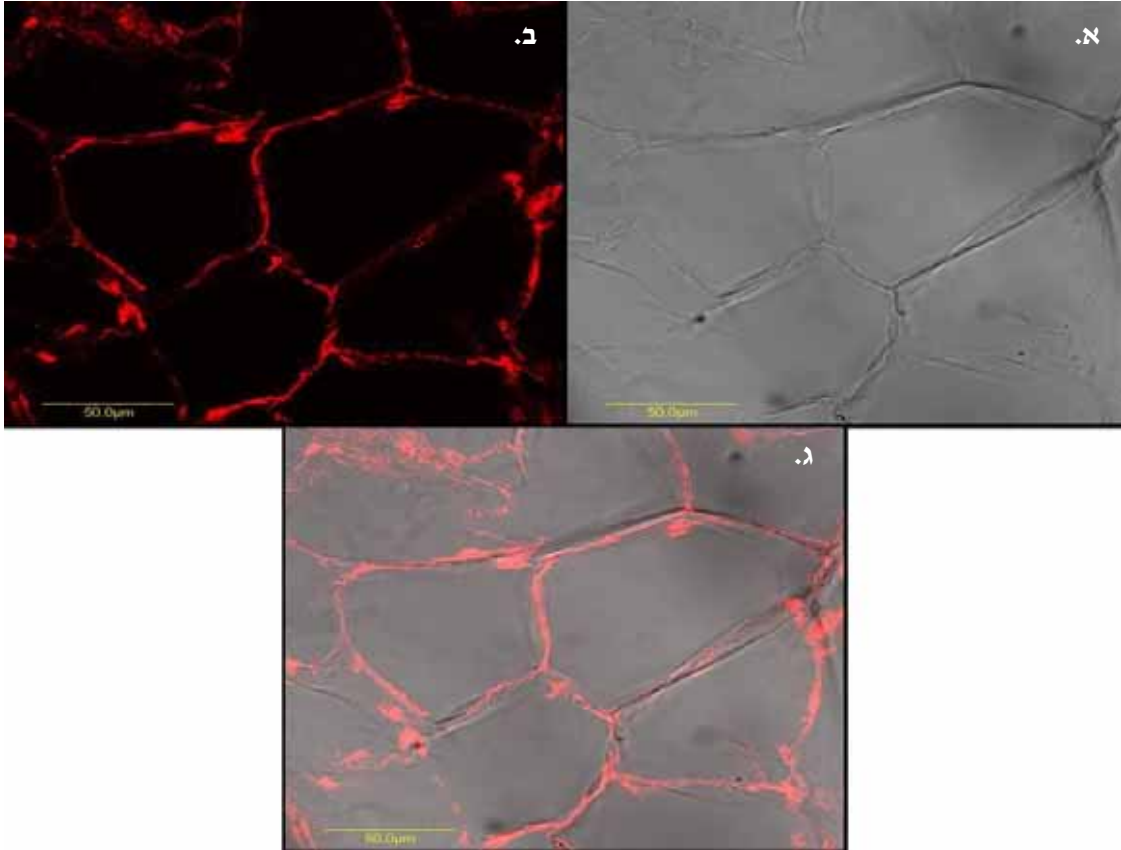
**תמונה 11:** תמונת מיקרוסקופ קונפוקאלי של רקמת שקיקי מיץ של תפוז טבורי בקוטר חיצוני של 70 מ"מ. חתך רוחבי דרך תאי שקיקי המיץ שעברו קיבוע באגרוז. מימין (א) – תגובה עם נוגדן שניוני אנטי ארנבת CY3 (Jackson) בלבד, משמאל (ב) – תגובה עם סרום ארנבת טרום התגובה החיסונית.

בביקורת שלילית באמצעות סרום וכן עם נוגדן שניוני בלבד נראה, בחתכים מפרי של תפוז טבורי, קישור לא ספציפי מועט ביותר של נוגדן אנטי ארנבת CY3 (Jackson). רמה נמוכה זו אופיינית לנוגדנים פלואורוצנטיים בתגובה עם דופן תאים צמחיים ואינה פוגמת במידת איכות הסימון הספציפי העיקרי.

**3.3.2. קביעת מיקום Inv1 ו-Inv2 בתאי שקיקי מיץ מתפוז טבורי לקראת הבשלה (בקוטר 70 מ"מ)**  
 בחתך הרוחב בתפוז טבורי לקראת הבשלה (70 מ"מ קוטר פרי חיצוני), נראים במיקרוסקופ הקונפוקאלי איזורי התאים במרכז שקיקי המיץ. בחתכים אלה התבצעה תצפית אחר מיקום החלבונים שזוהו על ידי נוגדני האינברטאזות. הסימון נעשה כנגד שני האיזו-אנזימים - Inv1 ו-Inv2 בנפרד (שיטות וחומרים), תוך שימוש בנוגדנים שניוניים פלואורוצנטריים אדומים מסוג CY3 (Jackson). מוצג בתמונה 12 ובתמונה 13.



**תמונה 12:** תמונת מיקרוסקופ קונפוקאלי של רקמת שקיקי מיץ של תפוז טבורי בקוטר חיצוני של 70 מ"מ, שעברו קיבוע באגרוז. תגובה עם נוגדני Inv1. (א) – תמונת התאים ללא עירור בלייזר. (ב) – סימון פלואורוצנטי של נוגדני Inv1. (ג) – שילוב בין תמונות א. ו-ב. הממקם את הסימון של Inv1 בתאים.



**תמונה 13:** תמונת מיקרוסקופ קונפוקאלי של רקמת שקיקי מיץ של תפוז טבורי בקוטר חיצוני של 70 מ"מ, שעברו קיבוע באגרוז. תגובה עם נוגדני Inv2. (א) – תמונת התאים ללא עירור בלייזר. (ב) – סימון פלואורוצנטי של נוגדני Inv2. (ג) – שילוב בין תמונות א. ו-ב. הממקם את הסימון של Inv2 בתאים.

בתגובה של חתכי פרי תפוז טבורי לקראת הבשלה עם נוגדנים ל-Inv1 ו-Inv2, נראה סימון במה שניתן להעריך כדופנות התאים. מכאן שכנראה המיקום התוך תאי של האינברטאז החומצי, בשלבים שלפני הבשלת הפרי, הוא כנראה בעיקר כקשור לדופן התא. הדבר תואם ממצאי אנליזות המקטעים, בה נראה בבירור סימון של אינברטאזות במקטע הקשור לדופן כמו גם במקטע המסיס (תמונה 4).

### 3. מעקב אחרי רמת ה-mRNA, החלבון והפעילות של האינברטאז החומצי

RNA וחלבונים הופקו משחלות, חנטיים ושקימי מיץ שנאספו משלבים התפתחותיים שונים של ארבעה זני פירות הדר, השונים מעט ביניהם בנוגע לניהול מערך הסוכר בתאי הפרי: 1. "אור 1" – קליף המהווה את זן הדגל העכשוי לייצוא וצובר רמה גבוהה של סוכר בתום התפתחותו. 2. תפוז טבורי - צובר רמה גבוהה של סוכר וחומצה. 3. לימטה מתוקה – שומרת על רמה נמוכה וקבועה של סוכר וחומצה עם התפתחות הפרי. 4. לימון חמוץ – שומר על רמה נמוכה מאוד של סוכר וצובר כמות רבה של חומצה לאורך התפתחות הפרי (פירוט נוסף בטבלה מס' 2).

זן	צבירת סוכר	צבירת חומצה
<b>אור 1</b>	עליה הדרגתית במהלך התפתחות הפרי עם עליה יותר משמעותית לקראת ההבשלה עד לערך של 230-260 מ"גגר' חומר טרי (סוכרוז: גלוקוז: פרוקטוז ביחסים של 3:1:1 לערך).	עליה הדרגתית עד לערך של 4-5% חמיצות כללית כשהפרי מגיע למחצית גודלו לערך, ואז ירידה הדרגתית עד לערך של פחות מ-1% חמיצות כללית בפרי הבשל.
<b>תפוז-טבורי</b>	עליה הדרגתית במהלך התפתחות הפרי עם עליה יותר משמעותית לקראת ההבשלה עד לערך של 200-220 מ"גגר' חומר טרי (סוכרוז: גלוקוז: פרוקטוז ביחסים של 2:1:1 לערך).	עליה הדרגתית עד לערך של כ-4% חמיצות כללית כשהפרי מגיע למחצית גודלו לערך, ואז ירידה הדרגתית עד לערך של כ-1.5-1% חמיצות כללית בפרי הבשל.
<b>לימטה-מתוקה</b>	רמת הסוכר משתנה מעט לאורך התפתחות הפרי, נעה בין 40 עד 80 מ"גגר' חומר טרי (סוכרוז: גלוקוז: פרוקטוז ביחסים 6:6:1 לרוב).	אין צבירת חומצה.
<b>לימון-חמוץ</b>	רמת הסוכר משתנה מעט מאוד לאורך התפתחות הפרי, נעה בין 30 ועד 50 מ"גגר' חומר טרי (סוכרוז: פרוקטוז: גלוקוז ביחסים 1:1:1 לרוב).	החומצה עולה ומגיעה למקסימום (6-7% חמיצות כללית) בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרי, וכמעט אינה יורדת.

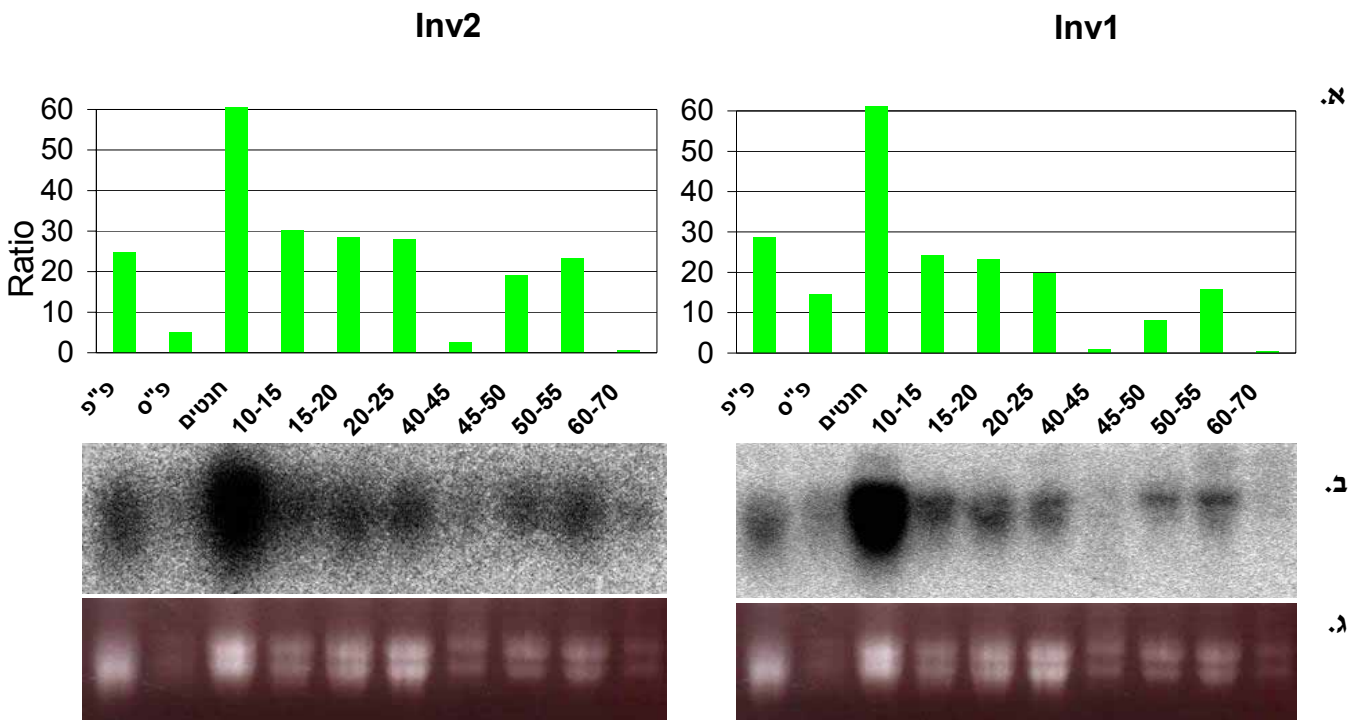
**טבלה מס' 2:** זני פירות ההדר שנבדקו בעבודה זו ופירוט ההבדלים באופי צבירת הסוכרים והחומצה שביניהם (Sinclair 1984, Tzur 1994).

מלבד שקיות המיץ, נבדקו בכל אחד מהזנים שחלות ו/או חנטיים. תוצאות המעקב בשחלות ובחנטיים נבדלות מהמדידות שנעשו בשלבי התפתחות שקיות המיץ בפרי, בעיקר משום שרוב החומר הצמחי בהן משויך לרקמת האלבדו (אין בהם עדיין שקימי מיץ). למרות זאת הן מוצגות בסמוך, כיוון שהשחלות והחנטיים מייצגים את מקור הפרי, אך אין לראות בהם שלבים ברי השוואה להתפתחות שקיות המיץ בפרי.

זיהוי mRNA נעשה על ידי גלאים, שהוכנו מהשבטים של Inv1 ו-Inv2, שבודדו מפרי התפוז הטבורי. זיהוי החלבונים התאפשר בזכות נוגדנים ספציפיים, אשר הופקו מאיזורים ייחודיים ברצף חומצות האמינו בעלי שונות גבוהה ביחס לאינברטאזות קשורות דופן, ניטראליות וביחס לצמחים ממיינים שונים (תמונה 2).

### 1.3 שינויים בביטוי הגנים ל-Inv1 ו-Inv2 לאורך התפתחות הפרי "אור 1"

בשלבי התפתחות שונים של פרי קליף מזן "אור 1" נאספו החל משחלות, שנלקחו מפרחים סגורים ומפרחים פתוחים, דרך חנטים ועד לפירות בעלי קוטרים עולים בהדרגה מ-10 עד 70 מ"מ. מעקב אחרי שינויים בביטוי הגנים Inv1 ו-Inv2 לאורך התפתחות הפרי, נעשה על ידי כימות רמת ה-mRNA תוך סטנדרטיזציה של הסיגנאל הרדיואקטיבי עם רמת ה-RNA הריבוזומלי הצבוע באתידיום ברומיד, כפי שניתן לראות בתמונה 14.

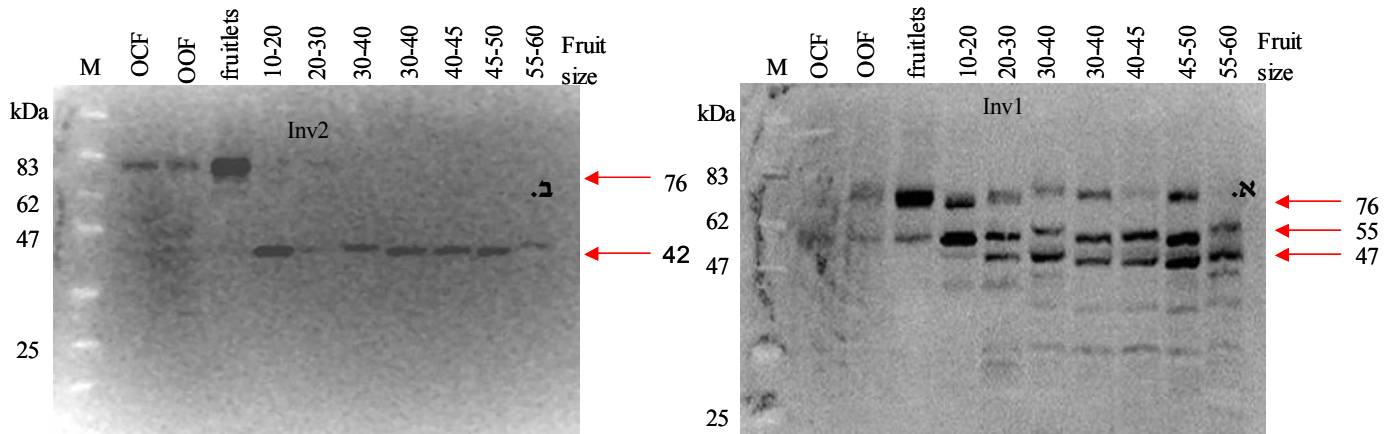


**תמונה 14:** תבנית ביטוי הגן ברמת ה-RNA לאורך התפתחות פרי "אור 1", מימין - Inv1, משמאל - Inv2. (א.) גרף חישוב הביטוי היחסי בין השלבים השונים לאחר נירמול בין האות הרדיואקטיבי (ב.) לבין כמות ה-RNA הריבוזומלי (ג.) פ"ס - שחלות מפרחים סגורים, פ"פ - שחלות מפרחים פתוחים.

הגנים Inv1 ו-Inv2 בעלי תבנית ביטוי דומה לאורך התפתחות הפרי. בחנטים נראה שיא ברמת ה-mRNA (יש ליחס רמה גבוהה זו לרקמת האלבדו המהווה את רוב החומר בחנטים). הם יורדים לאורך התפתחות הפרי עד רמה נמוכה ביותר בגודל של 40-45 מ"מ ואז שוב עולים מעט לקראת הבשלת הפרי בגודל 50-55 מ"מ.

### 2.1.3. שינויים ברמת החלבונים Inv1 ו-Inv2 לאורך התפתחות הפרי "אור 1"

נאספו שלבי התפתחות תואמים של קליף מזן "אור 1" - שחלות, שנלקחו מפרחים סגורים ומפרחים פתוחים, חנטים וציפה מתוך פירות בגדלי קוטר עולים בהדרגה מ-10 מ"מ עד 60 מ"מ. כפי שניתן לראות בתמונה 15.



**תמונה 15:** רמת החלבונים של Inv1 ו-Inv2 בשחלות וציפות פרי של "אור 1" בשלבי התפתחות שונים, כמצוין על פי קטרי הפירות א. מימין Inv1, ניתן לראות התפלגות בגודל התוצרים החלבוניים שנותנים פסים בגדלים של 76kDa, 55kDa ו-47kDa. משמאל Inv2 תוצרים בגדלים של 76kDa ו-42kDa. M – סמן, OCF – שחלות מפרחים סגורים, OOF – שחלות מפרחים פתוחים, FL – חנטים.

מתקבלים חלבונים במספר גדלים, כאשר הגודל 76kDa, המוערך כגודלו הצפוי של החלבון השלם (ע"פ גודל שבט המכיל כ-680 חומצות אמינו), מוכר על ידי הנוגדנים כנגד Inv1 ו-Inv2. בחלבון מופיע בעוצמות משתנות לאורך כל התפתחות הפרי, אך ב-Inv2 מופיע בשחלות ובחנטים בלבד וכלל לא בציפת הפרי בשלבי ההתפתחות השונים. ב-Inv1 מתקבלים בנוסף לחלבון השלם גם חלבונים בגדלים 55kDa ו-47kDa וב-Inv2 מתקבל חלבון נוסף בגודל 42kDa. כללית, נראה כי החלבונים Inv1 ו-Inv2 מראים דגם ביטוי דומה, אם מעריכים את סכום עוצמת התוצר הגבוה עם זה של התוצרים הנמוכים, כאשר בחנטים נראה שיא בביטוי שיווה לאורך התפתחות הפרי. ב-Inv1 נראית ירידה ברמת החלבון בגודל פרי של 40-45 מ"מ ואחריו שוב עליה ברמת הביטוי עם הבשלת הפרי בגודל 45-50 מ"מ. ב-Inv2 נראית ירידה ברמת החלבון בגודל פרי של 20-30 מ"מ ואחריו גם כן עליה עם הבשלת הפרי בגודל 45-50 מ"מ. שינויים אלו ברמת החלבון תואמים את דוגמת הביטוי ברמת ה-RNA באופן כמעט מלא.

### 3.1.3. פעילות אנזימתית בציפת הפרי "אור 1" בשלבים התפתחותיים שונים

ניסויים מוקדמים לבדיקת פעילות אינברטאז בציפה של פרי "אור 1", נעשו בפירות לקראת הבשלה. הריסוק והמיצוי מתוארים בשיטות וחומרים. לאחר הסינון והסירכוז ב-18,000g הושקע התסנין ב-85% רוויה של  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  למשך לילה והועבר דרך עמודה מקוררת של Sephadex-G25. התסנין נאסף במקטעים, שהורצו בג'ל אקריל-אמיד נאטיבי. הדגרת הג'ל בוצעה בבופר פוספאט-ציטראט (pH-5), בתוספת 100mM סוכרוז, כאשר זיהוי האנזים הפעיל נעשה בשיטה האנזימתית (עם האנזימים גלוקוז אוקסידאז-GOD ופראוקסידאז-HRP) וריאגנט 3,3 די-אמינו בנוואידין (DAB). למרות כמויות החלבון הגדולות שהוטענו בג'ל, לא התקבלה צביעה נראית לעין. לפיכך הוחלט לחפש אחר שיטה נוספת לזיהוי פירוק הסוכרוז כמדד לפעילות האנזים.

ניסויים מוקדמים שנערכו באמצעות ריאגנט 5,3,2 טרי-פניל טרה-זוליום כלוריד (TTC) בנוכחות אינברטאז מסחרי (Sigma) נתנו תוצאות צביעה חזקה והראו שניתן לזהות פעילות אינברטאז בג'ל. לביסוס השיטה הוחלט לבחון צביעה של פעילות אנזימים במיצויים מציפות פרי בשלבים

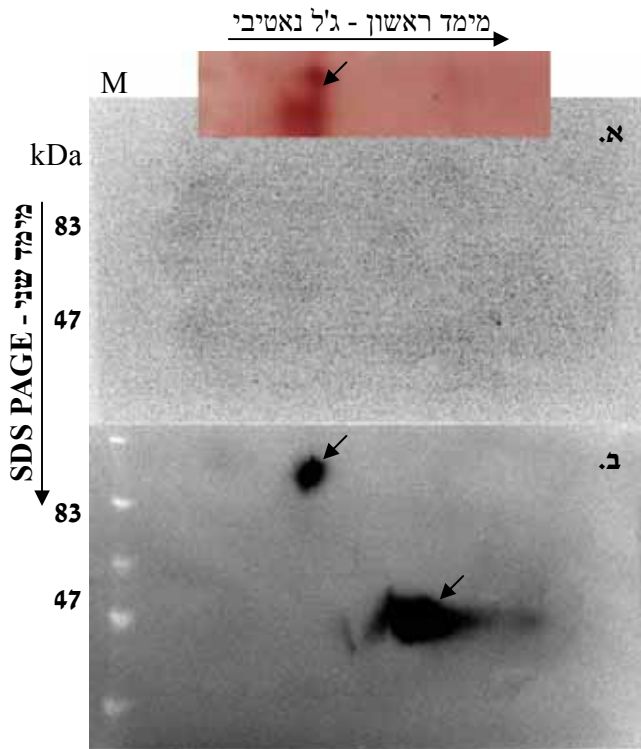
גודל (מ"מ) פרי "אור 1"	20	30	40	60
	-30	-40	-50	-70



התפתחותיים שונים (מקוטר של 20-30 מ"מ עד 60-70 מ"מ). לאחר פיתוח השיטה והתאמת זמן ו-pH אופטימאלי לצביעת הפעילות, נעשתה ההדגרה ע"פ המתואר בשיטות וחומרים. רמת ההפרדה בג'ל הנאטיבי היתה נמוכה, אולם למרות זאת נראה כי התקבלה צביעה בפס פעילות אחד. הצביעה ברורה בעיקר בשלבי ההתפתחות הצעירים (בפרי בקוטר חיצוני של עד 40 מ"מ), תמונה 16.

**תמונה 16:** צביעת פעילות חלבוני האינברטאז לאורך התפתחות פרי "אור 1", בעזרת TTC. בכל טור הוטענו 100µg חלבון של מיצוי מציפת פירות בקוטר חיצוני עולה החל מ-20 מ"מ ועד 70 מ"מ, משמאל לימין.



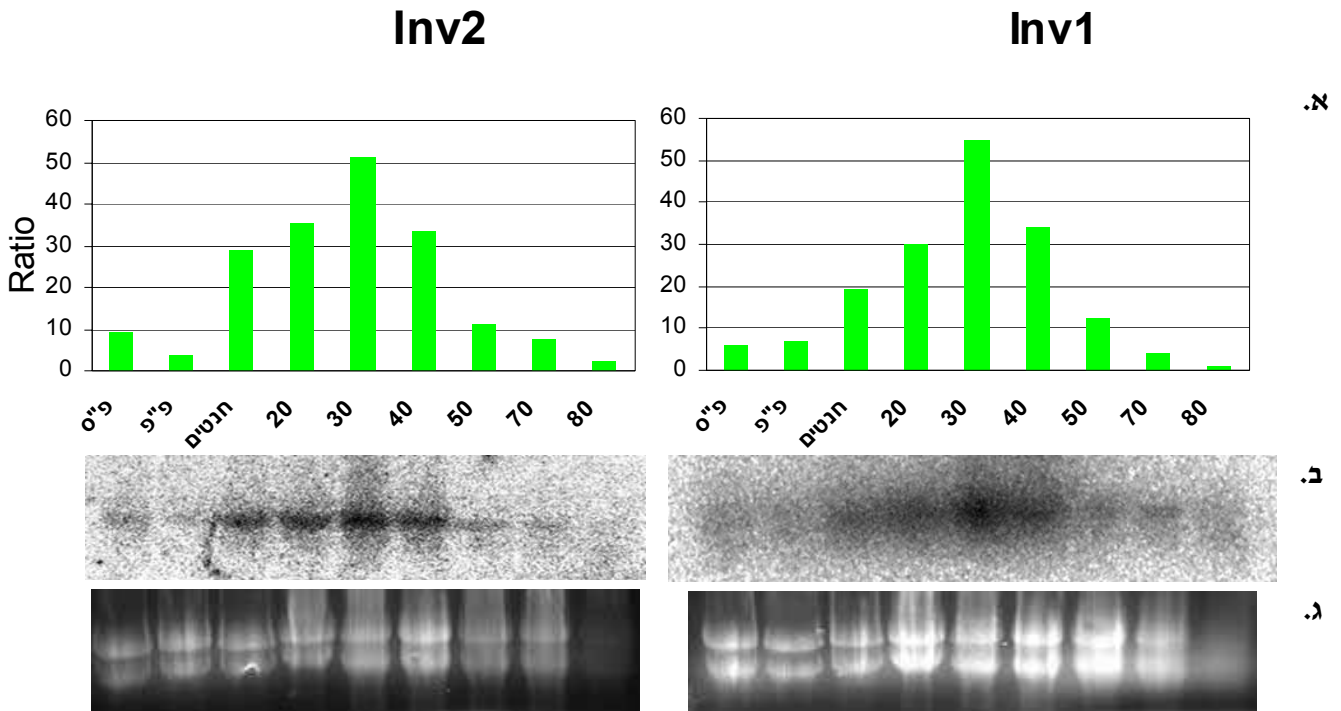


**תמונה 17:** בדיקת התאמה בין צביעת הפעילות לתספיג. הטור של קוטר של 20-30 מ"מ הורץ במקביל פעם שניה בגיל SDS במצב מאוזן, ליצירת מימד שני, שהוספג לממברנה ועבר הכלאה עם נוגדני Inv1 (א) ו-Inv2 (ב), נתקבלו תוצרים המקבילים לגובה הצביעה בגודל 90kDa וכן שברים בגודל 47kDa שאינם נראים בצביעת הפעילות, זאת רק בתגובה לנוגדני Inv2 בלבד, בעוד שנוגדני Inv1 לא הראו תוצרים כלל, המראה כי הצביעה ספציפית למיקום עליו מצביעים נוגדני Inv2 בתספיג.

בציפת הפירות הצעירים של "אור 1" (קוטר פרי של 20-30 וכן 30-40 מ"מ) נמצאה פעילות גבוהה של אינברטאז חומצי (נבדק ב-pH אופטימלי לפעילות חומצית – 4.5). הפעילות ירדה עם התפתחות הפרי ואינה נראית לעין בשלבים שלקראת הבשלה (קוטר 40-50 ועד 60-70 מ"מ). בבדיקות השוואת צביעת הפעילות לעומת סימון עם נוגדנים נראית התאמה גבוהה המאשרת את ספציפיות הצביעה לנוכחות האינברטאזות במקום זה על הגיל, הדבר אושש תוך שימוש בטכניקה של הרצה בשני מימדים: חלבונים, מהשלב שהראה את צביעת הפעילות החזקה ביותר (20-30 מ"מ), הורצו במקביל לצביעת הפעילות. לאחר מכן הורצו במימד שני בתוך ג'ל דנאטורטיבי (בתוספת SDS), מתקבלים תוצרים רק בשימוש בנוגדני Inv2 (תמונה 17 ב) והם נראים גדולים מגודלם המקורי של החלבון השלם ושבריו (42kDa ו-76kDa בהתאמה). זאת, כנראה, בשל העיכוב שנוצר ביציאת החלבון מן המימד הראשון לשני, בעוד שהסמן נכנס מיד והתקדם בגיל שמהווה את המימד השני ללא עיכוב ביציאה מהגיל של המימד הראשון. נראה שמקום סימון הנוגדנים של האינברטאזות עולה בהתאמה עם צביעת הפעילות בגיל, מכאן שהפעילות היא ככל הנראה של חלבוני Inv2.

### 1.2.3. שינויים בביטוי הגנים ל-Inv1 ו-Inv2 לאורך התפתחות תפוז הטבורי

בדומה לפרי "אור 1", בשלבי התפתחות שונים של פרי תפוז מזן טבורי נאספו החל משחלות, שנלקחו מפרחים סגורים ומפרחים פתוחים, חנטים וציפות מפירות בקטרים עוקבים מ-20 עד 80 מ"מ. מעקב אחרי שינויים בביטוי הגנים ל-Inv1 ו-Inv2 לאורך התפתחות הפרי, נעשה על ידי כימות רמת ה-mRNA תוך סטנדרטיזציה של האות הרדיואקטיבי עם רמת ה-RNA הריבוזומלי הצבוע באתידיום ברומיד, כפי שניתן לראות בתמונה 18.

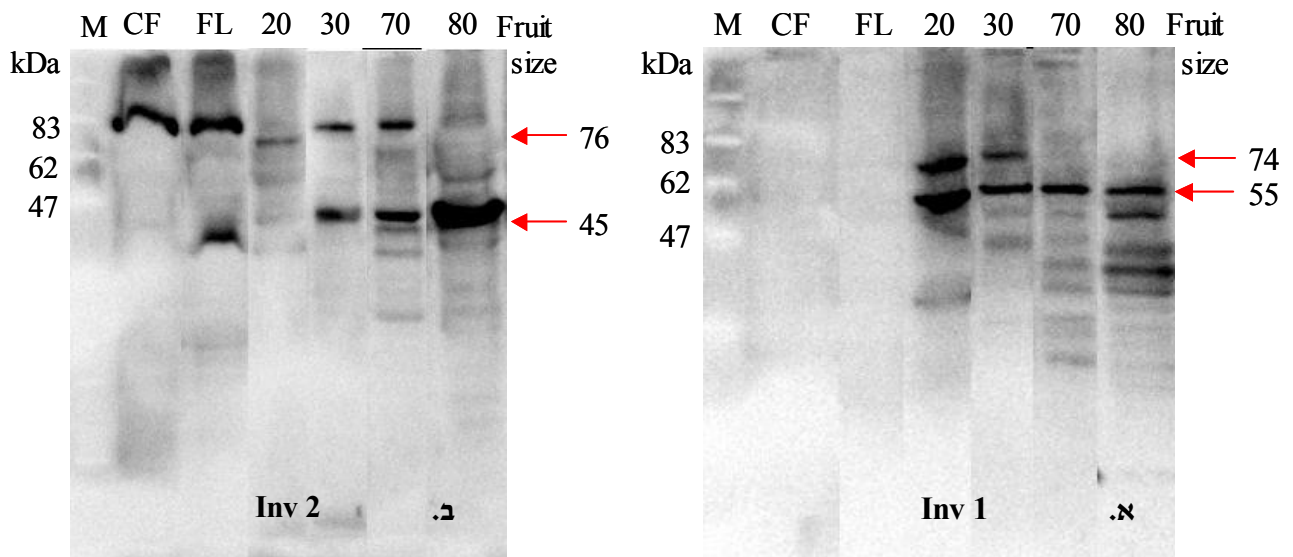


**תמונה 18:** תבנית ביטוי הגן ברמת ה-RNA לאורך התפתחות תפוז טבורי, מימין - Inv1, משמאל - Inv2. א. גרף חישוב הביטוי היחסי בין השלבים השונים לאחר נירמול בין האות הרדיואקטיבי (ב.) לבין כמות ה-RNA הריבוזומלי (ג.)

הגנים ל-Inv1 ו-Inv2 בעלי דפוס ביטוי דומה, כאשר בגודל פרי של 30 מ"מ נראה שיא בביטוי שיוורד לאחר מכן עם התפתחות הפרי עד הבשלת הפרי בגודל 80 מ"מ. באופן מפתיע, שונה דגם הביטוי בתפוז הטבורי לעומת זה של הפרי "אור 1". למרות העובדה ששניהם פירות צוברי סוכרים לקראת ההבשלה, נראה שבתפוז הטבורי רמת ה-mRNA המקודד לאינברטאזות עולה בשלבי התפתחות מוקדמים של הפרי וצונחת עם התקדמות התפתחותו עד ההבשלה. תהליך שנראה בדיוק הפוך לזה שמתרחש בפרי "אור 1", שבו דווקא בחנטים נראה שיא ברמת ה-mRNA, שיוורדת עד לרמה נמוכה ביותר במהלך התפתחות הפרי, אבל אז, בניגוד לתפוז הטבורי, שבה ועולה רמת ה-mRNA לקראת הבשלת הפרי.

### 2.2.3. שינויים ברמת החלבונים Inv1 ו-Inv2 לאורך התפתחות תפוז הטבורי

בשלב התפתחות תואמים של תפוז מזן טבורי נאספו שחלות, שנלקחו מפרחים סגורים ומפרחים פתוחים, חנטים וציפה מתוך פירות בגדלי קוטר עולים בהדרגה מ-20 מ"מ עד 80 מ"מ. מעקב אחרי שינויים בביטוי החלבונים Inv1 ו-Inv2 לאורך התפתחות הפרי, כפי שניתן לראות בתמונה 17.

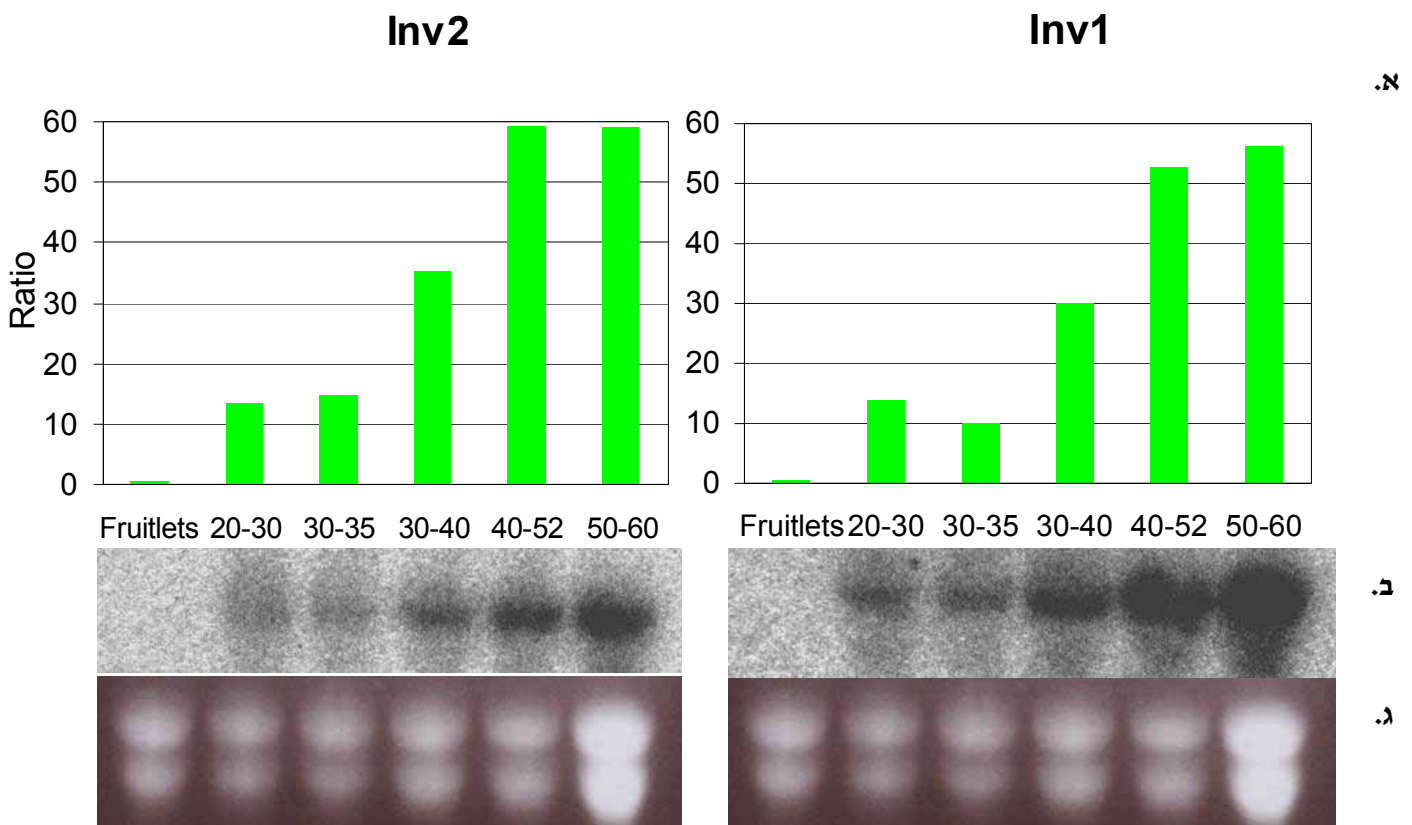


**תמונה 19:** כמות החלבונים לאורך התפתחות תפוז טבורי. א. מימין - Inv1, ניתן לראות התפלגות בגודל התוצרים החלבוניים שנותנים פסים בגדלים של 74kDa ו-55kDa. ב. משמאל - Inv2 תוצרים בגדלים של 76kDa ו-45kDa. M – סמן, CF – שחלות מפרחים סגורים, FL – חנטים.

בשני המקרים מתקבלים שני תוצרי חלבון עיקריים, אחד בגודל הצפוי מתוצר שבת באורך מלא של כ-74-76kDa בהתאמה, ותוצרי פירוק משניים עיקריים קטנים יותר. הנוגדנים כנגד Inv1 מזהים חלבון בגודל 74kDa ותוצר שני עיקרי ב-55kDa. ב-Inv2 מתקבל חלבון בגודל 76kDa ותוצר שני עיקרי בגודל 45kDa. החלבונים Inv1 ו-Inv2 מראים דגם ביטוי שונה, כאשר בשלב השחלות נראה ביטוי של Inv2 בלבד ו-Inv1 אין נוכחות כלל (התוצאות נבדקו ואומתו בנפרד תוך שימוש בחלבונים מהפקות שונות – **תמונה 4**. רמת הסימון הוערכה לפי הסכום של עוצמת התוצר העיקרי יחד עם זו של התוצר המשני, כך שב-Inv1 נראה שיא ירידה ברמת החלבון בשלבי ההתפתחות המוקדמים פרי של 45-40 מ"מ ואחריהם שוב עליה ברמת הביטוי עם הבשלת הפרי בגודל 50-45 מ"מ. ב-Inv2 נראית ירידה ברמת החלבון בגודל פרי של 20-30 מ"מ ואחריהם גם כן עליה עם הבשלת הפרי בגודל 50-45 מ"מ.

### 1.3.3. שינויים בביטוי הגנים ל-Inv1 ו-Inv2 לאורך התפתחות לימטה המתוקה

בשלבי התפתחות שונים של פרי לימטה מתוקה נאספו החל משחלות, שנלקחו מפרחים סגורים ומפרחים פתוחים, דרך חנטים ועד רצף של גדלי קוטר פרי עוקבים מ-20 עד 80 מ"מ. מעקב אחרי שינויים בביטוי הגנים ל-Inv1 ו-Inv2 לאורך התפתחות הפרי, נעשה על ידי כימות רמת ה-mRNA תוך סטנדרטיזציה של האות הרדיואקטיבי עם רמת ה-RNA הריבוזומלי הצבוע באתידיום ברומיד, כפי שניתן לראות בתמונה 20.

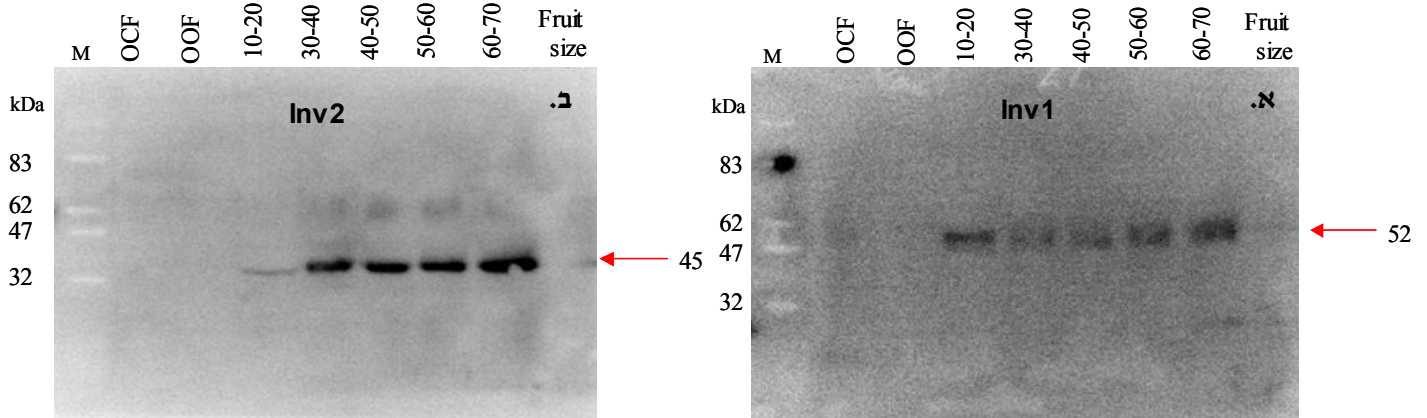


**תמונה 20:** דגם ביטוי הגן ברמת ה-RNA לאורך התפתחות לימטה מתוקה, מימין - Inv1, משמאל - Inv2. א. גרף חישוב הביטוי היחסי בין השלבים השונים לאחר נירמול בין האות הרדיואקטיבי ב. לבין כמות ה-RNA הריבוזומלי (ג). fruitlets - חנטים.

הגנים ל-Inv1 ו-Inv2 בעלי תבנית ביטוי דומה, כאשר בחנטים אין ביטוי כלל (התוצאות נבדקו ואומתו בנפרד שוב - לא מוצג), לאחר מכן עם התפתחות הפרי עולה הביטוי בהדרגתיות ומגיע לשיא עם הבשלת הפרי בגודל 50-60 מ"מ.

### 2.3.3. שינויים ברמת החלבונים Inv1 ו-Inv2 לאורך התפתחות הלימטה המתוקה

בשלב התפתחות תואמים של לימטה מתוקה נאספו שחלות, שנלקחו מפרחים סגורים ומפרחים פתוחים, חנטיים וציפה מתוך פירות בגדלי קוטר עולים בהדרגה מ-20 מ"מ עד 80 מ"מ. מעקב אחרי שינויים בביטוי החלבונים Inv1 ו-Inv2 לאורך התפתחות הפרי, באמצעות הכלאת נוגדנים על גבי הממברנה, בתמונה 21.



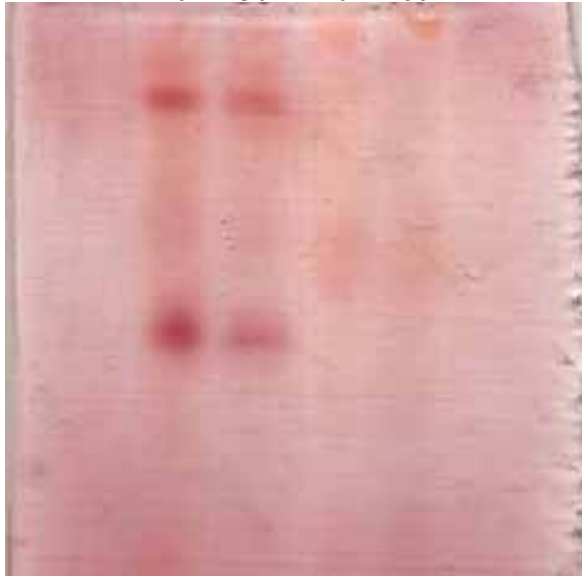
**תמונה 21:** ביטוי החלבונים לאורך התפתחות פרי "אור 1". **א.** מימין - Inv1, ניתן תוצרים בגודל של 52kDa. **ב.** משמאל - Inv2 תוצרים בגודל של 45kDa. M - סמן, OCF - שחלות מפרחים סגורים, OOF - שחלות מפרחים פתוחים.

הנוגדנים כנגד Inv1 ו-Inv2 מזהים חלבונים שדגם ביטויים דומה מאוד. הנוגדנים כנגד Inv1 מזהים חלבון בגודל 52kDa וכנגד Inv2 מזהים חלבון בגודל 45kDa, יש להניח שאלה הם תוצרי פירוק של החלבון השלם, בעוד התוצר השלם, הצפוי מהשבט באורך המלא (מוערך מכ-680 חומצות אמינו) בגודל של כ-76kDa, אינו נראה כלל, בניגוד לפירות מזנים אחרים. רמת ביטוי החלבון חושבה על פי עוצמת התוצר, נראה כי בשחלות אין ביטוי כלל (התוצאות נבדקו ואומתו בנפרד שוב - לא מוצג), לאחר מכן עם התפתחות הפרי עולה רמת החלבון בהדרגתיות ומגיעה לשיא עם הבשלת הפרי בגודל 60-70 מ"מ, שינויים אלו בכמות החלבון תואמים את דוגמת הביטוי ברמת ה-mRNA באופן מלא.

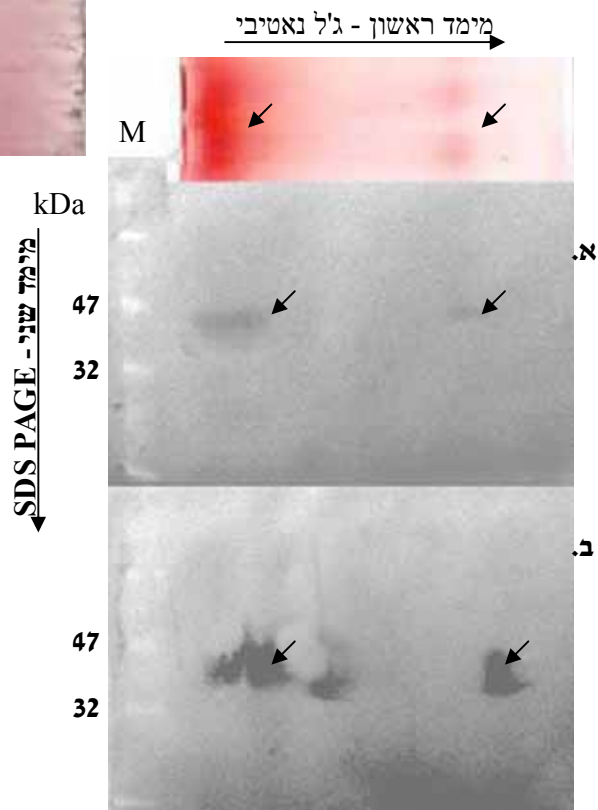
### 3.3.3. פעילות אנזימתית בציפת פרי הלימטה בשלבים התפתחותיים שונים

הצביעה של פעילות אנזימים נבדקה במיצויים מציפות פרי בשלבים התפתחותיים עוקבים (מקוטר של 10-20 מ"מ עד 50-60 מ"מ). התקבלו תוצרי פעילות אינברטאז בשני גבהים בג'ל. נראית צביעה ברורה בשלבי ההתפתחות הצעירים (בפרי בקוטר חיצוני של עד 30 מ"מ) בלבד, תמונה 22.

גודל (מ"מ)	10	20	30	50
פרי לימטה	-20	-30	-40	-60



תמונה 22: צביעת פעילות החלבונים לאורך התפתחות פרי הלימטה, בעזרת TTC. בכל טור הוטענו 100µg חלבון של מיצוי מציפת פירות בקוטר חיצוני עולה החל מ-10 מ"מ ועד 60 מ"מ, משמאל לימין



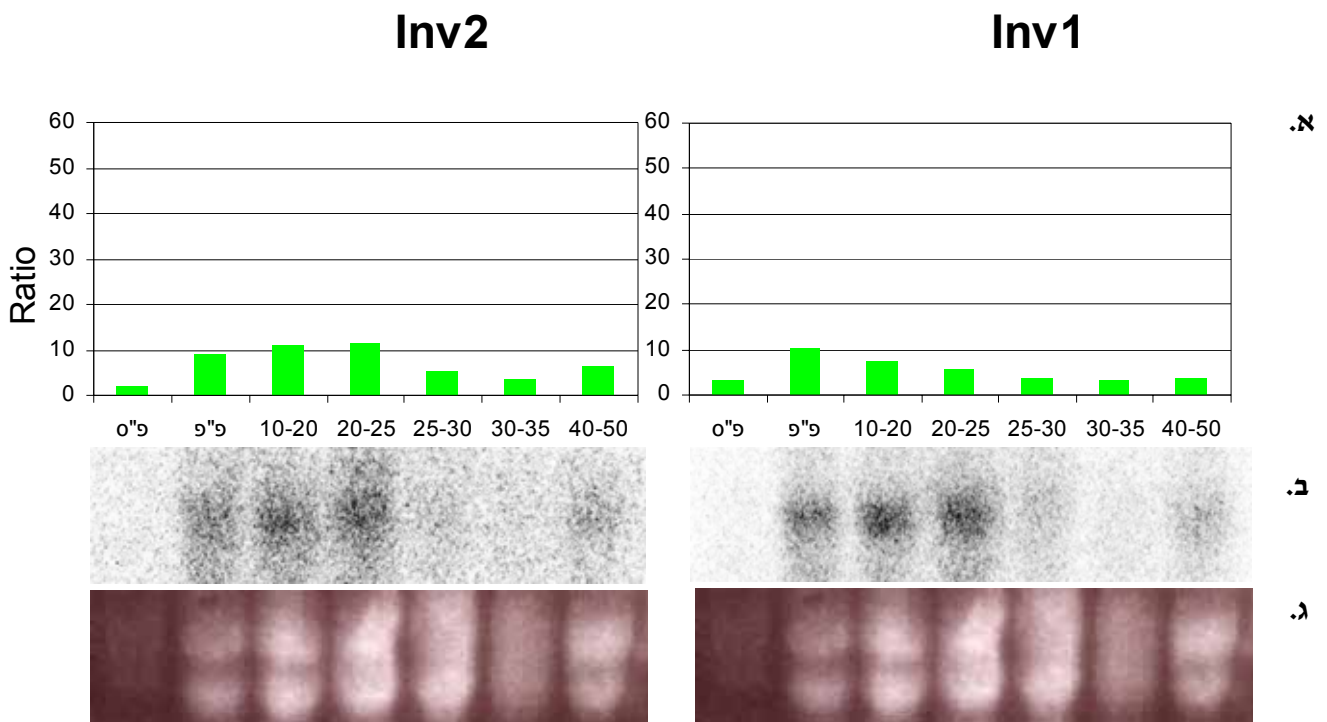
תמונה 23: בדיקת התאמה בין צביעת הפעילות של פרי בקוטר 20-30 מ"מ שהוטען פעמיים בג'ל נאטיבי. כל טור הורץ במקביל פעם שניה בג'ל SDS במצב מאוזן, להפרדה במימד שני, שהוספג למברנה ועבר הכלאה עם נוגדני Inv1 (א) ו-Inv2 (ב), נתקבלו תוצרים המקבילים לגובה הצביעה בגודל 45kDa בתגובה לנוגדני Inv1 ובגודל 42kDa בתגובה לנוגדני Inv2, המראה כי הצביעה ספציפית למיקום עליו מצביעים נוגדני Inv1 ו-Inv2 בתספיג.

בפירות הצעירים של הלימטה (קוטר פרי של 10-20 וכן 20-30 מ"מ) נמצאה פעילות גבוהה של אינברטאז חומצי. הפעילות ירדה עם התפתחות הפרי ואינה נראית לעין בשלבים שלקראת הבשלה (קוטר 30-40 ועד 50-60 מ"מ). בבדיקות השוואת צביעת הפעילות לעומת סימון עם נוגדנים נראית

התאמה גבוהה המאשרת את ספציפיות הצביעה לנוכחות האינברטאזות במקום זה על הגיל. כאשר מורצים החלבונים במימד שני בתוך ג'ל דנאטורטיבי (בתוספת SDS) מתקבלים תוצרים בשימוש בנוגדני Inv1 וגם Inv2 (תמונה 23) והם נראים מעט קטנים מגודלם המקורי של החלבונים (52kDa ו-45kDa בהתאמה). זאת, כנראה, בשל אי התאום שנוצר ביציאת החלבון מן המימד הראשון לשני. בהבדל מבדיקות השוואת צביעת הפעילות לסימון עם נוגדנים שנעשו בפרי "אור 1", נראה סימון חלש גם בשימוש בנוגדני Inv1, שאינו מופיע בפרי "אור 1". מכאן שהפעילות בג'ל, שנצפתה בלימטה, היא ככל הנראה של חלבוני Inv1 ו-Inv2 גם יחד. יתכן שגורם כלשהו מונע מחלבונים, המזוהים על ידי נוגדנים כנגד Inv1, להיכנס ולהתקדם בגיל הנאטיבי. כנראה שהשפעת גורם זה קטנה יותר בלימטה מאשר בפרי "אור 1".

### 1.4.3. שינויים בביטוי הגנים ל-Inv1 ו-Inv2 לאורך התפתחות הלימון החמוץ

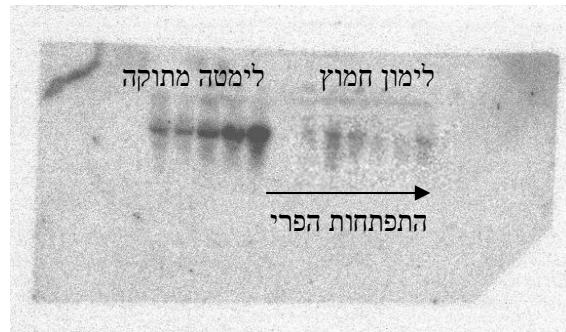
בשלבי התפתחות שונים של פרי לימון חמוץ נאספו החל משחלות, שנלקחו מפרחים סגורים ומפרחים פתוחים ועד רצף של גדלי קוטר פרי עוקבים של 10-50 מ"מ. מעקב אחרי שינויים בביטוי הגנים Inv1 ו-Inv2 לאורך התפתחות הפרי, נעשה על ידי כימות רמת ה-mRNA תוך סטנדרטיזציה של האות הרדיואקטיבי עם רמת ה-RNA הריבוזומלי הצבוע באתידיום ברומיד - תמונה 24.



**תמונה 24:** תבנית ביטוי הגן ברמת ה-RNA לאורך התפתחות פרי הלימון, מימין - Inv1, משמאל - Inv2. (א.) גרף חישוב הביטוי היחסי בין השלבים השונים לאחר נירמול בין האות הרדיואקטיבי (ב.) לבין כמות ה-RNA הריבוזומלי (ג.) פ"ס - שחלות מפרחים סגורים, פ"פ - שחלות מפרחים פתוחים.

הגנים *Inv1* ו-*Inv2* בעלי דגם ביטוי דומה. כאשר בשלבי ההתפתחות הראשוניים – שחלות מפרחים פתוחים ועד גודל של 20 מ"מ, נראה שיא ברמת mRNA, שיורדת לאורך התפתחות הפרי עד רמה נמוכה ביותר בגודל של 30-35 מ"מ ואז שוב עולה מעט עם הבשלת הפרי בגודל של 40-50 מ"מ. דגם הביטוי דומה לזה שבפרי ה"אור 1", כך שבחנטים נראה שיא בכמות ה-mRNA שיורדת עד לרמה נמוכה ביותר במהלך התפתחות הפרי ואז, בניגוד לתפוז הטבורי, שבה ועולה לקראת הבשלת הפרי. לעומת זאת, לאורך כל שלבי התפתחות הלימון, רמת ה-mRNA של שני הגנים חלשה באופן יחסי לכל הפירות שנבדקו עד כה. לדוגמא, ה-RNA מלימון, אשר הופרד בגיל יחד עם דוגמאות מלימטה והוגב עם גלאי כנגד *Inv1* (תמונה 25). רמת ה-mRNA של האינברטאז נמוכה באופן משמעותי בלימון, המוצג מצד ימין בדוגמא, ביחס ללימטה, המוצגת בצד שמאל, לאורך כל שלבי התפתחות הפרי.

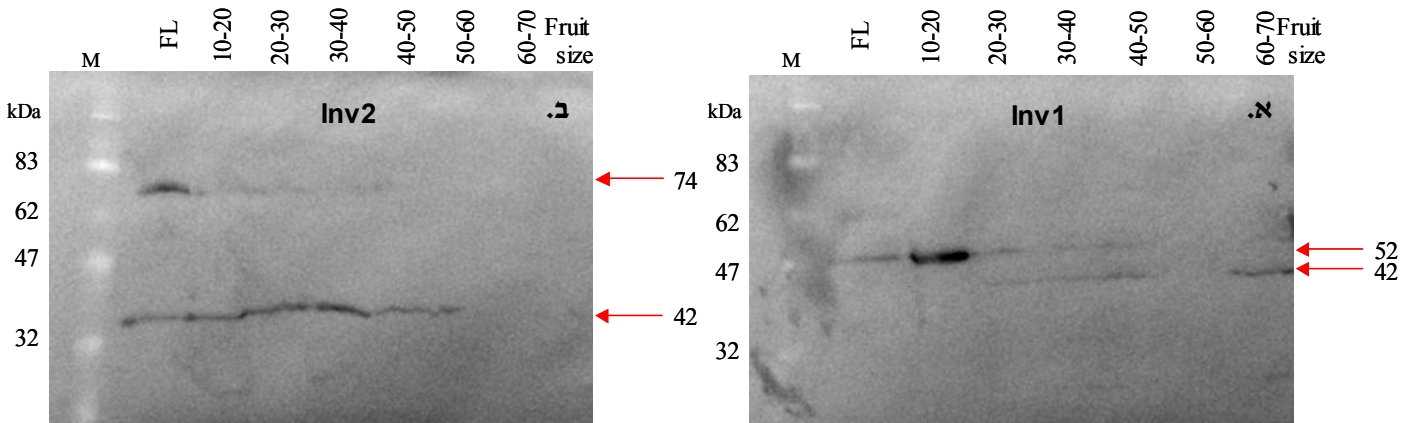
**תמונה 25:** יחס עוצמת ביטוי הגן לאינברטאז חומצי – *Inv1*, ברמת RNA על גבי ממברנה, לאורך התפתחות הפרי בין לימון חמוץ – מימין לבין לימטה מתוקה – משמאל.



### 2.4.3. שינויים ברמת החלבונים *Inv1* ו-*Inv2* לאורך התפתחות הלימון החמוץ

בשלבי התפתחות תואמים של פרי הלימון נאספו שחלות, שנלקחו מפרחים סגורים ומפרחים פתוחים, חנטים וציפה מתוך פירות בגדלי קוטר עולים בהדרגה מ-10 מ"מ עד 70 מ"מ. מעקב אחרי שינויים

בביטוי החלבונים *Inv1* ו-*Inv2* לאורך התפתחות, כפי שניתן לראות בתמונה 26.



**תמונה 26:** ביטוי החלבונים לאורך התפתחות פרי לימון. א. מימין – *Inv1*, ניתן לראות התפלגות בגודל התוצרים החלבוניים שנותנים פסים בגדלים של 52kDa ו-42kDa. ב. משמאל – *Inv2* תוצרים בגדלים של 74kDa ו-42kDa. M – סמן, FL – חנטים.



הנוגדנים כנגד שני תוצרי השבטים של Inv1 ו-Inv2 מזהים חלבונים שדגם ביטויים דומה לאורך התפתחות הפרי. הנוגדנים כנגד Inv1 מזהים תוצרים בגדלים של 52kDa ו-42kDa, בעוד התוצר השלם, הצפוי מהשבט באורך המלא (מוערך מכ-680 חומצות אמינו) בגודל צפוי של כ-76kDa, אינו נראה כלל. הנוגדנים כנגד Inv2 מזהים תוצרים בגדלים של 74kDa ו-42kDa. רמת הסימון הוערכה לפי סכום של עוצמת התוצרים. בשלבי ההתפתחות המוקדמים - חנטים ועד גודל פרי של 10-20 מ"מ נראה שיא ברמת החלבון שיורדת לאורך התפתחות הפרי עד רמה נמוכה ביותר בגודל של 50-60 מ"מ ואז שוב מטפסת מעט עם הבשלת הפרי בגודל 60-70 מ"מ. שינויים אלו בכמות החלבון תואמים את דוגמת הביטוי ברמת ה-mRNA באופן כמעט מלא.

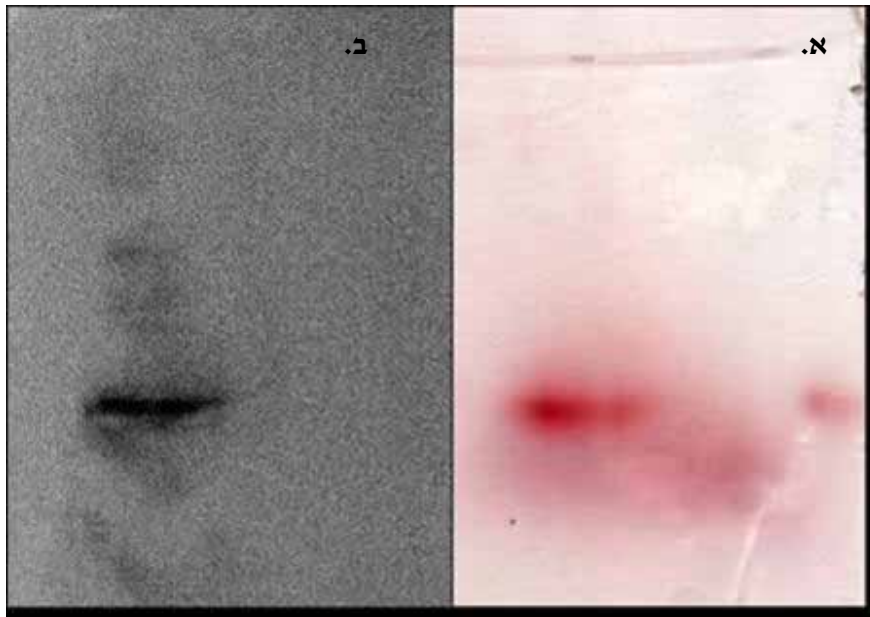
### 3.4.3. פעילות אנזימתית בציפת פרי הלימון בשלבים התפתחותיים שונים

הצביעות נערכו באמצעות ריאגנט 5,3,2 טרי-פניל טטרה-זוליום כלוריד (TTC), פעילות האנזימים נמדדה במיצויים מציפות פרי הלימון בשלבים התפתחותיים עוקבים (מקוטר של 10-20 מ"מ עד קוטר 60-70 מ"מ). ההזגרה נעשתה ע"פ המתואר בשיטות וחומרים. התקבלה צביעה ברורה בשלבי ההתפתחות הצעירים (בפרי בקוטר חיצוני של עד 30 מ"מ) וכן צביעה חלשה יותר לקראת הבשלת הפרי (60-70 מ"מ), **תמונה 27**.

גודל (מ"מ)	10	20	30	40	60
פרי לימון	-20	-30	-40	-50	-70



**תמונה 27:** צביעת פעילות החלבונים לאורך התפתחות פרי הלימון, בעזרת TTC. בכל טור הוטענו 100µg חלבון של מיצוי מציפת פירות בקוטר חיצוני עולה החל מ-10 מ"מ ועד 70 מ"מ, משמאל לימין.



**תמונה 28:** בדיקת התאמה בין צביעת הפעילות (א) לתספיג מצד שמאל (ב), המראה כי הצביעה ספציפית למיקום עליו מצביעים נוגדני Inv2 בתספיג.

בפירות הצעירים של הלימון (קוטר פרי של 10-20 וכן 20-30 מ"מ) נמצאה פעילות גבוהה של אינברטאז חומצי. הפעילות ירדה עם התפתחות הפרי ואינה נראית לעין בשלבים שהפרי בקוטר 30-40 ו-40-50 מ"מ. לקראת הבשלת הפרי (קוטר 60-70 מ"מ) ישנה עליה בפעילות האנזים ונראית צביעה חלשה. בבדיקות השוואת צביעת הפעילות לעומת סימון עם נוגדנים נראית התאמה גבוהה המאשרת את ספציפיות הצביעה לנוכחות האינברטאז Inv2 במקום זה על הגיל. הדבר אושש תוך שימוש בטכניקה פשוטה, השונה משיטת שני המימדים שננקטה בבדיקות הפעילות בזנים האחרים: חלבונים מכל שלבי התפתחות הפרי, בדומה לצביעת הפעילות הראשונה (תמונה 27), הורצו במקביל בשני גילים נאטיביים. האחד עבר צביעת פעילות, בעוד השני עבר תספיג לממברנה עליה התבצעה הכלאה עם נוגדני האינברטאזות (תמונה 28 ב). למרות שנעשתה גם הכלאה עם נוגדני Inv1 (תוצאות לא מוצגות), אך ורק נוגדני Inv2 מראים תוצר.

## -דיון-

### מטבוליזם של סוכרים בפירות הדר

בעבודה זו נדגמו פירות הדר מזנים שונים, אותם מאפיין דגם שונה של צבירת סוכרים. זאת במטרה לנסות ולעקוב אחרי תפקידו של האינברטאז החומצי בקביעת המטבוליזם השונה של הסוכרים בפירות ההדר הנ"ל. תפוז טבורי ואור-1, אשר נמנים עם התפוזים והמנדרינות (*Citrus Sinensis & reticulata*), שנחשבים כאוגרי סוכרוז המהווה בין 50%-60% מכלל הסוכרים בפרי בוגר. לעומתם לימטה ולימון (*Citrus Limettioides & Limon*), זני הדרים אשר עם הבשלת הפרי אוגרים הקסוזות עם רמה נמוכה ביותר של סוכרוז. בלימטה המתוקה מגיע אחוז הסוכרוז לכ-8% בלבד מכלל הסוכרים ובלימון החמוץ לכ-16% בפרי בשל (Sinclair 1984, Tzur 1994).

עדויות אנטומיות מראות כי לתאי שקיקי המיץ בהדרים אין קשר ישיר עם השיפה. העברת הסוכרוז הפוסט-פלואמית לתוך שקיק המיץ ובין תאי שקיק המיץ עצמו נעשית דרך המסלול הסימפלסטי ו/או האפופלסטי (Koch et al. 1990).

בגלל הריחוק ממערכת ההובלה, של תאי שקיקי המיץ בפרי ההדר, מסתמנת חשיבות גבוהה לאנזימים האינברטאז החומצי. לאור חשיבותו במטבוליזם של סוכרוז והצורך להבנת הבקרה על פעילותו ואיתור מיקומו התוך תאי, בודדו שבטים של שני איזו-אנזימים (Inv1 ו-Inv2) לאינברטאז חומצי מספריית שקיקי מיץ של תפוז טבורי. שבטים אלה מראים הומולוגיה לאינברטאז מסיס ולכן נחשדו כאינברטאז של החללית. במספר צמחים נמצא כי לאינברטאז מספר איזוזימים. בתרבית תאים של סלק סוכר נמצאו מספר איזו-אנזימים בפרקציה המסיסה והקשורה. איזו-אנזימים אלה נבדלו בזיקתם לסוכרוז (Masuda et al. 1988).

ניסיונות למצוא שבטים המראים הומולוגיה לאינברטאז הקשור לדופן, נכשלו ולא נמצאו בסיפרייה שהופקה מציפת הפרי. כמו כן, לא נמצאו שבטים המראים הומולוגיה לאינברטאז דופן, בסיפריית משקיקי מיץ, במאגר המרכזי של רצפי EST's מהדרים (HarvEST). בהעדר שבטים, שבודדו מרקמת ציפת פרי ההדר, אשר מראים הומולוגיה לאינברטאז קשור דופן, נערכו ניסיונות לברר את חשיבות שני השבטים – Inv1 ו-Inv2 להולכה ולאגירה של סוכרוז בפירות ההדר.

### 1) המיקום התוך תאי של אינברטאז בפירות הדר

למיקום התוך תאי של אינברטאז חומצי חשיבות רבה להבנת מנגנון העברתו של סוכרוז והאגירה בתאים של שקיקי המיץ, המרוחקים ממערכת ההובלה. על מנת שיתאפשר מנגנון פרוק וסינתזה מחדש של סוכרוז במהלך צבירתו במבלע של תאי פרי ההדר (ראה תמונה 30), יש הכרח בהמצאות אינברטאז קשור לדופן התא *in situ* וכן איבוד פעילות אינברטאז בחלליות פרי בוגר אוגר סוכרוז. לאור אי ההצלחה למצוא שבטים בעלי הומולוגיה לאינברטאז דופן, נבחנו שני האיזוזימים של האינברטאז ששובטו - Inv1 ו-Inv2, כדי לבדוק היתכנות מיקומם גם בדופן תאי שקיקי המיץ.

כנגד תוצרי שבטים אלה הוכנו נוגדנים באוניברסיטת דיוויס והתקבלו באדיבותו של פרופ' בלומולד. בדיקת נוגדנים אלה, הראתה כי הם מגיבים באופן ספציפי עם אינברטאז ממיצוי חלבונים כללי מפירות הדר (תמונות 17, 23 ו-28). נוגדנים אלה שמשו לאיתור המיקום התוך תאי של אנזימי האינברטאז באמצעות Immunolocalization וכן ללימוד הבקרה על פעילות אינברטאז ברמת התרגום בזנים השונים של פירות הדר (תפוז טבורי, אור-1, לימטה מתוקה ולימון חמוץ).

על ידי מיצוי בשיטות שונות (ראה שיטות וחומרים) נראית חלוקת האנזים בין הפרקציה המסיסה לקשורה וניתן להוכיח הימצאות אינברטאז הקשור לדופן התא *in vivo*. בשיטה הראשונה, מוצה אינברטאז קשור מרקמת פריקרב של פירות הדר מרוסקת, על ידי טלטולה בבופר עם 1M NaCl, זאת לאחר מיצוי כל האינברטאז המסיס מהחלליות, שתי הפרקציות הורצו בגיל SDS והגיבו עם נוגדנים ספציפיים כנגד אינברטאז Inv1 ו-Inv2. נמצא כי בתפוז הטבורי ובאור-1 מצויים שני אנזימי האינברטאז הן באפופלסט והן בחללית (תמונה 3 ו-4).

כדי לתת משנה תוקף לתוצאות שהתקבלו ולמנוע ארטיפקט העלול לנבוע משיטת המיצוי (ראה מבוא סעיף 21), ננקטה שיטה שונה על מנת להוכיח את קיומו של אינברטאז קשור *in situ* לדפנות תאים. השיטה השנייה, הינה Immunolocalization של האינברטאז בחתכים למיקרוסקופ אלקטרוני חודר, תוך שימוש בנוגדן כנגד אינברטאז חומצי וזיהוי באמצעות Immunogold labeling. תוצאות המיקום של האינברטאז בתפוז טבורי בפרי צעיר ובוגר תאמו את חלוקת האינברטאז בין הפרקציה המסיסה לקשורה שהתקבלה על ידי הפרדה בשיטת הריסוק והמיצוי. אינברטאז קשור לדופן התא נראה בכל החתכים שהוגבו עם נוגדן כנגד האינברטאז. בחתכים של פרי תפוז טבורי צעיר (בגודל קוטר פרי של 40 מ"מ) הופיע סימון של Inv1 ו-Inv2 גם בחללית וגם בדופן התא, לעומת פרי תפוז טבורי בוגר (בגודל קוטר פרי של 65 מ"מ) שבו ניתן לראות סימון בדופן התא בעוד שבחלליות נראה סימון דל (תמונה 8 לעומת 9 ו-10). בפרי בוגר של תפוז טבורי גודל התאים הוא עצום וצורתם אינה רגולרית (תמונה 5). על כן היה קושי רב למקד את התמונה למדור מסוים ובכלל, על כן מובאות תמונות בהן נעשה שימוש בנוגדנים ספציפיים (שהתקבלו באדיבותו של ד"ר משה ראובני) כנגד תת יחידה חיצונית E של חלבון ה-vATPase, הידוע כמשולב בממברנת החללית בתא. סימון הטונופלסט סייע להבדיל בין האיברונים ולהתמקם טוב יותר במרחב התאי (תמונה 7).

תוצאות מידור האינברטאז, המבוססות על אימונו-לוקאליזציה בחתכים למיקרוסקופ אלקטרוני חודר, מראות קיומו *in situ* של אינברטאז קשור לדופן, באפופלסט, בעיקר בפרי שלפני הבשלה. דווקא בתאי פרי בוגר קיים הקושי למקד את התמונה למדור מסוים ובכלל, כדי לאשש תוצאות אלה ניבדק המיקום התוך תאי של חלבוני האינברטאז, בחתכים גם תוך שימוש במיקרוסקופ קונפוקאלי. המיקום נקבע בפירות תפוז טבורי לקראת הבשלה (70 מ"מ קוטר פרי חיצוני) לגבי שני האיזואנזימים - Inv1 ו-Inv2. גם במקרה זה ניתן לראות, בחתכים מפרי תפוז טבורי בוגר, סימון של Inv1 ו-Inv2 בעיקר בדופן התא (תמונה 12 ו-13).

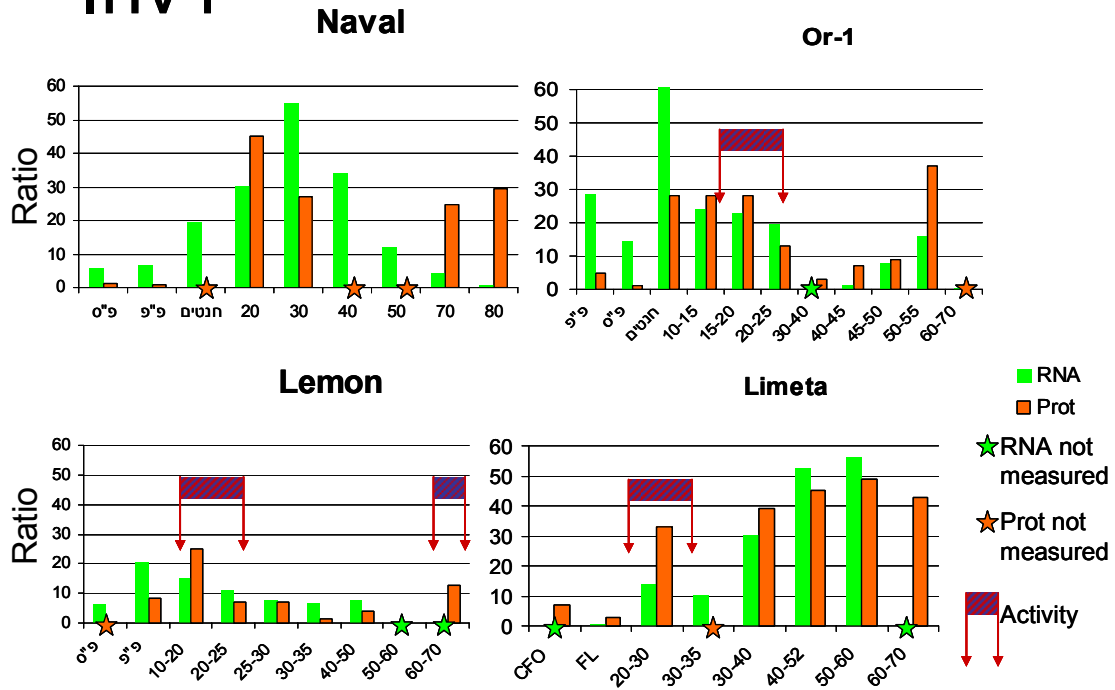
בדיקה מיקרוסקופית של רקמת שקיקי מיץ העדינה היתה קשה ביותר, זאת בשל גודלם הרב של התאים, בהם תופסת החללית את רוב הנפח. התאים מורכבים מאחוז גבוהה ביותר של מוהל, המקשה על הקיבוע והחיתוך. בשל כך לא ניתן להעריך, חד משמעית, לגבי המיקום מתוך תמונת המיקרוסקופ. אך ניתן להסיק ממנה באופן איכותי ובאמינות, זאת מאחר שהחתכים שבהם בוצעה האימונו-לוקליזציה נעשו מאיזור פנימי של הרקמה שעברה קיבוע, באיזור בו אותרו תאים שלמים. תוצאות מידור האינברטאז החומצי בשיטת האימונו-לוקאליזציה מאמתות את המצאותו בפרקציה המסיסה והקשורה, כפי שהופרדו בשיטת ה"ריסוק" והמיצוי. תוצאות אלה מאשרות כי Inv1 ו-Inv2 הקשורים לדפנות התאים אינם ארטיפקט, אלא אכן קיימים *in vivo* בפירות הדר ומייצגות את המצב הקיים בפרי לאורך כל שלבי התפתחותו.

## 2) בקרה ברמת השעתוק (mRNA) של האינברטאז בפרי

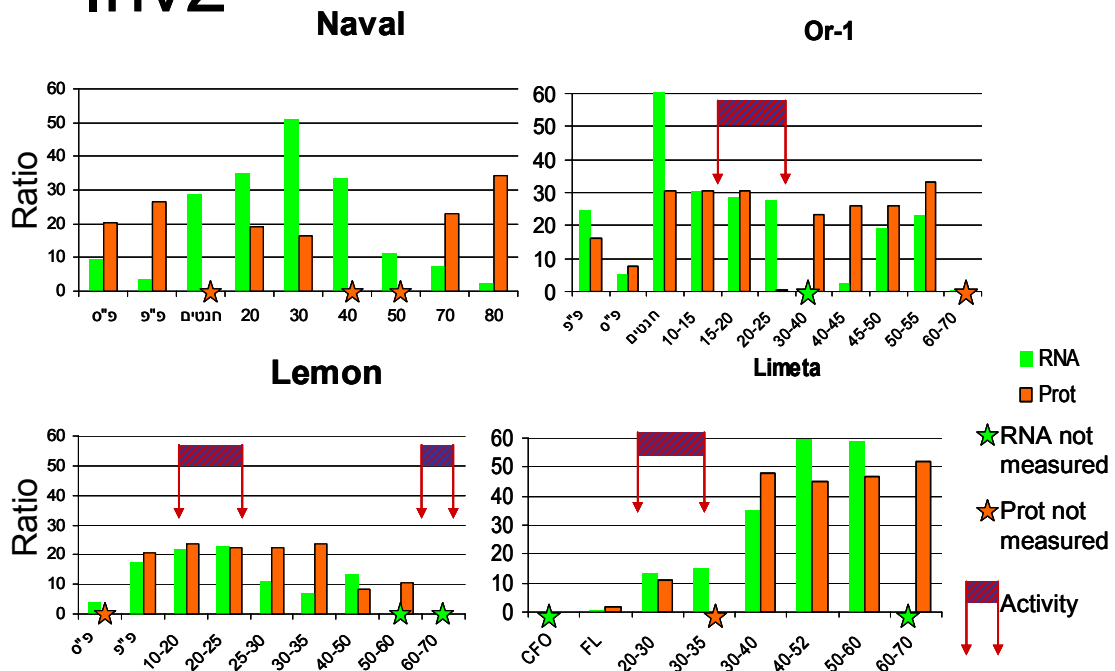
רמת ה-mRNA של האינברטאז נמדדה לאורך התפתחות הפרי של הזנים השונים. בכל הזנים שנבדקו נמצא שדגם הביטוי ברמת ה-RNA זהה כמעט לחלוטין בין Inv1 ו-Inv2. בזני האור-1 והתפוז הטבורי, האוגרים סוכרוז, נמצא mRNA של שני שבטי האינברטאז ברמה גבוהה בפרי צעיר, בעוד שבפרי בוגר נראית ירידה גדולה בכמות ה-RNA של שני האיזוזימים (תמונה 14 ו-18). לעומת זאת בלימטה המתוקה, האוגרת הקסוזות, נמצא כי בפרי הצעיר היתה רמה נמוכה ובפרי בוגר נמצאה עליה גדולה ביותר בכמות ה-RNA של שני האיזו-אנזימים של האינברטאז (תמונה 20). בלימון חמוץ נראה ביטוי דומה לזה שבאור-1, כך שבחנטים נראה שיא בכמות ה-mRNA שיורד עד לרמה נמוכה ביותר במהלך התפתחות הפרי ואז שב ועולה מעט לקראת הבשלת הפרי (תמונה 24).

דגם הביטוי לאורך התפתחות הפרי, ברמת תוצרי השעתוק, מראה שונות גבוהה בין זני ההדרים שנבדקו. כדי ללמוד האם המשך ביטוי האינברטאז בתא מושפע מרמת ה-mRNA, היא הושוותה לכמות החלבונים המשוקללת של האינברטאז המסיס שנמצאה ב-Immunoblot. השקלול כלל כימות של כל התוצרים שזוהו בכל שלב, לרבות תוצרי הפירוק (תמונה 29). בהשוואה זו ניתן לראות כי בהתאם לכמות ה-mRNA שבפרי אור-1, לימטה ולימון, עוקבת רמת ביטוי חלבוני Inv1 ו-Inv2 המשוקללים. כאשר יורדת כמות תוצר השעתוק לאורך התפתחות הפרי, באור-1 ובלימון, הדבר מתבטא בפחות חלבון בפועל ולהיפך בלימטה. יוצא מן הכלל הוא התפוז הטבורי, ניתן לראות בגרף אשר בתמונה 29 כי ב-Inv1 ישנה עליה בכמות החלבון עם התבגרות הפרי, בעוד רמת ה-RNA דווקא יורדת. ואילו ב-Inv2 דווקא בשלבים המוקדמים כאשר רמת ה-RNA בשיאה, נראית ירידה בכמות החלבון המשוקלל. על אף ההשוואה החסרה בין ה-RNA לחלבון, מסתמנת אי התאמה בולטת, שנתמכת בתוצאות השוואה מקיפה יותר, שנעשתה במעבדתו של פרופ' בלומולד ומציגה חוסר התאמה דומה (תוצאות אינן מוצגות). מן הסכימה המוצגת ניתן להסיק, מבחינה איכותית, כי כמות חלבוני האינברטאז מבוקרת ברמת השעתוק של שני השבטים, בזנים אור-1, לימון ולימטה. לעומת זאת, כנראה, שבתפוז הטבורי הבקרה אינה נעשית ברמה זו אלא באופן פוסט – שעתוקי, כפי שהציעו Roitsch et al. (2004).

# Inv1



# Inv2



**תמונה 29 :** השוואה איכותית בין רמות ה-mRNA של שני האיזומרים לכמות החלבונים המשוקלת, של האינברטאז המסיס, שנמצאה ב-immunoblot (השקלול כלל כימות של כל התוצרים שזוהו בכל שלב, לרבות תוצרי הפירוק), לאורך שלבי התפתחות של תפוז טבורי, אור-1, לימטה ולימון (מלמעלה בכיוון השעון). למעלה – INV1, למטה – INV2. פ"ס/CFO – שחלות מפרחים סגורים, פ"פ – שחלות מפרחים פתוחים, FL – חנטים.

### 3) חוסר התאמה בין רמת החלבונים ופעילות Inv1 ו-Inv2

משקלם המולקולרי של חלבוני האינברטאז, שזוהו על ידי הנוגדנים, נקבע בגיל פוליאקרילאמיד בנוכחות SDS ונמצא כי הפס העיקרי מופיע ב-74kDa וב-76kDa לגבי Inv1 ו-Inv2 בהתאמה (תמונה 4). בנוסף נמצאו חלבונים אחדים בעלי משקל מולקולרי נמוך יותר (42kDa, 47kDa, 55kDa) ואף קטנים מכך, יש להניח שאלה הם תוצרי פירוק של החלבון השלם. תמיכה להנחה זו נמצאת בהתאמה שנעשתה בין צביעת פעילות האינברטאז בגיל הנאטיבי, לבין תספיג, שבו זוהו תוצרים על ידי הנוגדנים. בתמונה 17 ניתן לראות כי במקום שבו נצפתה הפעילות בגיל הנאטיבי זוהו תוצר יחיד, אשר משקלו המולקולרי קרוב יותר לתוצרים במשקל המולקולרי הגבוה ביותר שזוהו בגיל הדנטורטיבי. לעומת זאת במקום שזוהו תוצרים במשקל המולקולרי הנמוך, לא נראית פעילות בגיל הנאטיבי. איבוד הפעילות נובע, כנראה, מהיותם חלקים שהתפרקו מן החלבון השלם.

זה מכבר בודד חלבון אינברטאז שלם מהדרים, במשקל מולקולרי קרוב לאלו שנמצאו בעבודה זו - kDa 69 (Kato et al. 1978), בניקוי אינברטאז מסיס מעגבניה נמצא כי משקלו המולקולרי היה kDa 75 (Nakagawa et al. 1971) ובעבודה מאוחרת יותר בעגבניה נמצאה מודיפיקציה שלו במשקל מולקולרי kDa 52 (Miron et al. 2002). מפירות אגס יפני במשקל מולקולרי kDa 80 (Hashizume 2003). וממלון בודדו מספר יחידות של אינברטאז מסיס בגדלים של kDa 25, kDa 38, kDa 52, kDa 75 (Lester et al. 2001).

הפעילות בפרי צעיר לא שונה בהרבה בין הזנים השונים. הפעילות הגבוהה של האנזים המסיס שמתקבלת *in vitro*, בכל הזנים, מייצגת ככל הנראה את הפעילות האמיתית בפרי צעיר *in vivo*. בעבודות דומות בהדרים דווח על תוצאות פעילות זהות לממצאים כאן: רמות גבוהות של פעילות אינברטאז מסיס בשלב ההתפתחותי הראשון של פירות ההדר (תמונה 16, 22 ו-27). באשכולית נראית ירידה חדה ברמות פעילות האנזים עם המעבר לשלב התארכות התאים (Lowel 1989). מגמה דומה של ירידה בפעילות האנזים עם התפתחות הפרי נראית בסטצומה (Kubo et al. 2001). עם זאת עליה מחודשת ברמת פעילות האנזים מופיעה במינאולה ובמורקוט בשלב הבשלת הפרי (Tzur et al. 1992), לאחר הירידה האופיינית בפעילות האנזים שבין שני השלבים הראשונים. עליה מחודשת נראית גם בפעילות חלשה של אינברטאז, אשר נתקבלה בפרי בוגר של לימון (תמונה 27).

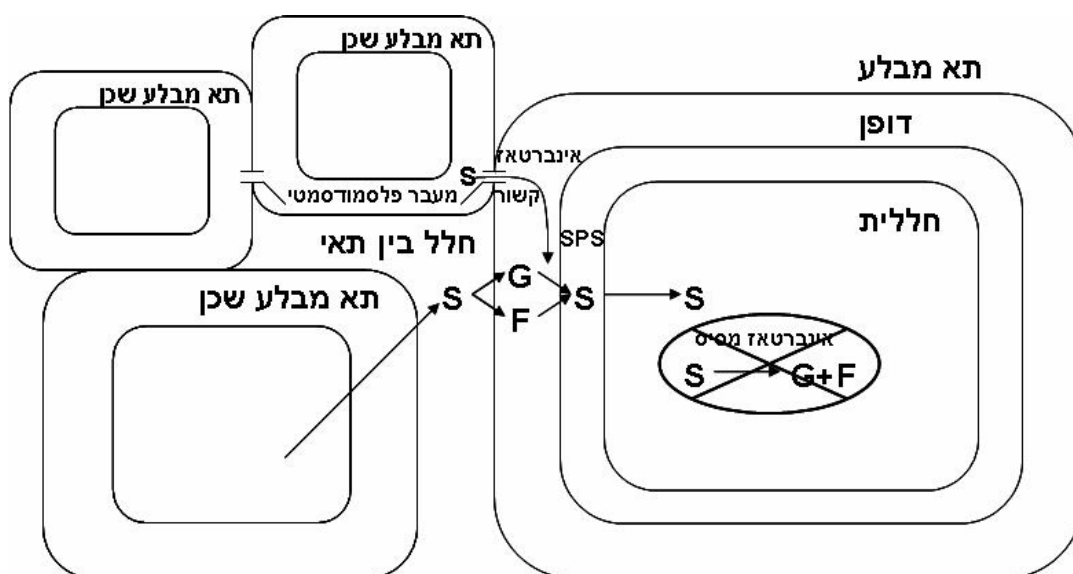
רמת החלבון המשוקללת של אינברטאז מסיס, כפי שנמצאה ב-Immunoblot (תמונה 15, 19 ו-21), אינה תואמת לפעילות האינברטאז המסיס (תמונה 16, 22 ו-27). פעילות חזקה זוהתה בפירות צעירים בלבד וללא קשר לדגם ביטוי ה-mRNA והחלבונים, אשר לעיתים הראו דווקא עליה ברמתם עם התבגרות הפרי, בלימטה למשל. אך נמצא כי עם התבגרות הפרי נעלמים האנזים במשקל המולקולרי של 76kDa ו-74kDa (ל-Inv1 ו-Inv2 בהתאמה) ומופיעים החלבונים במשקל הנמוך יותר, ב-Inv1 בגדלים 55kDa ו-47kDa וב-Inv2 בגודל 42kDa, החשודים כשברים של החלבון השלם וכנראה שמאבדים את פעילותם (תמונה 15, 19 ו-26). על כן נראה כי ההבדלים בפעילות האינברטאז המסיס במהלך ההתפתחות נובעים

משינויים ברמת החלבון של האנוים. עובדה זו מחזקת את האפשרות שאיבוד הפעילות של אינברטאז חומצי מסיס בפירות הדר הוא תהליך התפתחותי המתרחש כתוצאה משינוי בתנאי הסביבה בחללית. ניסיונות להראות פעילות של האינברטאז בפרקציה הקשורה לדופן, שעתה ידוע כי הם נמצאים בה *in situ*, נתקלו בקשיים טכניים. על אף אי ההצלחה לקבל פעילות מן הדופן, כנראה שהם מתפקדים בתהליכי ההולכה והאגירה של הסוכרוז בשלבים שבהם אובדת פעילות האינברטאז בחללית. בעבודות קודמות נמצא כי בהדרים צוברי סוכרוז, במקביל לאגירת הסוכרוז, ישנה ירידה דרמטית בפעילות האינברטאז המסיס. יתכן שתפקידו לשמר את רמת הסוכרוז הגבוהה הנצברת בפרי. בנוסף מתועדת עליה בפעילות סוכרוז סינתאז וסוכרוז פוספאט סינתאז, אשר אחראי עיקרי לסינתזה של סוכרוז, נראה כי גם הם תורמים לאגירת הסוכרוז בכך ששומרים על רמתו הגבוהה הנצברת בפרי (Tzur et al. 1994). בשלב הגדילה, פעילות אינברטאז חומצי מסיס בפרי גבוהה יחסית (Kato et al. 1978). עם התגברות אגירת הסוכרוז בפרי, אובדת פעילות האינברטאז המסיס (Koch 2004). תופעה דומה נמצאה ברקמות אוגרות סוכרוז נוספות כגון מלון (Schaffer et al. 1985, Lingle et al. 1987), פפיו (Schaffer et al. 1989), סלק סוכר (Hatch et al. 1963) ועגבניה (Yelle et al. 1988, Miron et al. 2002). בניגוד לפעילות אינברטאז מסיס אשר אובדת עם תחילת אגירת הסוכרוז, פעילות אינברטאז קשור אינה משתנה במהלך התפתחות פרי ההדר ונותרת זהה גם בשלב אגירת הסוכרוז. יהיה מעניין לבדוק בעתיד, אפשרות של הפסקת פעילות האינברטאז בחללית בעקבות הופעת מעכב ספציפי למדור זה. כפי שנמצא בצמחים אחרים כגון: טבק (Greiner et al. 1998) שבו קיים מעכב ספציפי לאפופלסט ובעגבניה (Husain et al. 2001), בהם נראה שההבדל ברמת הפעילות של האינברטאז, שבין שלבי התפתחות הפרי, נגרם על ידי שינויים בכמות החלבונים המעכבים אשר ביטויים משתנה לאורך ההתפתחות בהתאם לכל איבר בצמח.

#### 4) המנגנון המטבולי להובלה ואגירה של סוכרוז

שילוב של ממצאים קודמים ותוצאות שעלו בעבודה זו מצביעים על קיום מנגנון ביוכימי, שעשוי להסביר את היכולת של התפוז הטבורי ואור-1 לאגור סוכרוז ועל ידי כך לצבור מוצקים מסיסים לריכוז גבוהה. מנגנון זה כולל פרוק וסינתזה מחדש של הסוכרוז במהלך קליטתו לתאים. כבר לפני 35 שנה הוצע המנגנון לגבי קליטת סוכרוז בקנה סוכר, שבו הוכח שקליטת הסוכרוז מעוכבת כאשר פעילות אינברטאז חומצי הקשור לדופן התא מעוכבת על ידי נוגדן כנגדו (Bowen et al. 1972). על פי המנגנון, הסוכרוז יכול לעבור בין תאי המבלע בצורה אפופלסטית (Koch et al. 1990), באפופלסט הוא מפורק להקסוזות על ידי אינברטאז חומצי הקשור לדופן התא. תוצרי הפרוק נקלטים לציטופלסמה, שם הם מסונתזים מחדש לסוכרוז על ידי סוכרוז פוספט סינתז שממוקם בציטופלסמה, והסוכרוז שמתקבל נאגר בחללית בהעדר פעילות אינברטאז חומצי מסיס (תמונה 30).





**תמונה 30 :** תיאור סכמטי של מנגנון הפירוק וסינתזה מחדש של סוכרוז במהלך קליטתו לפרי, כפי שמוצע לגבי זנים אוגרי סוכרוז (תפוז טבורי ואור-1) בשלב בו נאגר הסוכרוז (פרי בוגר). S- סוכרוז, G- גלוקוז, F- פרוקטוז, SPS- סוכרוז פוספט סינתאז.

המסקנות העיקריות, לגבי המערכת המטבולית של אגירת סוכרים, מתבססות על סמך ממצאים אלה: (1) נוכחות אינברטאז חומצי הקשור לדופן התא במהלך התפתחות הפרי מהווה תנאי לקיום המנגנון. פירוק הסוכרוז באופולסט חיוני לשמירת מפל הריכוזים של סוכרוז באתר כניסת הסוכרוז לתא (Lalonde et al. 2003) - נמצאה נוכחות של אינברטאז הקשור לדופן במיצוי מרקמה שרוסקה והופרדה לפרקציה של חלבונים קשורים (תמונה 4). בנוסף הוכח כי תוצרי השבטים של Inv1 ו-Inv2 ממוקמים שם *in situ* (תמונה 9).

(2) עשויה להיות חשיבות לעליה בפעילות ברמה של האנזימים מסנתזי הסוכרוז, על מנת שיאגר סוכרוז - קיימת פעילות גבוהה של סוכרוז סינתאז ובעיקר סוכרוז פוספט סינתאז (SPS) בפרי הדר בוגר, שיכולה לאפשר סינתזה מחדש של הסוכרוז שנקלט (Tzur et al. 1992).

(3) אגירת סוכרוז קשורה באיבוד פעילות אינברטאז חומצי מסיס כתנאי הכרחי - החלבון השלם של האינברטאז המסיס בחללית וכן הפעילות שלהן נעלמים בפרי בוגר. הבקרה על העלמות זו הינה התפתחותית, כפי שנמצא בבדיקות פעילות (תמונה 16), ברמת ה-mRNA (תמונה 18) ב-immunolocalization (תמונה 9 ו-10), כאשר הבקרה היא כנראה על ההתבטאות של הגן לאינברטאז.

תוצאות הניסויים שבחנו את המיקום התוך תאי של אינברטאז חומצי *in situ* והבקרה על פעילות אינברטאז, מצביעות על כך שבפרי בוגר של תפוז טבורי קיימת מערכת ביוכימית המסוגלת לתמוך במנגנון זה. כל אלה עשויים לאפשר לפרי של תפוז טבורי לאגור סוכרוז ועל ידי כך לצבור כמות מוצקים מסיסים גבוהה. נראה כי שילוב של מספר מרכיבים הקיימים בתפוז הטבורי וב-אור-1 וחסרים בלימטה המתוקה ובלימון החמוץ, מאפשרים לתפוז הטבורי ואור-1 לצבור מוצקים מסיסים לריכוז גבוה. אחד הגורמים המשמעותיים, הוא היכולת לאגור סוכרוז במהלך התפתחות הפרי.

### הצעות לבקרה על התבטאות הגנים בזני הדורים שונים

בתפוז הטבורי ובאור-1, נראה יחס הפוך בין רמת צבירת החומצה לביטוי הגנים לאינברטאז. קשר זה, לרמת החומצה בפרי, מתבסס על העובדה כי בפירות ההדר החומצה הנצברת הינה חומצה ציטרית, אשר מהווה תוצר ישיר של מעגל ה-TCA. הפעילות במעגל לייצור החומצות האורגניות נמצא בהמשך לגליקוליזה המוזנת בגלוקוז, שמקורו הבלעדי הוא מפירוק הסוכרוז על ידי האינברטאז בתא. לכן מוצע כאן, לראשונה, כי יתכן שהחומצה הציטרית, בהיותה תוצר המשך לפירוק הסוכרוז, מתפקדת כמעכב לביטוי האינברטאז, כאשר זאת נמצאת בעודף. בזן אור-1 אף ניתן להבחין בעליה קטנה ברמת ה-RNA של שני שבטי האינברטאז לקראת ההבשלה, בדיוק כאשר רמת החומציות בפרי יורדת.

לעומת זאת בלימטה המתוקה, שאינה צוברת חומצה כלל ואוגרת הקסוזות, נמצא כי בפרי הצעיר היתה רמה נמוכה ובפרי בוגר נמצאה עליה גדולה ביותר בכמות ה-RNA של שני איזוזימי האינברטאז (**תמונה 20**). יתכן שההשפעה המבקרת של החומצה על רמת ה-mRNA המקודד לאינברטאז, גורמת בלימטה לעלייתו העקבית במשך כל שלבי התפתחות הפרי עד ההבשלה.

בלימון חמוץ, אמנם נראה ביטוי דומה לזה שבאור-1, כך שבחנטים נראה שיא בכמות ה-mRNA שיורדת עד לרמה נמוכה ביותר במהלך התפתחות הפרי ואז שבה ועולה לקראת הבשלת הפרי (**תמונה 24**). אך, רמת ה-mRNA של שני האיזוזימים לאינברטאז חלשה במהלך כל שלבי התפתחות הלימון החמוץ, באופן יחסי לכל יתר זני הפירות שנבדקו (לעומת לימטה מתוקה שלא צוברת חומצה – **תמונה 25**). לחיזוק ההנחה גם כאן, יתכן שהחומצה הנצברת בלימון כבר בשלבים המוקדמים של התפתחות הפרי ונשמרת קבועה בהמשך, מהווה גורם מעכב ברמת השעתוק. לכן כמות ה-RNA, המקודד לאינברטאז, נשמרת נמוכה לאורך כל התפתחות הפרי. על אף העיכוב בביטוי האינברטאז, אין בלימון אגירה של סוכרוז. ההסבר לעובדה זו טמון בהשפעה נוספת שיש לחומציות הרבה בלימון, אשר גורמת לפירוק הספונטני של הסוכרוז. בכך "מוחלפת" פעילות האינברטאז כמפרק הסוכרוז, על ידי הצטברות החומצה, כפי שהודגם בעבר בפירות של ליים חמוץ (Echeverria 1990).

**-Abstract-**

The internal taste quality of citrus fruits is mainly determined by the TSS (total soluble solids) to acid ratio, which varies among different varieties during maturation. Sugar accumulation is affected by the activity of enzymes playing a role in sugar metabolism. Sucrose breakdown and compartmentalization directly affect assimilates import capabilities and determine the sink strength of the juice sacs. In this work, we focused on invertases, which catalyse the irreversible hydrolysis of sucrose to glucose and fructose. Invertase gene family includes a few types of invertases, cell wall, cytosolic and vacuolar enzymes.

In a preliminary work, two clones, Inv1 and Inv2, were isolated from Navel orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) juice sacs cDNA library. These clones were found to be highly homologous to acid soluble invertase genes from other plants. Although it was attempted, no clones showing homology to cell wall bound enzymes were isolated from the juice sac library. Similarly, no clones showing homologies to cell wall invertases were found in pulp libraries deposited in the citrus EST database. The aim of this work was to investigate the expression of these two clones, analyze their protein level and invertase activity during fruit development. An additional aim was to examine the localization of their products in the juice sacs cells.

In this work, we studied four varieties with different sugar accumulation characteristics: Or-1 (*Citrus reticulata* x temple) Mandarin and Navel Orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck), in which sugars reached up to 80% of the TSS, and their ratio between reducing sugars and sucrose was approximately 1:1 at the mature fruit; the two other varieties were Limetta (*Citrus limmetioides*) and sour lemon (*Citrus limon* [L.] Burm), in which sugars consist about 20% of the TSS at maturation, and the ratios between reducing sugars and sucrose were 12:1 and 6:1, respectively.

## II

The mRNA of the two clones displayed similar pattern of expression throughout fruit development. However, different patterns were detected while the various varieties were compared. Or-1 and Naval oranges showed a peak in their mRNA levels in young fruits while the mRNA levels in Limetta showed a gradual increase during fruit development. The mRNA levels in lemon were very low during all stages of fruit development, suggesting that citric acid accumulation affected the transcripts levels of the two invertase clones.

Antibodies generated against short peptides of Inv1 and Inv2 (By E. Blumwald, UC Davis) were used to examine the protein levels of the clones' products and their regulation. In Or-1, Limetta and Lemon fruits, changes in the protein levels paralleled usually the pattern of the mRNA throughout fruit development, suggesting transcriptional control of both isozymes. However, in Navel orange changes in the protein levels of Inv1 and Inv2 did not correspond that of the mRNAs, suggesting another mode of control, most likely, at the post transcriptional level.

The expected molecular weights of Inv1 and Inv2 proteins were 74kDa and 76kDa, respectively. However, in addition to these bands, protein bands of lower molecular weights (55kDa, 47kDa, 42kDa and lower) were detected by immunoblot analyses. . These represented, most likely, degradation products of the full-length proteins. Indeed, in most cases, the activity of invertase was detected during developmental stages where full-length enzymes were detected, i.e., in small fruits. Since the activity of invertase did not necessarily paralleled the mRNA or protein levels (including the degradation products) it was concluded that post-translational control was a major mode of regulation of invertase activity during fruit development.

Antibodies against Inv1 and Inv2 proteins were used to study the intra-cellular localization of the two clones' products using two methods, cell fractionation and microscopy. The fractionation experiments showed that towards fruit maturation of Or1 mandarin and navel orange a cross reaction was obtained not only in the soluble fraction, but also in the cell wall-bound protein fraction. Similarly, immuno-EM and confocal microscopy also demonstrated that some label could be detected in association with the cell wall.

### III

These results provide support for previous works which demonstrated that invertases are present in the cell wall of the juice sac cells, suggesting that sucrose hydrolysis occurs at the apoplasm of the juice sac. Therefore, at least part of the sucrose movement between the sink cells is apoplastic. The hydrolysis products, glucose and fructose, enter the cytoplasm, where they are probably converted back into sucrose by the sucrose phosphate synthase. The produced sucrose is being stored at the vacuole, during sugar accumulation stages when that activity of acid soluble invertase is barely detectable. The Comparison between the different varieties in relation to invertase expression, protein level and activity throughout fruit development is discussed in light of its possible role in sugar accumulation.

## References

- Arnold WN** (1965) Beta-Fructofuranosidase from Grape Berries. *Biochimica Et Biophysica Acta* **110**: 134-47
- Arnold WN** (1966) A Column Method for Enzymic Characterization of Coarse Cellular Fractions - Application to Insoluble Beta-Fructofuranosidase from Grape. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **113**: 451-6
- Avigad G** (1982) Sucrose and other disaccharides. *In* FAL W.Tanner, ed, *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol 13A, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 217-327
- Barber GA** (1985) The Equilibrium of the Reaction Catalyzed by Sucrose Phosphate Synthase. *Plant Physiology* **79**: 1127-1128
- Baud S, Vaultier MN, Rochat C** (2004) Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **55**: 397-409
- Bowen JE, Hunter JE** (1972) Sugar Transport in Immature Internodal Tissue of Sugarcane .2. Mechanism of Sucrose Transport. *Plant Physiology* **49**: 789-&
- Chapman J, Mcgarry A, Carmignac DF, Gahan PD** (1988) Cytochemical Methods for the Localization of Invertase Activity in Plant-Tissues. *Histochemistry* **90**: 215-217
- Cheng WH, Taliercio EW, Chourey PS** (1996) The Miniature1 seed locus of maize encodes a cell wall invertase required for normal development of endosperm and maternal cells in the pedicel. *Plant Cell* **8**: 971-983
- Cook MG, Evans LT** (1983) The Roles of Sink Size and Location in the Partitioning of Assimilates in Wheat Ears. *Australian Journal of Plant Physiology* **10**: 313-327
- Daie J** (1984) Characterization of Sugar-Transport in Storage Tissue of Carrot. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **109**: 718-722
- Daie J** (1985) Carbohydrate partitioning and metabolism in crops. *hort. rev.* **7**: 69-107
- Damon S, Hewitt J, Nieder M, Bennett AB** (1988) Sink Metabolism in Tomato Fruit .2. Phloem Unloading and Sugar Uptake. *Plant Physiology* **87**: 731-736
- D'Aoust MA, Yelle S, Nguyen-Quoc B** (1999) Antisense inhibition of tomato fruit sucrose synthase decreases fruit setting and the sucrose unloading capacity of young fruit. *Plant Cell* **11**: 2407-2418
- Dick PS, Aprees T** (1975) Pathway of Sugar-Transport in Roots of *Pisum-Sativum*. *Journal of Experimental Botany* **26**: 305-314
- Doehlert D. C. CPS** (1991) Possible roles of sucrose synthase in sink function. *In* SD J.L. Bonnemain, W.J. Lucas, J. Dainty, ed, *Recent Advances in Phloem Transport and Assimilate Compartmentation*. Oest Editions, France, pp 187-195
- Doehlert DC** (1990) Distribution of Enzyme-Activities within the Developing Maize (*Zea-Mays*) Kernel in Relation to Starch, Oil and Protein Accumulation. *Physiologia Plantarum* **78**: 560-567

- Doehlert DC, Felker FC** (1987) Characterization and Distribution of Invertase Activity in Developing Maize (*Zea-Mays*) Kernels. *Physiologia Plantarum* **70**: 51-57
- Echeverria E** (1990) Developmental Transition from Enzymatic to Acid-Hydrolysis of Sucrose in Acid Limes (*Citrus-Aurantifolia*). *Plant Physiology* **92**: 168-171
- Echeverria E, Gonzalez PC, Brune A** (1997) Characterization of proton and sugar transport at the tonoplast of sweet lime (*Citrus limmetioides*) juice cells. *Physiologia Plantarum* **101**: 291-300
- Edelman J, Hall MA** (1965) Enzyme Formation in Higher-Plant Tissues - Development of Invertase and Ascorbate-Oxidase Activities in Mature Storage Tissue of *Helianthus Tuberosus* L. *Biochemical Journal* **95**: 403-&
- Eschrich W** (1980) Free Space Invertase, Its Possible Role in Phloem Unloading. *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft* **93**: 363-378
- Ewing EE, Devlin M, Mcneill DA, Mcadoo MH, Hedges AM** (1977) Changes in Potato-Tuber Invertase and Its Endogenous Inhibitor after Slicing, Including a Study of Assay Methods. *Plant Physiology* **59**: 925-929
- Faye L, Berjonneau C, Rollin P** (1981) Studies on Beta-Fructosidase from Radish Seedlings .1. Purification and Partial Characterization. *Plant Science Letters* **22**: 77-87
- Felker FC, Shannon JC** (1980) Movement of C-14-Labeled Assimilates into Kernels of *Zea-Mays*-L .3. An Anatomical Examination and Micro-Auto-Radiographic Study of Assimilate Transfer. *Plant Physiology* **65**: 864-870
- Fondy B.R. GDR** (1983) Control of export and partitioning among sinks by allocation of products of photosynthesis in source leaves. *In* DGB D.D. Randall, R.L. Larson, B.J. Rapp, ed, *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology*, Vol 2, University of Missouri U.S.A., pp 33-42
- Frary A, Nesbitt TC, Frary A, Grandillo S, van der Knaap E, Cong B, Liu JP, Meller J, Elber R, Alpert KB, Tanksley SD** (2000) fw2.2: A quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* **289**: 85-88
- Fridman E, Carrari F, Liu YS, Fernie AR, Zamir D** (2004) Zooming in on a quantitative trait for tomato yield using interspecific introgressions. *Science* **305**: 1786-1789
- Fridman E, Pleban T, Zamir D** (2000) A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 4718-4723
- Frost GM, Greenshi.Rn, Teale FWJ** (1968) Some Properties of Beta-Fructofuranosidases Partially Purified from *Phaseolus Vulgaris* and *Solanum Tuberosum*. *Biochemical Journal* **107**: 625-&
- Geigenberger P, Stitt M** (1993) Sucrose Synthase Catalyzes a Readily Reversible-Reaction *In vivo* in Developing Potato-Tubers and Other Plant-Tissues. *Planta* **189**: 329-339
- Geiger D.R. SSA** (1975) Effects of temperature, anoxia and other metabolic inhibitors on translocation. *In* JAM M.H. Zimmerman, ed, *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol 1, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 256-286

- Giaquinta RT** (1977) Sucrose Hydrolysis in Relation to Phloem Translocation in Beta-Vulgaris. *Plant Physiology* **60**: 339-343
- Giaquinta RT** (1979) Sucrose Translocation and Storage in the Sugar-Beet. *Plant Physiology* **63**: 828-832
- Giaquinta RT, Lin W, Sadler NL, Franceschi VR** (1983) Pathway of Phloem Unloading of Sucrose in Corn Roots. *Plant Physiology* **72**: 362-367
- Gifford RM, Evans LT** (1981) Photosynthesis, Carbon Partitioning, and Yield. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **32**: 485-509
- Glasziou KT, Gayler KR** (1972) Storage of Sugars in Stalks of Sugar-Cane. *Botanical Review* **38**: 471-490
- Goetz M, Godt DE, Guivarc'h A, Kahmann U, Chriqui D, Roitsch T** (2001) Induction of male sterility in plants by metabolic engineering of the carbohydrate supply. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 6522-6527
- Goldschmidt E, Eliezer Koch KE** (1996) Citrus. *In* AAS E. Zamski, ed, Photoassimilate Distribution in Plants and Crops, Vol 34. Marcel Dekker Inc., New York, pp 797-823
- Goldschmidt EE, Branton D** (1977) Vacuoles as Sugar Storage and Transformation Organelles in Beet Root. *Plant Physiology* **59**: 104-104
- Goupil P, Croisille Y, Croisille F, Ledoigt G** (1988) Jerusalem Artichoke Invertases - Immunocharacterization of a Soluble Form and Its Putative Precursor. *Plant Science* **54**: 45-54
- Greiner S, Krausgrill S, Rausch T** (1998) Cloning of a tobacco apoplasmic invertase inhibitor - Proof of function of the recombinant protein and expression analysis during plant development. *Plant Physiology* **116**: 733-742
- Griffith SM, Jones RJ, Brenner ML** (1987) In vitro Sugar-Transport in Zea-Mays-L Kernels .1. Characteristics of Sugar Absorption and Metabolism by Developing Maize Endosperm. *Plant Physiology* **84**: 467-471
- Hatch M.D. SJA, Glasziou KT** (1963) Sugar accumulation cycle in sugar cane. I. Studies on enzymes of the cycle. *Plant Physiology* **38**: 338-343
- Hawker JS** (1969) Insoluble Invertase from Grapes - an Artifact of Extraction. *Phytochemistry* **8**: 337-&
- Hawker JS** (1985) Sucrose. *In* RAD P.M. Day, ed, *Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants*. Academic Press, London, pp 1-49
- Heyer AG, Raap M, Schroeer B, Marty B, Willmitzer L** (2004) Cell wall invertase expression at the apical meristem alters floral, architectural, and reproductive traits in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal* **39**: 161-169
- Ho LC** (1979) Regulation of Assimilate Translocation between Leaves and Fruits in the Tomato. *Annals of Botany* **43**: 437-448
- Ho LC** (1988) Metabolism and Compartmentation of Imported Sugars in Sink Organs in Relation to Sink Strength. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **39**: 355-378



- Ho LC, Lechary A, Willenbrink J** (1991) Sucrose cleavage in relation to import and metabolism of sugars in sink organs. *In* SD J.L. Bonnemain, W.J. Lucas, J. Dainty, ed, Recent Advances in Phloem Transport and Assimilate Compartmentation. . Oest Editions, France, pp 178-185
- Ho LC, Shaw AF** (1977) Carbon Economy and Translocation of C-14 in Leaflets of 7Th Leaf of Tomato during Leaf Expansion. *Annals of Botany* **41**: 833-&
- Huber SC, Israel DW** (1982) Biochemical Basis for Partitioning of Photosynthetically Fixed Carbon between Starch and Sucrose in Soybean (Glycine-Max-Merr) Leaves. *Plant Physiology* **69**: 691-696
- Hughes DL, Bosland J, Yamaguchi M** (1983) Movement of Photosynthates in Muskmelon Plants. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **108**: 189-192
- Huisinga B** (1979) Control of Loading and Unloading by Turgor Regulation in Long-Distance Transport. *Acta Botanica Neerlandica* **28**: 67-72
- Hurd RG, Gay AP, Mountfield AC** (1979) Effect of Partial Flower Removal on the Relation between Root, Shoot and Fruit-Growth in the Indeterminate Tomato. *Annals of Applied Biology* **93**: 77-89
- Husain SE, Thomas BJ, Kingston-Smith AH, Foyer CH** (2001) Invertase protein, but not activity, is present throughout development of *Lycopersicon esculentum* and *L-pimpinellifolium* fruit. *New Phytologist* **150**: 73-81
- Iki K, Nakagawa H, Ogura N, Takehana H** (1977) Intracellular-Localization of Beta-Fructofuranosidase in Tomato Fruit Tissue. *Agricultural and Biological Chemistry* **41**: 1311-1312
- Iki K, Sekiguchi K, Kurata K, Tada T, Nakagawa H, Ogura N, Takehana H** (1978) Immunological Properties of Beta-Fructofuranosidase from Ripening Tomato Fruit. *Phytochemistry* **17**: 311-312
- Iwagaki IY, Araki C, Hirose K** (1981) Seasonal changes of chemical constituents of satsuma mandarin fruit in the course of maturation *In* Okitsu, ed, Bulletin of the Fruit, Vol 8. MAFF, Tree Research Station pp 37-54
- Jaynes TA, Nelson OE** (1971) Invertase Inactivator in Maize Endosperm and Factors Affecting Inactivation. *Plant Physiology* **47**: 629-&
- Johnson C, Hall JL, Ho LC** (1988) Pathways of Uptake and Accumulation of Sugars in Tomato Fruit. *Annals of Botany* **61**: 593-603
- Kato T, Kubota S** (1978) Properties of Invertases in Sugar Storage Tissues of Citrus-Fruit and Changes in Their Activities during Maturation. *Physiologia Plantarum* **42**: 67-72
- Kim JY, Mahe A, Brangeon J, Prioul JL** (2000) A maize vacuolar invertase, IVR2, is induced by water stress. Organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. *Plant Physiology* **124**: 71-84
- Klann EM, Hall B, Bennett AB** (1996) Antisense acid invertase (TIV1) gene alters soluble sugar composition and size in transgenic tomato fruit. *Plant Physiology* **112**: 1321-1330

- Koch K** (2004) Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 235-246
- Koch KE, Avigne WT** (1990) Postphloem, Nonvascular Transfer in Citrus - Kinetics, Metabolism, and Sugar Gradients. *Plant Physiology* **93**: 1405-1416
- Koch KE, Tsui CL, Schrader LE, Nelson OE** (1982) Source-Sink Relations in Maize Mutants with Starch-Deficient Endosperms. *Plant Physiology* **70**: 322-325
- Koch KE, Zeng Y** (2002) Molecular approaches to altered C partitioning: Genes for sucrose metabolism. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **127**: 474-483
- Komatsu A, Moriguchi T, Koyama K, Omura M, Akihama T** (2002) Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggests different roles and phylogenetic relationships. *Journal of Experimental Botany* **53**: 61-71
- Komatsu A, Takanokura Y, Moriguchi T, Omura M, Akihama T** (1999) Differential expression of three sucrose-phosphate synthase isoforms during sucrose accumulation in citrus fruits (*Citrus unshiu* Marc.). *Plant Science* **140**: 169-178
- Kreidemann E** (1969) C-14 translocation in orange plants. *Aust. J. Agric. Res.* **20**: 291-300
- Kubo T, Hohjo I, Hiratsuka S** (2001) Sucrose accumulation and its related enzyme activities in the juice sacs of satsuma mandarin fruit from trees with different crop loads. *Scientia Horticulturae* **91**: 215-225
- Lalonde S, Tegeder M, Throne-Holst M, Frommer WB, Patrick JW** (2003) Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant Cell and Environment* **26**: 37-56
- Lang A, Thorpe MR** (1986) Water Potential, Translocation and Assimilate Partitioning. *Journal of Experimental Botany* **37**: 495-503
- Lauriere C, Lauriere M, Sturm A, Faye L, Chrispeels MJ** (1988) Characterization of Beta-Fructosidase, an Extracellular Glycoprotein of Carrot Cells. *Biochimie* **70**: 1483-1491
- Lauriere M, Lauriere C, Chrispeels MJ, Johnson KD, Sturm A** (1989) Characterization of a Xylose-Specific Antiserum That Reacts with the Complex Asparagine-Linked Glycans of Extracellular and Vacuolar Glycoproteins. *Plant Physiology* **90**: 1182-1188
- Lee DR** (1989) Vasculature of the Abscission Zone of Tomato Fruit - Implications for Transport. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* **67**: 1898-1902
- Leigh RA, Rees TA, Fuller WA, Banfield J** (1979) Location of Acid Invertase Activity and Sucrose in the Vacuoles of Storage Roots of Beet Root (*Beta-Vulgaris*). *Biochemical Journal* **178**: 539-547
- Lester GE, Arias LS, Gomez-Lim M** (2001) Muskmelon fruit soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase activity and polypeptide profiles during growth and maturation. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **126**: 33-36

- Li CY, Shi JX, Weiss D, Goldschmidt EE** (2003) Sugars regulate sucrose transporter gene expression in citrus. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **306**: 402-407
- Lichtner FT, Spanswick RM** (1981) Sucrose Uptake by Developing Soybean Cotyledons. *Plant Physiology* **68**: 693-698
- Lingle SE, Dunlap JR** (1987) Sucrose Metabolism in Netted Muskmelon Fruit during Development. *Plant Physiology* **84**: 386-389
- Little G, Edelman J** (1973) Solubility of Plant Invertases. *Phytochemistry* **12**: 67-71
- Lowell CA, Tomlinson PT, Koch KE** (1989) Sucrose-Metabolizing Enzymes in Transport Tissues and Adjacent Sink Structures in Developing Citrus-Fruit. *Plant Physiology* **90**: 1394-1402
- Manning K, Maw GA** (1975) Distribution of Acid Invertase in Tomato Plant. *Phytochemistry* **14**: 1965-1969
- Masuda H, Sugawara S** (1980) Purification and Some Properties of Cell Wall-Bound Invertases from Sugar-Beet Seedlings and Aged Slices of Mature Roots. *Plant Physiology* **66**: 93-96
- Masuda H, Takahashi T, Sugawara S** (1988) Acid and Alkaline Invertases in Suspension-Cultures of Sugar-Beet Cells. *Plant Physiology* **86**: 312-317
- Matsushita K, Uritani I** (1976) Isolation and Characterization of Acid Invertase Inhibitor from Sweet-Potato. *Journal of Biochemistry* **79**: 633-639
- Matsushita K, Uritani I** (1977) Synthesis and Apparent Turnover of Acid Invertase in Relation to Invertase Inhibitor in Wounded Sweet-Potato Root-Tissue. *Plant Physiology* **59**: 879-883
- Miron D, Petreikov M, Carmi N, Shen S, Levin I, Granot D, Zamski E, Schaffer AA** (2002) Sucrose uptake, invertase localization and gene expression in developing fruit of *Lycopersicon esculentum* and the sucrose-accumulating *Lycopersicon hirsutum*. *Physiologia Plantarum* **115**: 35-47
- Moorby J, Troughton JH, Currie BG** (1974) Investigations of Carbon Transport in Plants .2. Effects of Light and Darkness and Sink Activity on Translocation. *Journal of Experimental Botany* **25**: 937-944
- Moriguchi T, Abe K, Sanada T, Yamaki S** (1992) Levels and Role of Sucrose Synthase, Sucrose-Phosphate Synthase, and Acid Invertase in Sucrose Accumulation in Fruit of Asian Pear. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **117**: 274-278
- Nakagawa H, Ogura N, Takehana H, Kawasaki Y** (1972) Purification and Some Properties of 2 Types of Beta-Fructofuranosidase from Tomato Fruit. *Agricultural and Biological Chemistry* **36**: 18-&
- Nesbitt TC, Tanksley SD** (2001) fw2.2 directly affects the size of developing tomato fruit, with secondary effects on fruit number and photosynthate distribution. *Plant Physiology* **127**: 575-583
- Portis AR** (1982) Effects of the Relative Extrachloroplastic Concentrations of Inorganic-Phosphate, 3-Phosphoglycerate, and Dihydroxyacetone Phosphate on the Rate of Starch Synthesis in Isolated Spinach-Chloroplasts. *Plant Physiology* **70**: 393-396

- Prado FE, Vattuone MA, Fleischmacher OL, Sampietro AR** (1985) Purification and Characterization of Ricinus-Communis Invertase. *Journal of Biological Chemistry* **260**: 4952-4957
- Prentice N** (1972) Invertase of Germinated Barley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **20**: 764-&
- Prentice N, Robbins GS** (1976) Composition of Invertases from Germinated Barley. *Cereal Chemistry* **53**: 874-880
- Pressey R** (1966) Separation and Properties of Potato Invertase and Invertase Inhibitor. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **113**: 667-&
- Pressey R** (1967) Invertase Inhibitor from Potatoes - Purification Characterization and Reactivity with Plant Invertases. *Plant Physiology* **42**: 1780-&
- Pressey R** (1968) Invertase Inhibitors from Red Beet Sugar Beet and Sweet Potato Roots. *Plant Physiology* **43**: 1430-&
- Pressey R, Avants JK** (1980) Invertases in Oat Seedlings - Separation, Properties, and Changes in Activities in Seedling Segments. *Plant Physiology* **65**: 136-140
- Rausch T, Greiner S** (2004) Plant protein inhibitors of invertases. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* **1696**: 253-261
- Rhodes MJC** (1977) The extraction and purification of enzymes from plant tissues *In* H Smith, ed, *Regulation of Enzyme Synthesis and Activity in Higher Plants*. Academic Press, London, pp 245-269
- Rhodes MJC** (1980) The maturation and ripening of fruits. *In* KV Thimann, ed, *Senescence in Plants*, Vol 8. C.R.C. Press, Boca Raton, Fla., pp 157-205
- Ricardo CPP, ap Rees T** (1970) Invertase activity during the development of carrot roots. *Phytochemistry* **9**: 239-247
- Roberts DWA** (1973) Survey of Multiple Forms of Invertase in Leaves of Winter-Wheat, *Triticum-Aestivum* L Emend Thell-Ssp-Vulgare. *Biochimica Et Biophysica Acta* **321**: 220-227
- Roitsch T, Gonzalez MC** (2004) Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science* **9**: 606-613
- Rosario EJD, Santisopasri V** (1977) Characterization and Inhibition of Invertases in Sugar-Cane Juice. *Phytochemistry* **16**: 443-445
- Sadka A, Dahan E, Or E, Roose ML, Marsh KB, Cohen L** (2001) Comparative analysis of mitochondrial citrate synthase gene structure, transcript level and enzymatic activity in acidless and acid-containing Citrus varieties. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**: 383-390
- Saftner RA, Daie J, Wyse RE** (1983) Sucrose Uptake and Compartmentation in Sugar-Beet Taproot Tissue. *Plant Physiology* **72**: 1-6
- Salerno GL, Pontis HG** (1978) Studies on Sucrose Phosphate Synthetase - Inhibitory Action of Sucrose. *Febs Letters* **86**: 263-267
- Sampietro AR, Vattuone MA, Prado FE** (1980) A Regulatory Invertase from Sugar-Cane Leaf-Sheaths. *Phytochemistry* **19**: 1637-1642
- Sato T, Iwatsubo T, Takahashi M, Nakagawa H, Ogura N, Mori H** (1993) Intercellular Localization of Acid Invertase in Tomato Fruit and Molecular-Cloning of a Cdna for the Enzyme. *Plant and Cell Physiology* **34**: 263-269

- Schaffer AA** (1987) Sucrose accumulation in mature sweet melon fruits. *Supp. Plant Physiology* **83**: Abs. No. 634 pp. 105
- Schaffer AA, Aloni B, Fogelman E** (1987) Sucrose Metabolism and Accumulation in Developing Fruit of Cucumis. *Phytochemistry* **26**: 1883-1887
- Schaffer AA, Goldschmidt EE, Goren R, Galili D** (1985) Fruit-Set and Carbohydrate Status in Alternate and Nonalternate Bearing Citrus Cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **110**: 574-578
- Schaffer AA, Petreikov M** (1997) Sucrose-to-starch metabolism in tomato fruit undergoing transient starch accumulation. *Plant Physiology* **113**: 739-746
- Schaffer AA, Rylski I, Fogelman M** (1989) Carbohydrate Content and Sucrose Metabolism in Developing Solanum-Muricatum Fruits. *Phytochemistry* **28**: 737-739
- Schaffer AA, Sagee O, Goldschmidt EE, Goren R** (1987) Invertase and Sucrose Synthase Activity, Carbohydrate Status and Endogenous Iaa Levels during Citrus Leaf Development. *Physiologia Plantarum* **69**: 151-155
- Schneider H** (1968) The anatomy of citrus. *In* LDB W. Reuther, H.J. Webber, ed, *The Citrus Industry*, Vol 2. Revised Edition, University of California, Riverside, pp 2-23
- Shomer I** (1975) Structure, Development and Adhesion of Juice Sacs in Citrus Fruits Segments. Hebrew University, Jerusalem
- Sinclair WB** (1984) The biochemistry and physiology of the lemon and other citrus fruit. *In*. Univ. Calif. Div. Agric. and Nat. Resources, p 946
- Soule J. GW** (1986) Maturity and grade standards. *In* SN W. Wardowski, W. Grierson, ed, *Fresh Citrus Fruits*. Avi Publishing Company Inc., pp 23-47
- Sum WF, Rogers PJ, Jenkins ID, Guthrie RD** (1980) Isolation of Invertase from Banana Fruit (*Musa-Cavendishii*). *Phytochemistry* **19**: 399-401
- Tang GQ, Luscher M, Sturm A** (1999) Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning. *Plant Cell* **11**: 177-189
- Thom M** (1990) Sucrose transport into stalk tissue of sugar cane. *Plant Physiology* **93**: 692
- Thom M, Leigh RA, Maretzki A** (1986) Evidence for the Involvement of a Udp-Glucose-Dependent Group Translocator in Sucrose Uptake into Vacuoles of Storage Roots of Red Beet. *Planta* **167**: 410-413
- Thom M, Maretzki A** (1985) Group Translocation as a Mechanism for Sucrose Transfer into Vacuoles from Sugarcane Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**: 4697-4701
- Thomas PA, Felker FC, Crawford CG** (1992) Sugar Uptake and Metabolism in the Developing Endosperm of Tassel-Seed Tunicate (Ts-5 Tu) Maize. *Plant Physiology* **99**: 1540-1545
- Thorne JH** (1982) Characterization of the Active Sucrose Transport-System of Immature Soybean Embryos. *Plant Physiology* **70**: 953-958

- Thorne JH, Koller HR** (1974) Influence of Assimilate Demand on Photosynthesis, Diffusive Resistances, Translocation, and Carbohydrate Levels of Soybean Leaves. *Plant Physiology* **54**: 201-207
- Thorpe MR, Minchin PEH, Williams JHH, Farrar JF, Tomos AD** (1993) Carbon Import into Developing Ovules of *Pisum-Sativum* - the Role of the Water Relations of the Seed Coat. *Journal of Experimental Botany* **44**: 937-945
- Ting S.V. RRL** (1986) Citrus Fruit and Their Products. *In*. Marcel Dekker Inc., New York and Basel, p 203
- Tomlinson PT, Duke ER, Nolte KD, Koch KE** (1991) Sucrose Synthase and Invertase in Isolated Vascular Bundles. *Plant Physiology* **97**: 1249-1252
- Trouverie J, Thevenot C, Rocher JP, Sotta B, Prioul JL** (2003) The role of abscisic acid in the response of a specific vacuolar invertase to water stress in the adult maize leaf. *Journal of Experimental Botany* **54**: 2177-2186
- Tzinovich A** (2004) The Involvement of Sucrose Metabolism Genes in the Course of Citrus Flowering and Fruit Development. . The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot
- Tzur A** (1994) Carbohydrate Metabolism in Various Stages of Citrus Fruit Development. Hebrew University, Jerusalem
- Tzur A. and Goren R. UZ** (1992) Carbohydrate Metabolism in Developing Citrus Fruit. *Proc. Int. Soc. Citriculture.*: 405-411
- Walker AJ, Ho LC** (1976) Young Tomato Fruits Induced to Export Carbon by Cooling. *Nature* **261**: 410-411
- Walker AJ, Ho LC** (1977) Carbon Translocation in Tomato - Carbon Import and Fruit Growth. *Annals of Botany* **41**: 813-823
- Walker AJ, Ho LC, Baker DA** (1978) Carbon Translocation in Tomato - Pathways of Carbon Metabolism in Fruit. *Annals of Botany* **42**: 901-909
- Walker AJ, Thornley JHM** (1977) Tomato Fruit - Import, Growth, Respiration and Carbon Metabolism at Different Fruit Sizes and Temperatures. *Annals of Botany* **41**: 977-985
- Wang F, Sanz A, Brenner ML, Smith A** (1993) Sucrose Synthase, Starch Accumulation, and Tomato Fruit Sink Strength. *Plant Physiology* **101**: 321-327
- Wang F, Smith AG, Brenner ML** (1994) Temporal and Spatial Expression Pattern of Sucrose Synthase during Tomato Fruit-Development. *Plant Physiology* **104**: 535-540
- Wardlaw IF** (1993) Sink Strength - Its Expression in the Plant. *Plant Cell and Environment* **16**: 1029-1030
- Warren-Wilson J** (1967) Ecological data on dry-matter production by plants and plant communities. *In* OTD E.F. Bradley, ed, *The Collection and Processing of Field Data*. Interscience, Sydney, pp 77-123
- Weber H, Heim U, Golombek S, Borisjuk L, Manteuffel R, Wobus U** (1998) Expression of a yeast-derived invertase in developing cotyledons of *Vicia narbonensis* alters the carbohydrate state and affects storage functions. *Plant Journal* **16**: 163-172

- Welbaum GE, Meinzer FC** (1990) Compartmentation of Solutes and Water in Developing Sugarcane Stalk Tissue. *Plant Physiology* **93**: 1147-1153
- Whiting GC** (1970) Sugars. *In* AC Hulme, ed, *The Biochemistry of Fruits and their Products.*, Vol 1. Academic Press, London and New York, pp 1-31
- Willenbrink J, Doll S** (1979) Characteristics of the Sucrose Uptake System of Vacuoles Isolated from Red Beet Tissue - Kinetics and Specificity of the Sucrose Uptake System. *Planta* **147**: 159-162
- Wolswinkel P** (1984) Phloem Unloading and Sink Strength - the Parallel between the Site of Attachment of *Cuscuta* and Developing Legume Seeds. *Plant Growth Regulation* **2**: 309-317
- Wolswinkel P** (1985) Phloem Unloading and Turgor-Sensitive Transport - Factors Involved in Sink Control of Assimilate Partitioning. *Physiologia Plantarum* **65**: 331-339
- Wolswinkel P** (1990) Recent Progress in Research on the Role of Turgor-Sensitive Transport in Seed Development. *Plant Physiology and Biochemistry* **28**: 399-410
- Wolswinkel P, Ammerlaan A** (1984) Turgor-Sensitive Sucrose and Amino-Acid-Transport into Developing Seeds of *Pisum-Sativum* - Effect of a High Sucrose or Mannitol Concentration in Experiments with Empty Ovules. *Physiologia Plantarum* **61**: 172-182
- Wu GL, Zhang XY, Zhang LY, Pan QH, Shen YY, Zhang DP** (2004) Phloem unloading in developing walnut fruit is symplasmic in the seed pericarp, and apoplasmic in the fleshy pericarp. *Plant and Cell Physiology* **45**: 1461-1470
- Wyse R** (1979) Sucrose Uptake by Sugar-Beet Tap Root-Tissue. *Plant Physiology* **64**: 837-841
- Wyse RE** (1983) Allocation of carbon: Perspectives on the central role of sucrose transport and metabolism. *In* DGB D.D. Randall, R.L. Larson, B.J. Rapp, ed, *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology.*, Vol 2, University of Missouri U.S.A., pp 1-19
- Wyse RE, Zamski E, Tomos AD** (1986) Turgor Regulation of Sucrose Transport in Sugar-Beet Taproot Tissue. *Plant Physiology* **81**: 478-481
- Yelle S, Chetelat RT, Dorais M, Deverna JW, Bennett AB** (1991) Sink Metabolism in Tomato Fruit .4. Genetic and Biochemical-Analysis of Sucrose Accumulation. *Plant Physiology* **95**: 1026-1035
- Yelle S, Hewitt JD, Robinson NL, Damon S, Bennett AB** (1988) Sink Metabolism in Tomato Fruit .3. Analysis of Carbohydrate Assimilation in a Wild-Species. *Plant Physiology* **87**: 737-740
- Zhang LY, Peng YB, Pelleschi-Travier S, Fan Y, Lu YF, Lu YM, Gao XP, Shen YY, Delrot S, Zhang DP** (2004) Evidence for apoplasmic phloem unloading in developing apple fruit. *Plant Physiology* **135**: 574-586
- Zhou LL, Chen CC, Ming R, Christopher DA, Paull RE** (2003) Apoplasmic invertase and its enhanced expression and post-translation control during fruit maturation and ripening. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **128**: 628-635

**Sucrose Metabolism in Citrus Fruits:  
Invertases Expression at the Juice Sacs**

M.Sc. Thesis

Submitted to the Faculty of Agricultural, Food and Environmental Quality  
Sciences of the Hebrew University of Jerusalem for the degree of  
"Master of Science in Agriculture"

By  
Adi Mondshine

Rehovot, Israel

December 2006