

מעורבות פראוקסידאזות בפירוק אנטוציאנינים בפרח

הברונפלסיה

עבודת גמר

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

מאת

ליאת שחר

ספטמבר 2007

רחובות

אלול תשס"ה

עבודה זו נעשתה בהדרכת

ד"ר מיכל אורן-שמיר

המחלקה לפרחים, מרכז וולקני

ופרופ' דוד וייס

המחלקה למטעים וצמחי נוי,

הפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה

תודות

ברצוני להודות לדר' מיכל שמיר על ההנחייה המסורה, על העידוד, הסבלנות וההשקעה.
לפרופ' דוד וייס, על העזרה, הייעוץ והתמיכה לאורך כל הדרך.
לדר' משה ראובני ודר' דליה אבנור על העזרה בתרבויות הרקמה.
לדר' חנינית קולטאי על העזרה והייעוץ.
לרינת על הכל, אבל באמת על הכל.
לעדה על כל העזרה והתמיכה.
לאיילת על הפריית הרעיונות ההדדית.
לטל ומורן על הפינה החמה במעבדה השכנה.
למאיה על העזרה המקצועית והאישית.

תוכן עניינים

| | |
|----|----------------|
| 1 | רשימת קיצורים |
| 2 | תקציר (עברית) |
| 4 | מבוא |
| 13 | שיטות וחומרים |
| 20 | תוצאות |
| 38 | דיון |
| 44 | רשימת ספרות |
| I | תקציר (אנגלית) |

ראשי תיבות וקיצורים

| קיצור | |
|-----------------|--|
| BA | Benzyladenine |
| CaMV | Cauliflower Mosaic Virus |
| DDW | Double distilled water |
| DDT | Dithiothreitol |
| dNTP | Dioxide Nucleotide Tri Phosphate |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide |
| EDTA | Ethylene diamine tetraacetic acid |
| GFP | green fluorescent protein |
| GUS | β-glucuronidase |
| IAA | Indole 3-acetic acid |
| IBA | Indolebutyric acid |
| IPTG | Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside |
| LC-MSMS | liquid chromatography-tandem mass-spectrometry |
| MS | mass-spectrometry |
| NAA | Naphthaleneacetic acid |
| O.D | Optical density |
| PAL | Phenylalanine Ammonia Lyase |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| SDS | Sodium dodecyl sulphat |
| SDS-PAGE | Sodium dodecyl sulphat-Polyacrylamide gel electrophoresis |
| TDZ | Thidiazuron |
| TMB | 3, 3', 5, 5' tetramethyl benzidin |
| UV | Ultra violet |

תקציר

קבוצת הפיגמנטים העיקרית בצמחים והמונה כמה מאות מרכיבים היא קבוצת האנטוציאנינים. האנטוציאנינים מצטברים בחלליות של תאי האפידרמיס בעלי כותרת בפרחים וכן באיברי צמח שונים כמו גבעולים, עלים ופירות. הם אחראיים לצבעים שבין ורוד, אדום לכחול. יציבות פיגמנטים אלו תלויה בתנאי המיקרוסביבה בחללית כמו ריכוז מתכות, רמת פלבנואידים ותנאי חומציות.

מסלול הביוסינתזה של האנטוציאנינים כחלק מהמסלול הפנילפרופנואידי נחקר רבות ואופיין במספר צמחי מודל כמו ארבידופסיס, פטוניה ונבטי תירס. בניגוד לידע המולקולרי המפורט הקיים על הסינתזה, יש מעט מאד ידע על היציבות והפירוק של פיגמנטים אלו ברקמות צמחיות. למרות עובדה זו, ברור שישנו פירוק של אנטוציאנינים בצמחים וניתן להניח שתהליכי הפירוק משפיעים באופן ניכר על צבע המוצרים החקלאיים. מחקרים שנערכו בפרי הליצי' הראו כי קיים פירוק אנטוציאנינים בקליפת הפרי בזמן האיכסון. כמו כן הוכח כי קיים פירוק אנזימטי של אנטוציאנינים במיץ אוכמניות. במחקר אחר שהתבצע לאחרונה בגפן, הראו פירוק של אנטוציאנינים מסומנים בעקבות חשיפה לטמפרטורות גבוהות.

לאחרונה, אופיין במעבדתנו תהליך פירוק פעיל של אנטוציאנינים והוכח כי יש צורך ביצירת חלבונים חדשים לצורך פירוק הצבע. ככל הידוע לנו, עבודה זו היא הראשונה המתארת פירוק פעיל, *in planta*, של אנטוציאנינים. פרחי ברונפליסיה משמשים כמודל מצוין למחקר על הפירוק מכמה סיבות: א. הפרחים עוברים שינוי צבע דרמטי ומהיר מסגול כהה עם פתיחתם ועד ללבן יומיים לאחר הפתיחה, ושינוי זה הוא כתוצאה מירידה בריכוז הפיגמנטים ברקמה. ב. תהליך זה של פירוק אנטוציאנינים מתרחש גם כשהפרחים מנותקים מהצמח ביום פתיחתם וטבולים בתמיסת סוכרוז. ג. השתייכות הברונפליסיה למשפחת הסולניים מאפשרת אפיון של חלבונים או גנים על ידי השוואה לספריות של צמחי מודל ממשפחה זו כמו עגבנייה וטבק.

מועמדים סבירים כאנזימי פירוק של אנטוציאנינים, בהסתמך על עבודות מחקר בין ומיצי פירות, הם הפראוקסידוזות. קבוצת אנזימים זו פועלת ברוב אברוני התא, כולל החלליות. במחקר מוקדם במעבדתנו נראתה קורלציה ברורה בין רמת פעילות פראוקסידוזות כללית לזו של פירוק האנטוציאנינים בברונפליסיה. בעבודה זו נבחנה מעורבותו של אנזים ממשפחת הפראוקסידוזות בפירוק אקטיבי של אנטוציאנינים בפרח הברונפליסיה ופותחו מערכות טרנספורמציה ורגנרציה שישמשו לבחינת פעילות אנזימים אלו בצמח הברונפליסיה.

בפרח הברונפליסיה פעילים מספר איזואנזימים ממשפחת הפראוקסידוזות, שפעילותם משתנה עם התפתחות הפרח והעלמות הצבע. כאשר נבחנה פעילות איזואנזימים אלו בחלקי הצמח השונים נצפתה דיפרנציאליות רבה של איזואנזימים ממשפחת הפראוקסידוזות. האיזואנזימים הפעילים בפרח כמעט ולא מופיעים באברי הצמח האחרים. ניתן לראות פעילות של שניים מאיזואנזימים אלו בעלה בוגר ובאופן חלש מאוד בעלה צעיר.

במעקב אחר פעילות אניזמי פראוקסידאזות בפרח, נראו מספר איזואנזימים שרמת פעילותם עולה בקורלציה לפירוק הפיגמנטים. בידוד פראוקסידאזות אלו נעשה על ידי הרצת מיצוי חלבונים מסיסים מפרח הברונפלסיה על קולונת החלפת קטיונים וקולונת ג'ל פילטרציה. התקבל חלבון אחד בעל פעילות פראוקסידאז. החלבון המבודד נשלח לאנליזת LC-MS-MS ונמצא בעל רצף חלקי התואם לאנזימי פראוקסידאז. במקביל לבידוד חלבון הפראוקסידאז, בודד רצף חלקי מגן פראוקסידאז המתבטא בפרח הברונפלסיה. רצף זה הוא בעל הומולוגיה גבוהה לשני גנים מעגבניה המקודדים לפראוקסידאז המעורב בתהליך יצירת ליגנין בשורש העגבניה. בהשוואה לרצפים אלו, רצף גן הפראוקסידאז שבודד מברונפלסיה מייצג כ-40% מרצף הגן השלם. מכיוון שאין בספרות ידע על אנזימים מפרקי אנטוציאנינים בצמח השלם, יתכן שלתוצר גן זה בברונפלסיה פעילות הקשורה לפירוק הפיגמנטים.

רמת ביטוי הגן המבודד בזמן התפתחות הפרח ופירוק האנטוציאנינים נבחנה על ידי ראקציות real time PCR שערכנו ל-cDNA שמקורו ב-RNA שהופק מפרחים בשלבי התפתחות שונים. נמצא כי רמת ביטוי הגן גבוהה ביותר שעות ספורות לפני הפתיחת הפרח, ורמה זו יורדת בהדרגה עד לרמה נמוכה מאד יומיים לאחר הפתיחה. תוצאות אלו מחזקות את האפשרות שהגן המבודד מקודד לאיזואנזים של פראוקסידאז שמעורב בפירוק האנטוציאנינים.

המשך מחקר פעילות הגן הצמח הברונפלסיה דורש התמרה חולפת או קבועה של צמח הברונפלסיה. לשם ביצוע התמרה זו פותחו מערכות טרנספורמציה ורגנרציה בצמח הברונפלסיה. מערכת הטרנספורמציה לפרחים פותחה בעזרת חיידקי אגרובקטריום המכילים את הגן המדווח GFP. מערכת הרגנרציה פותחה ע"י השוואת תגובת חלקי צמח שונים למצעים בעלי הרכב הורמונלי שונה. מניסוי זה נקבע כי איבר הצמח העובר רגנרציה באופן המיטבי הוא עלה צעיר ונמצא מצע אופטימלי לרגנרציה.

לסיכום, בעבודה זו הוכחנו שפעילות איזואנזימים מסויימים עולה בקורלציה להעלמות הצבע בפרחים, והראנו שישנה התאמה בין פעילות האנזים לרמת ביטוי הגן. כמו כן פיתחנו מערכות שימשו להמשך בחינת פעילות אנזימים אלו בצמח הברונפלסיה.

1. מבוא

מסלול הביוסנתזה של אנטוציאנינים

מסלול יצירת האנטוציאנינים נחקר בפירוט רב, במיוחד בפרח הפטוניה בו כל האנזימים והגנים המעורבים במסלול הביוסנטטי ידועים (Mol et al., 1998; Winkel-Shirley, 2001). בתחילה, נחקרו הגנים הקשורים בתורשת צבע הפרחים ועם הזמן התוסף הידע הביוכימי המקשר גנים אלו לתפקידם הספציפי. הידע המולקולרי עזר לזהות את מסלול הסינתזה של הפיגמנט על כל הגנים והאנזימים הקשורים בו.

הסינתזה מתחילה באנזים פנילאלנין אמוניה ליאז (PAL) הגורם לזירוז יצירת החומצה הצינמית ע"י דה אמינציה של פניל אלנין. מסלול זה של פנילפרופנואיד מסתיים עם יצירת Coumaroyl-CoA, שהוא הסובסטר הראשון ליצירת פלבנואידים. האנזים הראשון בסינתזה השלד הפלבנואיד הוא Chalcone synthase אשר דוחס 3 מולקולות של Malonyl-CoA ומולקולה אחת של Coumaroyl-CoA לפלבנואיד הראשון Naringenin chalcone (Koes et al., 1989). האנזים השני במסלול הינו Chalcone isomerase (CHI) אשר גורם לאיזומרציה בטבעת C של Chalcone והפיכתו ל-Naringenin. האנזים האחרון בשרשרת יצירת השלד הארומטי פלבנואיד הוא 3-Flavanone hydroxylase (F3H). ההופך Naringenin ל-Dihydrokaempferol ע"י הידרוקסילציה. שלב זה הינו שלב מפתח כאשר מספר העמדות שעברו הידרוקסילציה יקבע את סוג הפיגמנט. האנזימים F3H, F3'H או F3'5'H יקבעו את מספר קבוצות ההידרוקסיל על האנטוציאנידין. לאחר גמר הסינתזה מועבר האנטוציאנין לוקואולה.

יציבות ופירוק האנטוציאנינים

בניגוד לידע הרב שהצטבר על סינתזה האנטוציאנינים מעט מאד ידוע על תהליכי הפירוק שלהם. רוב המחקר עד היום עוסק בפירוק אנטוציאנינים במיצים ופירות מעובדים או מאוחסנים. אנטוציאנינים מתפרקים בשתי דרכים עיקריות: פירוק כימי, המושפע מגורמים חיצוניים כמו גם מתנאי המקרוסביבה בה נמצא הפיגמנט. ופירוק אנזימטי המתבצע ע"י שתי קבוצות אנזימים עיקריות- פוליפנול אוקסידאזות ופראוקסידאזות. (Kader et al., 1998; Kader et al., 2002)

השפעת תנאי סביבה חיצוניים על יציבות הפיגמנט

טמפרטורה: טמפרטורה היא אחד הגורמים החיצוניים העיקריים המשפיעים על צבירת אנטוציאנינים ברקמת הצמח החי: טמפרטורה נמוכות מעלות וטמפרטורה גבוהות מורידות את ריכוז האנטוציאנינים (Zhong and Yoshida, 1993; Christie et al., 1994; Leyva et al., 1995; Oren-Shamir and) (Levi-Nissim, 1997; Zhang et al., 1997; Oren-Shamir and Nissim-Levi, 1999).

במיצויי אנטוציאנינים שונים ובפירות קטופים טמפרטורה נמוכות מעלות את יציבות האנטוציאנינים וטמפרטורות גבוהות מורידות אותה וגורמות לפירוק צבע מהיר יותר (Kirca et al., 2006; Janna et al., 2006).

Janna ו-Khairul (2006) חקרו את השפעת הטמפרטורה על מיצוי אנטוציאנינים מהפרח *Melastoma malabathricum*. כדי להשוות את ההשפעה של טמפרטורה על תכולת אנטוציאנינים, נאספו נתונים ממיצויים שאוחסנו בחושך במשך 26 ימים בשתי טמפרטורה שונות 31°C ו- 25°C . נמצאה ירידה קטנה יותר בריכוז אנטוציאנינים בטמפרטורה הנמוכה יותר. Kirca וחבריו (2006) חקרו את יציבות האנטוציאנינים של גזר שחור, המשמשים כצבע מאכל טבעי, במגוון מיצי פירות ונקטרים בטמפרטורות אחסון שונות (4°C - 37°C). אחסון בארבע מעלות הגביר את יציבות האנטוציאנינים בכל הדוגמאות. Simpson (1985) הציע שפירוק של אנטוציאנינים בחום מתרחש בשני מנגנונים: (1) הידרוליזה של הקשרים ה-3 גליקוזידים ליצירת אגליקון פחות יציב, ו-2) פתיחה הידרוליטית של טבעת הפיריליום ליצירת chalcone מחליף, שמתפרק לתרכובות חומות מסיסות בעלות טבע פוליפנולי.

תאורה: לאור יש השפעה חיובית על יצור אנטוציאנינים ברקמות הצמח החי, אך במיצויי אנטוציאנינים ובמוצרים המכילים אנטוציאנינים השפעתו הפוכה. במחקר שנערך בריבה שיוצרה מזנים שונים של פטל אוחסנה הריבה למשך שלושה חודשים תחת תאורה בעוצמה של 950 lux ובחושך מוחלט (Haffner et al., 2003). צבע הריבה שאוחסנה בחושך לא השתנה כלל בעוד שבריבה שאוחסנה באור נמדדה ירידה בתכולת האנטוציאנינים. במיצוי אנטוציאנינים שהופק מפרחי *Melastoma malabathricum* ניתן לראות ירידה משמעותית בריכוז האנטוציאנינים במיצוי כאשר הוא נחשף לאור ישיר של מנורה בעוצמת הארה 1.5 W בטמפרטורה של 25°C (Janna et al., 2006). בפרי הטרופי *Syzygium malaccense* חשיפה לאור מגבירה מאוד את אובדן הצבע בהשוואה לאחסון בחושך בטמפרטורה זהה של 5°C למשך 30 ימים. לאחר 30 ימים פירות שאוחסנו בתנאי תאורה היו אדומים בהירים ובעלי אזורים צהובים או חומים בקליפה. באחסון בקור, פירוק הצבע האדום בקליפה וגם ההצהבה היו פחותים (Sankat et al., 2000).

חמצן: חמצן עשוי לחמצן ולפרק אנטוציאנינים באופן ישיר ו/או עקיף, דרך מרכיבים מחומצנים, להנבת פיגמנטים חסרי צבע או חומים, כלומר חימצון של o-dihydroxyphenols לקוינונים ותגובה עוקבת בין הקוינונים לאנטוציאנינים (Gradinaru et al., 2003).

מחקר שנערך על מיץ רימון שנארז באריזות בעלות חדירות שונה לחמצן: זכוכית שקופה וירוקה וקרטון מצופה פוליאיתילן הראה שאנטוציאנינים התפרקו, ביחס ישיר לאובדן הצבע, פחות במיצים שאוחסנו בזכוכית. תוצאות אלו מרמזות שכיוון שמיכלי קרטון חדירים לחמצן, לחמצן יש השפעה רבה יותר מאור על אנטוציאנינים וע"י כך על אובדן צבע (Perez-Vicente et al., 2004).

השפעת תנאי מיקרוסביבה על יציבות הפיגמנט

מבנה הפיגמנט: כתלות במבנה המולקולרי, מספר אנטוציאנינים יציבים יותר מאחרים. המבנה הבסיסי של המולקולה הוא האגליקון שמורכב משלוש טבעות פירוליות, זהו מבנה מאוד לא יציב. בהמשך לתהליך הסינטזה מבנה זה עובר גליקוזילציה ואצילציה ע"י חומצות אורגניות וסוכרים שונים. למשל, דימתוקסילציה של מולקולת האנטוציאנין העיקרי בענבים, מלבידין גליקוזיד, הופכת אותו לאחד האנטוציאנינים היציבים ביותר מבחינת צבע (Bridle and Timberlake, 1997). עליה במצב הגליקוזידי והנוכחות של קבוצות אציל ארומטיות מייצבים את מולקולת האנטוציאנין (Cevallos-Casals, Mazza and Miniati, 1993; Matsufuji et al., 2003). במחקרם של Cisneros-Zevallos (2004) מיצויים מימיים של אנטוציאנינים מתפוח אדמה מתוק ותירס סגול נבדקו תחת תנאי pH, טמפרטורה ואור שונים והשוו לצבעים מסחריים המופקים מגזר סגול ומענבים אדומים. צבעים מתפוח אדמה מתוק וגזר סגול, העשירים באנטוציאנינים שעברו אצילציה, הראו עמידות גבוהה יותר מצבעים של תירס סגול וענבים אדומים העשירים באנטוציאנינים שלא עברו אצילציה.

pH:

ב-pH נתון, קיים שיווי משקל בין ארבעה אגליקונים שונים אשר חלקם צבעוניים וחלקם חסרי צבע: הצורות בעלות הצבע הן quinoidal (anhydro) כחול וקטיון פלבליום אדום. הצורות חסרות הצבע הן carbinol pseudobase ו-chalcone. תחת תנאים נייטרליים או חומציים מעט, שיווי המשקל נוטה לכיוון הצורות חסרות הצבע. בתנאים חומציים מאוד (בין 1 ל-3) הפיגמנט מתקיים בצורת יון הפלבליום האדום כהה. ה-pH העולה גורם להידרטיזציה של היון באופן איטי ל-pseudobase חסר הצבע (Harbone, 1984). Brouillard (1988) הבחין שככל שה-pH עולה, מתרחשת תחרות קינטית ותרמודינמית בין תגובת ההידרציה על העמדה השנייה של קטיון הפלבליום ותגובת מעבר הפרוטון הקשורה לקבוצות ההידרוקסיל החומציות שלו. זה מראה שהאנטוציאנינים עוברים מספר ריאקציות כאשר הפיגמנט נהרס מה שמשפיע על הצבע. Abdel-Aal ו-Hucl (2003) מצאו כי אנטוציאנינים מחיטה כחולת גרגרים עמידים יותר לחימום ככל שה-pH נמוך יותר. Janna וחבריו (2006) מצאו שתנאי האחסון האופטימליים לפיגמנטים אנטוציאנינים צבעוניים הם בתמיסה חומצית.

קופיגמנטציה ואסוציאציה עצמית: קופיגמנטציה ואסוציאציה עצמית משפיעים על עוצמת הצבע ויציבות האנטוציאנינים בתוך התא הצמחי ובמיצויים מימיים של הפיגמנטים. למולקולות המתפקדות כקופיגמנטים כמו פלבנואידים, אלקלואידים או חומצות אורגניות בד"כ אין צבע משל עצמן, אבל כאשר מוסיפים אותם לתמיסת אנטוציאנינים, הם משפיעים על עוצמת הצבע ויציבות האנטוציאנינים (Maccarone et al., 1985, 1987; Mazza and Brouillard, 1990).

מחקרים קודמים הראו שהיצירה של קומפלקסים קופיגמנטיים בין אנטוציאנינים וקופקטורים פוליפנוליים שהוספו היוו הגנה מפני פירוק של אנטוציאנינים גם במערכות מודל וגם במיצים (Del Pozo-Insfran et al., 2006). בעבודתם של Miniati וחבריו (1992) נמצא שמבנה הקופיגמנט והטמפרטורה עשויים להשפיע על יציבות האנטוציאנינים. חומצה גאלית ייצבה את הצבע בשתי הטמפרטורה שנבדקו בניסויהם (5°C ו-20°C) קוורצטין הגביר את יציבות הצבע ב-5°C אבל הוריד אותו ב-20°C, וקטכין הוריד את יציבות הצבע בשתי טמפרטורות האחסון. Gutierrez (2003) גילה שעליה בריכוז האתנול מפחיתה את שיעור הקופיגמנטציה של אנטוציאנינים בתמיסות אתנוליות הנשמרות ב-pH קבוע ומשחררת יותר קטיונים של פלביליום. נמצא שפירוק של מלבידין 3-גלוקוזיד בתמיסות מודל אתנוליות המחקות יין או ליקרים ביישון (*aging*) או באחסון לטווח ארוך מואץ עם העליה בריכוז האתנול. Tseng (2006) הציע שהירידה ביציבות האנטוציאנין עם עליית ריכוז האתנול היא תוצאה של ירידה בשיעור אסוציאציה עצמית בתמיסה.

במחקר שנעשה במעבדתנו הצליחו לייצב את פיגמנט האנטוציאנין בפרחי אסטר. בעבודה זו הפרחים טופלו באופן דומה בתמיסת מלחי מגנזיום ונראתה עליה בכ-80% בריכוז האנטוציאנין בפרחים המטופלים. בעבודה זו הראו כי טיפול המגנזיום אינו משפיע על סינתזת האנטוציאנין ובכך על העלייה בריכוזו. כנראה שהמגנזיום נקשר לפיגמנט והופך אותו יציב יותר (Shaked-Sachray et al., 2002).

פעילות מים: פעילות מים היא גורם נוסף המשפיע על יציבות האנטוציאנינים. Markakis וחבריו (1957) הבחינו שאנטוציאנינים היו יציבים יותר כאשר אוחסנו בצורה קריסטלית יבשה או על כרוםטוגרמת נייר יבש, מה שהביא להשערה שמים מעורבים בריאקציות איבוד הצבע. Garzon ו-Wrolstad (2001) השתמשו בגליצרול לוויסות רמת פעילות המים ובחנו את יציבותם של שלושה פיגמנטים הנמצאים בשימוש מסחרי נמצא כי קיים קשר ישיר בין יציבות הפיגמנטים ורמת פעילות המים.

פירוק אנזימטי

בנוסף על הגורמים שהוזכרו, אנטוציאנינים מועדים לפירוק גם ע"י אנזימים שונים. עדויות לפירוק אנזימטי נמצאו עד כה בעיקר במיצויים מימיים של פיגמנטים, ובמיצי פירות ובפירות במהלך אחסון. באוכמניות נעשתה עבודה מקיפה לבחינת התהליכים הגורמים לירידה משמעותית ברמת האנטוציאנינים במיצוי הפרי וכן לעליה בפיגמנטציה חומה במיצויים אלו. בעבודה שנעשתה במערכות מודל שהכילו את האנזים פוליפנול אוקסידאז ואנטוציאנינים מסויימים שבודדו מאוכמניות נמצא כי האנזים פוליפנול אוקסידאז מסוגל לפרק אנטוציאנינים (Kader et al., 1998; Kader et al., 1999). במחקרו של kader (2002) נחקרה מעורבות של פראוקסידאז בפירוק אנטוציאנינים במיץ אוכמניות. מיצוי האנזים מאוכמניות הראה פעילות חלשה של פירוק אנטוציאנינים, שהתגברה עם הוספת מי חמצן וחומצה כלורגנית. תוצאות אלו מציעות שאנטוציאנינים מחומצנים ע"י הכלורוגנוקוינונים הנוצרים מחימצון של

חומצה כלורגנית ע"י פראוקסידאז בנוכחות מי חמצן. פירוק האנטוציאנינים הוגבר גם כאשר הוסיפו מי חמצן למיץ אוכמניות מדולל.

בליצי נחקר רבות נושא החמת קליפת הפרי במהלך האחסון. ההחמה של קליפת פרי הליצי מתואמת עם הפירוק המהיר של פיגמנטים אנטוציאנינים אדומים (Jiang et al., 2004). Lin וחבריו (1988b) ו- Critchley ו-Underhill (1995) תיעדו עליה בפעילות פראוקסידאז במהלך החמת הפריקארפ. כמו כן קיימת עליה בפעילות פוליפנול אוקסידאז במהלך 48 שעות אחסון. Gong ו-Tian (2002) דווחו שפראוקסידאז שהופק מקליפת הפרי יכול לחמצן במהירות 4-מתילקטכול בנוכחות מי חמצן, מה שתומך במעורבות פראוקסידאז בהחמה אנזימטית של ליצי. עיכוב פעילות פראוקסידאז ופוליפנול אוקסידאז גרם לעיכוב ההחמה של קליפת הפרי (Jiang and Fu, 1999; Jiang et al., 1999; Jiang and Li, 2003). במחקרם של Zhang ו-Pang (2005) נמצא שפעילות פראוקסידאז בפריקארפ עלתה באופן עקבי עם החמת הקליפה במהלך אחסון הפרי, אבל היתה בקורלציה שלילית עם ריכוז אנטוציאנינים. למרות שפראוקסידאז לא יכול לחמצן ישירות אנטוציאנינים בליצי בנוכחות מי חמצן *in vitro*, ריכוז האנטוציאנינים ירד במהירות עם הוספת תמיסת *guaiacol*, מה שמרמז שפירוק האנטוציאנינים ע"י פראוקסידאז מראה מנגנון של תגובת חמצון מצומדת. בנוסף לכך, אנטוציאנינים, שנוצרו ע"י הידרוליזה של אנטוציאנין שהופק יכולים לשמש כסובסטרט של פראוקסידאז. כך, החמה אנזימטית של פרי הליצי הנגרמת ע"י פראוקסידאז עשויה לערב תגובת אנטוציאנאז-אנטוציאנין-פנולים- מי חמצן.

כדי שתהליך החמצון יתרחש, האנזים המחמצן (פראוקסידאז או פוליפנול אוקסידאז) חייב להיות נוכח באותה הרקמה ובאותו המדור התאי עם הסובסטרט והקו-סובסטרט (מי חמצן או חמצן) (Yoruk and Marshall, 2003). בדרך כלל בתאים בריאים, לא מזדקנים, האנזים והסובסטרט (ים) שלו מחולקים למדורים תאיים שונים או ברקמות שונות (אבל קרובות). לכן, ריאקציית החמצון מתרחשת רק לאחר שההזדקנות או עקות סביבתיות הפרו את סדר התא או הרקמה והרסו את המידור (הרס המחסומים הביולוגיים בין אנזים וסובסטרט) (Dehon et al., 2001; Yoruk and Marshall, 2003).

דוגמה למצב זה ניתן למצוא בעץ ה-*black walnut* שבו יצירת הצבע החום כהה של החלק הפנימי מתואמת עם נוכחות פראוקסידאז ופרואנטוציאנינים (Dehon et al., 2001; Dehon et al., 2002). אנזימים וסובסטרטים ממוקמים בתאים שונים ברקמות מעוצות חיות. לכן פראוקסידאז ופרואנטוציאנינים עשויים לעבור אינטראקציה כאשר הם משוחררים מסוגי התאים המיוחדים להם במהלך תהליך ההתעצות. בארבידופסיס, פיגמנטציה של קליפת הזרע החומה מתרחשת במהלך התייבשות הזרע, כאשר פרואנטוציאנינים מגיבים עם *TT10 laccase* בדפנות תאי ה-*testa* המתים (Pourcel et al., 2005). ידוע כי אנזימים ממשפחת הפראוקסידאזות מצויים בוקואולה (Andrews et al., 2002), ששם נמצאים גם האנטוציאנינים, אך אין תיעוד של חמצון אנטוציאנינים בתוך הוקואולה. יש גם מידע חדש על נוכחות אנזים ממשפחת הפוליפנול אוקסידאזות בוקואולה, אך נכון לעכשיו ידוע רק על מעורבותו בתהליך היצירה של אנטוציאנינים (Ono et al., 2006).

פוליפנולאוקסידאזות

מתוך קבוצת הפוליפנול אוקסידאזות ידועים שני אנזימים עיקריים המעורבים בפירוק פלבנואידים: catechol oxidase ו-1, laccase.

Laccases (LAC) - לקאזות הם קבוצת אנזימים הנקראים מחמצני נחושת כחולה שכוללים, בין היתר, אסקורבט אוקסידאז. אנזימים אלו הם גליקופרוטאינים שמזרזים את החמצון של סובסטראטים דיפנוליים בנוכחות חמצן מולקולרי (Ranocha et al., 1999; Mayer and Staples, 2002).

Catechol oxidases (COs) - קטכול אוקסידאז שייך לקבוצת אנזימים מתכתיים המזרזים את החמצון של O-diphenols ל-O-quinones המקבילים (פעילות קטכולאז או דיפנולאז). הם חלבונים קושרי נחושת גליקוזידיים המשתמשים בחמצן מולקולרי כקופקטור ובעלי שני אתרים קושרי נחושת. COs הם בד"כ אנזימים הממוקמים בפלסטידות (Chevalier et al., 1999) עם היוצא מן הכלל אאורוזידין סינטאז שהוא וקואולרי (Ono et al., 2006). מאמינים שרוב הלקטוזות הם חלבונים מופרשים (McCaig et al., 2005). המטרה של האנזימים האלו נקבעת ע"י N-terminal transit peptide, שלבסוף נחתך ע"י פרוטאז ומשחרר את החלבון הבוגר לאפופלסט. יחד עם לקאזות הם נמצאים גם באוקריוטים וגם בפרוקריוטים (Mayer and Staples, 2002; Claus, 2004; Marusek et al., 2006; Mayer, 2006; Riva, 2006).

פראוקסידאזות

רוב האנזימים ממשפחה זו מכילים קבוצת heme (Fe^{3+}) במרכזם. כאנזים מחמצן, פראוקסידאז מגיב תחילה עם פראוקסידאז נוסף על מנת לקבל תוצר ביניים שהוא מחמצן חזק יותר. תוצר ביניים זה מסוגל לחמצן מגוון תרכובות אורגניות או אי-אורגניות ההופכות לעיתים כתוצאה מכך לרדיקלים חופשיים.

פראוקסידאזות המכילות קבוצת heme מתחלקות לשלוש קבוצות: **קבוצה I** - פראוקסידאזות תוך תאיות הקשורות לפראוקסידאזות בקטריאליות (Jespersen et al., 1997) אנזימים מקבוצה זו שמשמשים באסקורבט כתורם אלקטרונים מועדף (Welinder and Gajhede, 1993).

איזואנזימים של פראוקסידאזות מקבוצה I ממוקמים בעיקר בכלורופלסטים (Asada, 1992, 1999; Niyogi, 1999), בציטוזול (Asada, 1992) ובפראוקסידאזומים (Yamaguchi et al., 1995; Ishikawa et al., 1998). התפקיד של פראוקסידאזות מקבוצה I הוא לטהר מי חמצן שנוצרים באברונים אלו (Asada, 1999; Niyogi, 1999). **קבוצה II** - פראוקסידאזות מופרשות הנמצאות רק בפטריות. (Duroux and Welinder, 2003). **קבוצה III** - פראוקסידאזות השייכות למסלול ההפרשה ומשתמשות בפנולים כתורם אלקטרונים. פראוקסידאזות מקבוצה III מופרשות לאפופלסט לאחר

גליקוליזה (Passardi et al., 2004) וממוקמות בוקואולה ובאפופלסט (Thomas and Jen, 1980; Barcelo et al., 1991; McDougall, 1991, 1992; Takahama, 1992; Takahama and Oniki, 1992; Takahama, 1993; Otter and Polle, 1994, 1997; Andrews et al., 2002).

ידוע כי פראוקסידאזות צמחיות השייכות לקבוצה III ממלאות מגוון תפקידים שכוללים ליגניפיקציה, שיעום וקטבוליזם של אוקסין (Hiraga et al., 2001). גנים המקודדים לפראוקסידאזות מגיבים גם לסיגנלים הקשורים לעקות ביוטיות או אביוטיות. קיימים איזואנזימים רבים של פראוקסידאזות מקבוצה III בעלי דפוסי ביטוי שונים. מחקר שנערך לאחרונה על 21 פראוקסידאזות באורז הראה שונות בדפוסי הביטוי בין הזנים שנחקרו, בעיקר בתגובה לגירויים מעוררי עקות (Hiraga et al., 2000). לאחרונה, הושג פרופיל ביטוי המייצג תעתיקים של 30 פראוקסידאזות ע"י PCR וזה הראה שמספר גדול מהפראוקסידאזות מתבטאות בשורש (Welinder et al., 2002). הראו גם שחלק מהגנים מתבטאים בכל האיברים שנחקרו וששני גנים דומים מאוד הראו רמות או דפוסי ביטוי שונים, מה שאישר תצפיות קודמות במיני צמחים אחרים (Hiraga et al., 2000). במחקרם של Welinder וחבריו (2002) התגלה כי רק פראוקסידאזות שונות (<70% זהות ברצף חומצות האמינו) התבטאו יחד באיברים שונים של ארבידופסיס. השונות המבנית הזו התפרשה כאינדקציה לשונות פונקציונאלית בין הפראוקסידאזות הפועלות במקביל.

פירוק IN VIVO

הידע המצוי כיום על תהליכי הפרוק של אנטוציאנינים in vivo הוא מועט. ישנן מספר עבודות העוסקות בסנתזה ודגרדציה ברקמות צמחיות חיות. בעבודות אלו עקבו אחר קצב הפרוק על ידי עיכוב פעולת האנזים PAL, אנזים מפתח במסלול יצירת האנטוציאנינים. מעכב PAL, (AOPP) Aminoxyphenylpropionic acid, הראה עיכוב ספציפי של סינתזת אנטוציאנינים בפרחי פטוניה ובתרביות רקמה של גזר, מבלי לפגוע בצימוח. בתרביות גזר, רמת האנטוציאנין בקווי התאים השונים נשארה קבועה במשך שמונה ימים ממתן המעכב. יציבות האנטוציאנין העידה כי בתנאים אלו אין בכלל פרוק אנטוציאנין בשתי התרביות (Dougall and Vogeliën, 1987). בעבודה דומה על פרחי פטוניה נמצא שאין פרוק בשלב סינתזת הפיגמנטים בניצני הפרחים, אלא רק בשלב הפרח הבוגר. גם בשלב הבוגר רמת הפרוק היתה נמוכה מאד (Jonsson et al., 1984). בשתי העבודות המוזכרות לא נבחנו תנאי סביבה שונים כמו טמפרטורות גבוהות שעשויים להשפיע על קצב פרוק האנטוציאנינים.

בעבודה שנעשתה במעבדתנו על צמח הקוקופלם (*Chrysobalanus icaco*) ניסו לבדוק את השפעת הטמפרטורה וקרירת ה-UV על הפיגמנטציה של אנטוציאנין בנוכחות מלחי מגנזיום. בעבודה זו נראה כי ככל שהטמפרטורה עולה ישנה עליה בריכוז הכלורופיל וירידה בריכוז האנטוציאנין בעלים. הירידה בריכוז האנטוציאנין בשלבים הראשונים של התפתחות העלים היא כתוצאה ממהול הפיגמנט בסביבה המימית בווקואולה. עם התבגרות העלים הירידה בריכוז הפיגמנט הייתה כתוצאה מפירוקו. בניסיון לעכב

את פירוק האנטוציאנין בעלים מתבגרים טופלו צמחי הקופלם בתמיסת מלחי מגנזיום. טיפול זה הביא להכפלת כמותו של האנטוציאנין בעלים המטופלים לעומת עלים לא מטופלים. עלים ללא טיפול הראו ירידה בריכוז האנטוציאן כתוצאה מפירוק (Nissim-Levi et al., 2003).

במחקר שעסק בבהשפעת טמפרטורות גבוהות על פירוק אנטוציאנינים בענבים, חצאי ענבים ירוקים גודלו על נייר פילטר עם תמיסת L-[1- C^{13}]-phenylalanine למשך שבועיים (Mori et al., 2007). לאחר מכן נבדקו השינויים באנטוציאנינים המסומנים ב- C^{13} תחת תנאי טמפרטורה שונים ($15^{\circ}C$, $25^{\circ}C$, $35^{\circ}C$). בענבים שגודלו ב- $35^{\circ}C$ תכולת האנטוציאנינים המסומנים שיוצרו לפני החשיפה לטמפרטורה גבוהות ירדה משמעותית בהשוואה לענבים שגודלו ב- $15^{\circ}C$ ו- $25^{\circ}C$. ניסוי זה מוכיח שקיים פירוק אנטוציאנינים בקליפות ענבים עקב טמפרטורה גבוהות. בנוסף ניסוי ה- C^{13} tracer הראה שאנטוציאנינים שעברו אצילציה, במיוחד מלבידין 3- גלוקוזיד p-קומאראט, היו יציבים יותר בטמפרטורה גבוהות. תוצאה זו מראה שיציבות האנטוציאנינים כתלות במבנה הפיגמנט חשובה בקליפת הענב כמו בין או במיצים.

צמח הברונפלסיה

בעבודה זו בחרנו בצמח הברונפלסיה כצמח מודל. צמח הברונפלסיה ממשפחת הסולניים הוא סוג של שיח. הסוג מכיל כ-40 מינים ומקורו מאגן האמזונס. שיחים אלו מגיעים לגובה של 3 מטר וידועים ביציבותם הפריחה שלהם. ריבוי הצמח בתרבות נעשה ע"י יחורים. ניתן להשרות פריחה בצמח ע"י גידול בטמפרטורות נמוכות ($9^{\circ}C$ - $12^{\circ}C$) למשך חודש, ככל שטמפרטורת הגידול גבוהה יותר, הזמן הדרוש להשראת פריחה יתארך (Zimmer, 2000). ילידים במחוזות העליונים של האמזונס משתמשים במיציבים מימיים מהשורשים או הקליפה של *Brunfelsia grandiflora* כתרופות משלשלות, וכן כנגד שיגרונן ודלקת פרקים, חום והכשות נחשים, כסם נרקוטי ובמינונים גבוהים יותר כרעל לדגים (Schultes, 1971; Schultes and Holmsted, B, 1969; 1966).

מספר מינים תורבתו. *Brunfelsia pauciflora* (Cham. et Schlechtend.) Benth, והזנים הקרובים לה, ו-*Brunfelsia australis* Benth (Paraguay jasmin). פרחי הברונפלסיה ידועים בשם "Yesterday-Today- Tomorrow" שם זה ניתן להם עקב השינוי המהיר בצבע הפרחים מסגול כהה (אתמול), לוונדר (היום) ודהיה ללבן (מחר) (Heide, 1963; Halevy, 1985; Brenzel, 2001). כמו כן הבחנו שרקמת הפרח ממשיכה לגדול בימים שלאחר פתיחת הפרח. בגלל העלמות הצבע המהירה נבחר צמח זה לשמש במחקרנו כצמח מודל לחקר פירוק אנטוציאנינים אקטיבי *in vivo*.

במחקר קודם שנערך במעבדתנו הוצג תיאור ראשוני של מערכת פירוק אקטיבי *in planta* הדורשת יצירת mRNA וסינתזת חלבונים (Vaknin et al., 2005). למיטב ידיעתנו, זו הפעם הראשונה שפירוק אנטוציאנינים נחקר בצמח השלם. פרחים מנותקים גודלו בנוזל הגידול אליו הוספו מעכבי סינתזת חלבונים (ציקלוקסמיד, אניזומיצין) ומעכב שעתוק mRNA (אקטינומיצין D). טיפול במעכבים אלו

במהלך שלבי התפתחות ספציפיים בפרח הביאו לעיכוב בירידת ריכוז האנטוציאנינים בפרחים. ציקלוהקסמיד לדוגמא מנע את פירוק האנטוציאנין בהינתנו עד יום לאחר פתיחת הפרח. תוצאה זו מראה כי ישנו צורך ביצירת חלבון חדש לשם פרוק האנטוציאנין בפרח, חלבון המסונתז במהלך של יומיים מרגע פתיחת הפרח. לאחר יומיים מרגע פתיחת הפרח עיכוב סינתזת חלבונים חדשים בפרח לא מנעה את פירוק האנטוציאנינים. בנוסף לכך נמצא כי כאשר ניתן ציטוקנין לפרחים מנותקים עוכב תהליך ההזדקנות אך לא עוכב תהליך פירוק האנטוציאנינים. תוצאה זו מראה כי תהליך פירוק האנטוציאנינים בפרחים אלו אינו חלק מתהליך ההזדקנות העובר על הפרחים כי אם מסלול מופרד וייחודי.

בעבודה זו התמקדנו במעורבות אנזימים ממשפחת הפראוקסידאזות בפירוק אקטיבי של אנטוציאנינים בפרח הברונפלסיה. חקרנו פעילות אנזימים ממשפחת הפראוקסידאזות בפרח הברונפלסיה וביטוי גנים לפראוקסידאז בפרח הברונפלסיה. על מנת לבחון בעתיד את תפקידם של פראוקסידאזות ואנזימים אחרים בצמח הברונפלסיה התחלנו בפיתוח מערכות טרנספורמציה לבחינת ביטוי חולף של גנים, ורגנרציה לבחינת פעילות הגן בצמחים מותמרים.

2. שיטות וחומרים

2.1 חומר צמחי

הניסויים נערכו בצמחי ברונפליסיה *Brunfelsia calycina* ממשפחת הסולניים. פרח הברונפליסיה נפתח כאשר כותרתו סגולה כהה ומלבין בהדרגה במהלך 3 ימים בממוצע מרגע פתיחת הפרח. במהלך זמן זה ניכר גם שינוי בגודל הפרח. מהיום הרביעי לאחר פתיחת הפרח, הפרח לבן לגמרי. סימני הזדקנות נראים כעבור 8 ימים בממוצע מרגע פתיחתו בתנאי טמפ' של $23/15^{\circ}\text{C}$ (יום/לילה, בהתאמה) בעודו על השיח. הפרח נובל לאחר 14 יום בממוצע מרגע פתיחתו על השיח. העבודה נעשתה על פרחים מנותקים שהוסרו מן הצמח ביום פתיחת הפרח (יום 0) והושמו בתמיסת גידול. ניצנים המוגדרים כימים 0.5- ו- 2- נקטפו היישר מן השיח.



איור 1: שלבי התפתחות של פרח הברונפליסיה (D=day).

2.2 תנאי הגידול

הצמחים נשתלו במצע טוף:כבול (80%:20%) בתנאי הגידול הנ"ל: לחות של 65% ודישון מסוג שפר 1 בהשקיה של פעם ביום. הצמחים גודלו בחדר בעל טמפרטורה של $12^{\circ}\text{C} / 20^{\circ}\text{C}$ בתנאי הארה של יום ארוך: 10 שעות הארה פוטוסינתטית ותוספת תאורה של עוד 4 שעות. תוספת הארה סופקה ע"י נורות להט רגילות של בעוצמה של 100 W.

2.2.1 אינדוקציה לפריחה

לשם קבלת אינדוקציה לפריחה במשך כל השנה, הצמחים גודלו בפייטורון, לאחר גיזום גבוה על מנת לעודד פריצה של מריסטמות תחתונות, בטמפרטורה של $9^{\circ}\text{C} / 17^{\circ}\text{C}$ יום/לילה בהתאמה, בתנאי יום קצר (10 שעות אור) למשך כ-9 שבועות.

הצמחים הושקו כשלוש פעמים בשבוע בממוצע ופעם בשלושה שבועות ניתן להם ברזל (סקווסטרן, כפית אבקה ב-10 ליטר מים). לאחר שנצפו פקעי פריחה בגודל 3-4 mm בממוצע בכיסוי רחב בצמח, הצמחים הועברו לחדר בעל טמפרטורה של $12^{\circ}\text{C} / 20^{\circ}\text{C}$ בתנאי יום ארוך (14 שעות אור).

2.2.2 גידול פרחים מנותקים (in vitro)

פרחי ברונפלסיה נקטפו מהשיח ביום 0 (יום האנטזיס). הפרחים הוצבו במבחנות אפנדורף המכילות תמיסת גידול המורכבת מ: TOG 6 (Sodium dichloroisocyanurate) 50 ppm ו 2% סוכרוז ב- pH 5.5-6, כאשר עוקץ הפרח טובל בתמיסה. הפרחים הוצבו בסביבה לחה בפיטוטרון בטמפרטורה של 12°C /20°C (יום/לילה) בעגלה מכוסה רשת צל 40%.

2.3 בדיקת פעילות פראוקסידאז ע"ג ג'ל פעילות

2.3.1 מיצוי חלבונים כללי

מיצוי פראוקסידאז פעיל נעשה לפי Andrews וחובריו (2000). 0.6 g רקמה טרייה של עלי כותרת נכתשה בחנקן נוזלי. לאחר הכתישה הוספו 2ml בופר מיצוי המורכב מ: 6 pH Na acetate 10mM. הנוזל הועבר לצנטריפוגה (Sorvall, דגם RC-5B) מקוררת ל- 4°C במשך 18 דקות במהירות של 14,000 rpm. הנוזל העליון נשפה למבחנה ונשמר בקרח. בדיקה כמותית של החלבון נעשתה ע"י קיט "protein assay" של חברת Bio-Rad המבוסס על שיטת Bradford.

2.3.2 ג'ל הפעילות

בדיקת פעילות פראוקסידאז נעשה על בסיס השיטה המתוארת בעבודתם של Andrews וחובריו (2000). למיצוי החלבונים המסיסים הוסף בופר הטענה ביחס של 1:6 המכיל : 70% Tris 0.5M pH 6.8, 30% גליצרול ו-0.0012 g/ml ברומופנוול כחול, ללא SDS ו-DTT. המיצוי הורץ על SDS-PAGE gel (10% אקרילאמיד) למשך כשעה וחצי במתקן "mini-Protein II" (Bio-Rad) electrophoresis cell, בתוך בופר הרצה המכיל Tris 15g/L, Glycine 72 g/L ו- SDS 5g/L. במתח של 150V ובטמפרטורה של 4°C. הסובסטרט לפעילות הפראוקסידאז היה 4-כלורו-1-נפטול בריכוז של 15 mg/ml. הסובסטרט הומס בתמיסה המכילה 40% מים ו-60% מתנול. ההמסה הראשונית באמצעות מתנול והיתרה עם מים מזוקקים.

בסיום ההרצה הג'ל טולטל במים במשך כ-15 דקות. שטיפה שנייה בבופר ריאקציה המכיל 100mM Na acetate pH 6 בנפח 50 ml למשך 15 דקות. לאחר מכן הוספו לתמיסה 3 ml סובסטרט וכן מי חמצן מהולים 1:100. לאחר כ-10 דקות בתמיסת הסובסטרט הג'ל הועבר למים למשך כ-15 דקות לשם עצירת הריאקציה.

2.3.3 ג'ל חלבונים

מיצויי החלבונים המסיסים הורתחו בבופר הטענה המכיל 70% Tris 0.5M pH 6.8, 30% גליצרול ו- 0.0012 g/ml ברומופנוול כחול ו- SDS 0.016 g/ml ו- DTT 0.0155 g/ml למשך 5 דקות ב-100°C

והורצו על ג'ל SDS-PAGE (10% אקרילאמיד) למשך כשעה וחצי במתקן "mini-Protein II (Bio-Rad) electrophoresis cell", במתח של 150V ובטמפרטורה של 4°C. בסיום ההרצה הונח הג'ל בתמיסת צביעה המכילה 45% מתנול, 45% מים ו-10% חומצה אצטית ו-0.1mg Coomassie Brilliant Blue-R למשך הלילה. למחרת הונח הג'ל בתמיסת שטיפה 1 המכילה 45% מתנול, 45% מים ו-10% חומצה אצטית, עד שרוב הצבע נשטף. בשלב האחרון הג'ל הועבר לתמיסת שטיפה שנייה המכילה 10% מתנול, 80% מים ו-10% חומצה אצטית עד לשטיפת שארית הצבע מן הג'ל.

2.4 ניקוי חלבון הפראוקסידאז על קולונות

מיצוי חלבונים כללי (לפי סעיף 2.3.1) נשלח לחברת "רימון ביוטק" לניקוי והפרדה על קולונות. קולונת ג'ל פילטריציה:

הקולונה מסוג Superdex 75, טווח ההפרדה של הקולונה: 30,000-70,000 kDa, בופר ההרצה היה PBS pH 7.5. קצב הזרימה בקולונה הוא 1ml לדקה.

קולונת החלפת יונים:

הקולונה מסוג SP Sepharose™ Fast Flow (strong cation). הבופרים ששימשו להרצה היו MES buffer, 50 mM pH 6 1 M NaCl. קצב הזרימה בקולונה הוא 1ml לדקה.

פרופיל ריכוז החלבון נקבע ע"י בדיקת בליעה ב-280nm. פרופיל פעילות הפראוקסידאזות נבדקה באמצעות הסובסטר TMB (3, 3', 5, 5' tetramethyl benzidin). דגימה מכל פרקציה הושמה בבארית ואליה הוסף הסובסטר. הפרקציות בהן הופעת הצבע הייתה כמעט מיידית הובאו למעבדתנו והורצו על ג'ל SDS-PAGE (10% אקרילאמיד) לבדיקת פעילות החלבון. במקביל הפרקציות רוכזו והורצו על ג'ל SDS-PAGE (10% אקרילאמיד) ונצבעו ב-Coomassie Brilliant Blue-R. הבנדים הצבועים נחתכו מן הג'ל ונשלחו לאנליזת MS במעבדת שירות בהנהלת עופרה מושל בהדסה עין כרם.

2.4.1 אנליזת MS

אנליזת ה-MS התבצעה ביחידת הציוד הבין מחלקתי, בבית הספר לרפואה של האוניברסיטה העברית. החלבון נחתך עם טריפסין לפי Shevchenko et al. (1996). אנליזה של המקטעים התבצעה ע"י LC-MS/MS (liquid chromatography-tandem mass-spectrometry) על ספקטרוטר מאסות QTOF (Micromass, אנגליה) עם מקור יונים nano-ESI (electro-spray ionization) מקוון המחובר למערכת Waters CapLC. הספקטרום עובד ע"י תוכנת MassLynx והועבר לשרת Mascot לצורך זיהוי החלבון.

כיוון שאין מידע על גנים או חלבונים של ברונפליסה, זיהוי החלבונים התבסס על חיפושים הומולוגיים במאגרי המידע הכלליים. המידע שהושג משרת ה-Mascot הושווה למאגרים הכלליים של Swiss-prot ו-TrEMBL דרך סט הכלים הפרוטאומי של Expasy (<http://us.expasy.org/sprot/>)

2.5 הפקת RNA

הפקת ה-RNA נעשתה ע"י הקיט RNeasy Midi (Qiagen), על פי פרוטוקול הוראות היצרן המיועד לצמחים. קביעת ריכוז ה-RNA נעשתה בעזרת מכשיר Nano Drop (תוצרת Nano Drop).

2.6 בידוד גן הפראוקסידאז באמצעות PCR

2.6.1 תכנון תחלים

לשם בידוד הגן לפראוקסידאז תוכננו שני תחלים מאזורים שמורים לפראוקסידאזות על פי השוואת רצפי DNA של פרקורסרים לפראוקסידאז מצמחים ממשפחת הסולניים: תפוח אדמה: [TC126825](#) [TC126756](#), עגבניה: [TC154224](#), [TC164601](#), [TC156173](#). הרצפים נלקחו ממאגר המידע Tigr (<http://www.tigr.org>). נלקחו רק גנים שלמעלה מ-90% מהם רוצפו. לאחר התכנון, המצאות הרצפים מהם תוכננו התחלים נבדקה גם ברצפי גנים של פראוקסידאז מדרגה III בצמחים ממשפחות אחרות: *Vitis vinifera* [NP842538](#), *Maize (Zea mays)* [TC288744](#), *Arabidopsis thaliana* [NP966606](#), *Aquilegia* [TC12409](#). התחלים שתוכננו הם: 5'-atgcatttccatgattgcttt-5', 5'-acaatcagcacaagagacaact-5' והם תוחמים רצף של כ-200 bp באזור המקודד. התחלים (DNA) הוכנו ע"י חברת סינתזה.

2.6.2 הכנת cDNA

במבחנה סטרילית הושמו 2-3 µg RNA שהופק מפרחים ביום 1 (ראה סעיף 2.1) והוסף פריימר הקסמר רנדומלי (5µg/ml). הריאקציה עברה אינקובציה למשך 5 דקות ב-65°C ובסיומה המבחנה הועברה מייד לקרח. למבחנה הוספו 1µL RNase Inhibitor (Fermentas), 4µL MMLV buffer, 2µL dNTP בריכוז של 2mM, 1µL DTT בריכוז 1M, 1µL MMLV-RT (Promega) והנפח הושלם ל-21 µL עם DDW. הריאקציה עברה אינקובציה לשעה נוספת ב-37°C. עם סיום התהליך ה-cDNA אוחסן ב-20°C.

איכות יצירת ה-cDNA נבדקה על ידי הגברה ב-PCR עם זוג הפריימרים שתוכנן כמתואר בהמשך.

2.6.3 ריאקציה PCR

ריאקציות ההגברה, בנפח של 25µl הכילו: 1 µl של cDNA, 200µM dNTPs, 10pmoles מכל אחד מהתחלים, 2µL X10 buffer, DNA פולימראז. הנפח הושלם ל-25 µL עם DDW. במבחנת ביקורת הושמו המרכיבים הנ"ל ללא תבנית.

מכשיר PCR (masterycler personal, Eppendorf) שימש בניסויים אלה, וההגברה בוצעה לשיבוט והגברת מקטעים למטרות ריצוף במחזורי הטמפרטורה המנויים הנ"ל:

שלב 1: 95°C במשך 3 דקות; שלב 2: 93°C במשך 30 שניות; שלב 3: $50-60^{\circ}\text{C}$ במשך 30 שניות (הטמפרטורה תלויה בגודל והרכב התחל); שלב 4: 70°C במשך 30-60 שניות (הזמן תלוי בגודל תוצר ה-PCR); שלב 5: חזרה על שלבים 2 עד 4, 35 פעמים; שלב 6: 72°C במשך 5 דקות. שלב 7: קירור תמיסת הראקציה ל- 4°C .

תוצרי ראקציות ה-PCR הורצו על גבי ג'ל אגרוז 1% וזוהו על ידי צביעה ב-EtBr (Ethidium Bromide מתוצרת Amresco, Solon, Ohio, USA) כמפורט בסעיף 2.6.4.

2.6.4 הכנת ג'ל אגרוז

להכנת ג'ל אגרוז בריכוז של 2% הומס במיקרוגל 0.6 gr אגרוז (מתוצרת Invitrogen) ב-30 ml תמיסת TAE 1X (Tris-HCl, acetic acid, EDTA). הוסף $1\mu\text{l}$ EtBr בריכוז של 10 mg/ml. תוצרי ה-PCR הורצו על גבי הג'ל במכשיר אלקטרופורוזה במשך 30-40 דקות במתח של 70V, במכשיר הרצה של חברת "תמר" (דגם HU6).

2.6.5 הפקת DNA מג'ל אגרוז

הפקת DNA מג'ל אגרוז נעשתה באמצעות ערכת "QIAquick Gel Extraction" (QIAGEN), ע"פ הוראות היצרן.

2.7 ריבוי והפקת פלסמיד לריצוף

המקטע עבר ליגציה לפלסמיד pGEM-T Easy (Promega) לפי הפקוטוקול המצורף לקיט. הפלסמיד עבר טרנספורמציה לחיידקים אלקטרוקומפטנטים בעזרת מכשיר אלקטרופורציה (BioRad gene pulser). מייד לאחר העברת הזרם החשמלי הוסף 1 ml מצע LB טרי. החיידקים גודלו לשעה נוספת בטמפרטורה של 37°C ולאחר מכן נזרעו על צלחות LB + אנטיביוטיקה מסוג אמפיצילין בריכוז סופי של $1\mu\text{g/ml}$, שעליהן נמרחו לפני הזריעה $40\mu\text{l}$ IPTG (Fermentas) מומס במים סטריליים בריכוז 0.1M ו- $40\mu\text{l}$ XGAL (Fermentas) מומס ב-DMSO בריכוז סופי של 5%. הצלחות הושארו למשך הלילה בטמפרטורה של 37°C . חדירת המקטע לפלסמיד במושבות לבנות נבדקה על ידי הגברה ב-PCR עם זוג הפריימרים שתוכנן המתוארים בסעיף 2.6.1.

הפקת הפלסמיד נעשתה בעזרת קיט HiYield plasmid mini של חברת RBC BIOSCIENCE. הפלסמיד נשלח לריצוף ב"מעבדות חי".

Real-Time PCR 2.8

RNA הופק מפרחי ברונפלוסיה כמפורט בסעיף 2.5. cDNA נוצר על תבנית RNA זה כמפורט בסעיף 2.6.2.

ראקציות ה-Real-Time PCR נעשו באמצעות SYBER GREEN PCR Master Mix מתוצרת Applied Biosystems, Foster City, CA, USA. תהליך ההגברה ב- Real-Time PCR נעשה במחזורים הבאים:

שלב 1: 95°C במשך 15 דקות; שלב 2: 95°C במשך 15 שניות; שלב 3: 60°C במשך 60 שניות; שלב 5: חזרה על שלבים 2 ו-3, 40 פעמים.

גן הייחוס לריאקציות ה-Real-Time PCR היה 18S ריבוסומלי. האנליזה נעשתה באמצעות GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems,) והתוצאות עובדו בעזרת תוכנת GeneAmp 5700 SDS (Applied Biosystems). הביטוי היחסי של הגנים הנבחנים חושב בעזרת הנוסחה:

(גן הייחוס-CT- הגן הנבחן-CT)², כאשר הערך CT מייצג את מספר מעגלי ריאקציה ה-PCR בהם נמדדה כמות התוצר (על ידי מדידת הפלורסנציה) הגבוהה מרמת סף שנקבעה (Threshold).

2.9 תרביות רקמה

חיטוי החומר הצמחי:

העלים נשטפו במים וסבון ולאחר מכן הונחו בכלי תחת מים זורמים למשך שעה וחצי. העלים הושמו ב-70% אתנול למשך 5 דקות בערבול, לאחר מכן הונחו בתמיסה המכילה בנלט 1g/l ומרפן 1g/l בערבול למשך שעה ונשטפו במי ברז. השלבים הבאים התבצעו בסביבה סטרילית: הצמחים עורבלו 15 דקות בתמיסה המכילה 30% אקונומיקה ומספר טיפות של המשטה Tween 20. לאחר מכן נשטפו פעמיים במים מזוקקים פעמיים סטריליים.

העלים נחתכו לחתיכות בגודל 1x1 cm על גבי נייר סטרילי והונחו בצלחות פטרי בגודל 90x15 mm על גבי מצעי הרגנרציה המפורטים בטבלה 1.

הצלחות גודלו בטמפרטורה של 25 °C תחת תאורה של 1400 lux.

| מצע | סוכרוז | MS g/l | IAA mg/l | BA mg/l | זיאטין mg/l | NAA mg/l | קינטין mg/l | TDZ mg/l |
|----------|--------|--------|----------|---------|-------------|----------|-------------|----------|
| A | 3% | 4.4 | 0.5 | 1 | | | | |
| B | 3% | 4.4 | 0.5 | | | | | 1 |
| C | 3% | 4.4 | | 2 | | 0.5 | | |
| D | 2% | | | | 2 | | | |
| E | 3% | 4.4 | 0.1 | | 1 | | | |
| F | 3% | 4.4 | | 3 | | 1 | | |
| G | 3% | 4.4 | 0.8 | | 1 | | 2 | |

טבלה 1: הרכבי מצעי הרגנרציה שנבחנו בניסוי הראשון.

2.10 טרנספורמציה של אגרובקטריום לתאי הפרח

טרנספורמציה נעשתה בעזרת פלסמיד בינארי - pBIN GFP (עמידות לקנמיצין) עם אגרובקטריום מזן LBA4404.

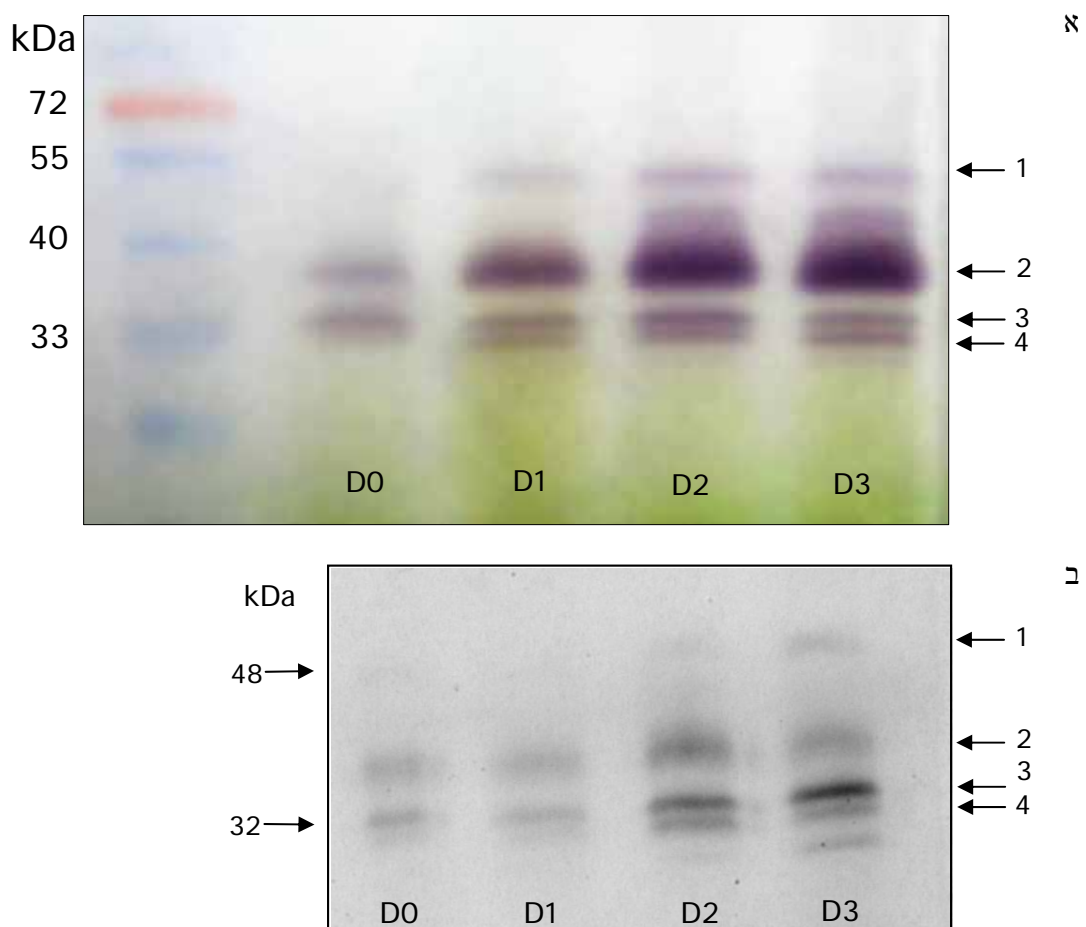
תאי אגרובקטריום המכילים את הפלסמיד הבינארי pBIN GFP גודלו ב-LB 20 ml (Dushefa) בבקבוקי ארלנמייר של 250 ml. המצע הכיל אנטיביוטיקה מסוג קנמיצין בריכוז של 50 ml/l ואציטוסרינגון (AS) בריכוז סופי של 100 μm. הבקבוקים כוסו בנייר כסף והושמו בטילטול ב 27°C למשך הלילה.

למחרת נלקחה דגימה למדידת O.D 600nm במכשיר ספקטרופוטומטר UV-2401 PC תוצרת Shimadzu. כאשר ה-OD של החיידקים הגיע ל-1.2-1.1 החיידקים סורכזו ל-10 דקות ב-3000 rpm והורחפו עד ל-0.5 OD בתמיסת MS (תמיסת ההדבקה) המכילה 4.4 g/l MS, וסוכרוז 30 g/l. הצמחים חוטאו ע"י השרייה למשך 10 דקות ב-0.5% אקונומיקה ולאחר מכן שטיפה במים סטריליים. ניצנים סגורים של פרחי ברונפלסיה הושרו בתמיסה המכילה חיידקי אגרובקטריום מזן EHA105 המכילים את הפלסמיד הבינארי - pBIN GFP למשך הלילה בטילטול. לאחר ההשריה הניצנים ננעצו במצע המכיל 2.2 g/l MS, סוכרוז 15 g/l MS. לאחר 48 שעות, לאחר פתיחת הפרח מועברים למצע עם אנטיביוטיקה מסוג כלפורן 500 mg/l ובבדקה נוכחות חלבון ה-GFP במהלך 5 הימים הבאים. נוכחות הגן המדווח GFP נבדקה בעזרת מיקרוסקופ קונפוקלי FLUOVIEW 500 מתוצרת Olympus IX 81 (Japan) המצויד בלייזר argon-ion 488nm. חלבון ה-GFP עורר באורך גל 488nm והפליטה נקלטה דרך פילטר BA 515-525. כמו כן נעשה שימוש בפילטר פליטה BA 660 IF autofluorescence. התמונות צולמו בעזרת Nomarski differential interference contrast (DIC).

3. תוצאות

3.1 פעילות איזואנזימים ממשפחת הפראוקסידאזות

נראה כי איזואנזים ממשפחת הפראוקסידאזות עשוי להיות מעורב בתהליך פירוק האנטוציאנינים בפרח הברונפלסיה. השערה זו מתבססת על העובדה שפעילותם של מספר איזואנזימים ממשפחת הפראוקסידאזות מתגברת ככל שהפרח מתבגר והצבע נעלם (איור 2 א). כמו כן בעבודה קודמת שהתבצעה במעבדתנו (Vaknin et al., 2005) הוכח כי מעכב סינתזת החלבונים ציקלוקסמיד השפיע על פירוק הצבע בפרח ועל פעילות כמה מהאיזואנזימים הפעילים בפרח הברונפלסיה (איור 2 ב).



איור 2: ג'ל פעילות פראוקסידאז בשלבים שונים של התפתחות הפרח.

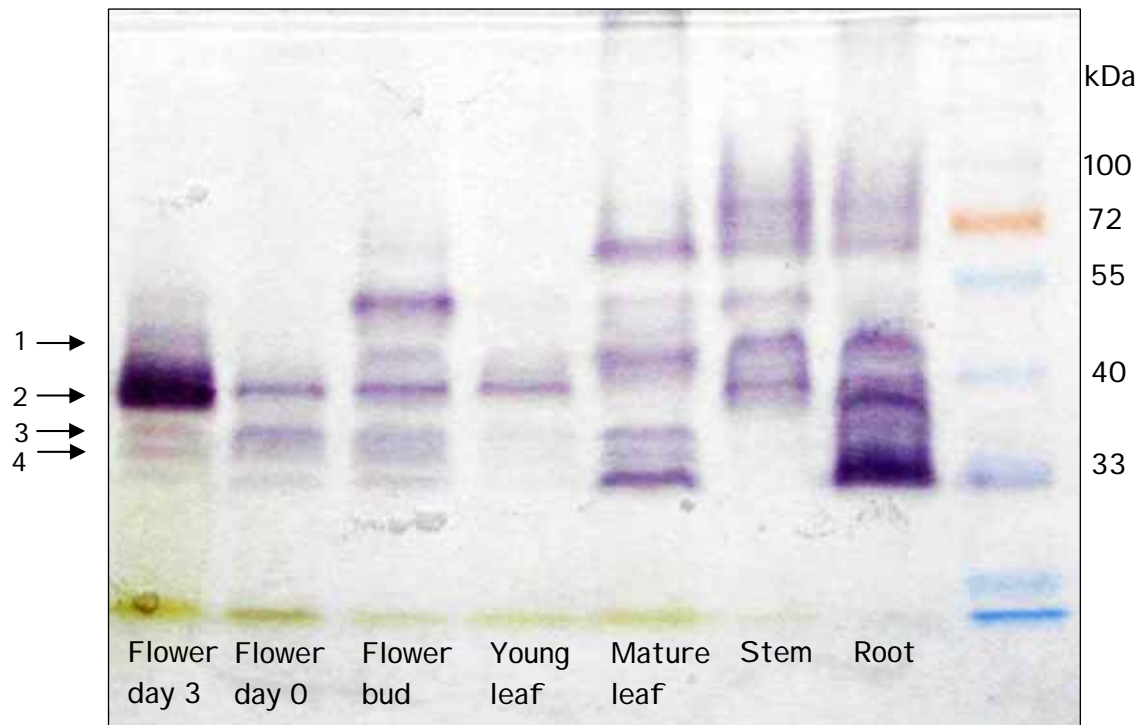
כמויות אחידות של מיצוי חלבונים מסיסים כללי הופרדו ע"י SDS PAGE 10% חצי נטיבי. דפוס פעילות האנזים התקבל ע"י בדיקת פעילותו על הג'ל בעזרת סובסטרט ספציפי (4-כלורו-1-נפטול). זהו יום פתיחת הפרח, שבו נותק הפרח מן הצמח והועבר לתמיסת סוכר. D1, 2, 3 - ימים לאחר פתיחת הפרח. א. ג'ל פעילות של חלבוני פראוקסידאז בשלבים שונים של התפתחות הפרח. ב. הפרחים נקטפו מהשיח בשלב האנטזיס (יום 0) והוצבו במבחנות אפנדורף המכילות את תמיסת הגידול בה השתמשנו במהלך כל הניסויים (6 TOG 40ppm ו-2% סוכרוז pH 5.5-6). לתמיסה זו הכילה בנוסף מעכב סינתזת חלבונים ציקלוקסמיד בריכוז 1mM.

אנו רואים עליה ניכרת בפעילות איזואנזימים מספר 2 ועליה פחות משמעותית בפעילות איזואנזימים מספר 1. עליה זו תואמת לשלבי העלמות הצבע מעלי הכותרת. פעילות האיזואנזימים מספר 3 ו-4 לא משתנה בצורה משמעותית. בפרחים אשר טופלו בציקלוהקסמיד ניתן לראות כי קיים עיכוב בפעילות איזואנזימים מספר 2, ולעומת זאת הגברה בפעילות האיזואנזימים מספר 3 שפעילותו קבועה במצב רגיל. איזואנזימים מספר 1 שפעילותו משתנה עם פירוק הצבע לא עוכב ע"י הציקלוהקסמיד. איזואנזימים מספר 4 שפעילותו מתחילה ביום 1 ונשארת קבועה בימים 2 ו-3 לא הושפע כמעט מהציקלוהקסמיד. תוצאות אלו מהוות בסיס לנסיונות לבידוד וזיהוי האיזואנזימים אשר יתוארו בהמשך.

3.2 אפיון פעילות איזואנזימים ממשפחת הפראוקסידאזות באברי הצמח השונים

ידוע כי קיימים מספר רב של איזואנזימים ממשפחת הפראוקסידאזות הפעילים בצמחים, אך בפרח ראינו רק מספר קטן שלהם. לכן נבדקה נוכחות איזואנזימים ממשפחת הפראוקסידאזות באיברי הצמח השונים כדי לבחון את הפעילות הדיפרנציאלית של איזואנזימים אלו באיברי הצמח השונים ובשלבי התפתחות הפרח השונים.

חלבונים מוצו מאיברים שונים של צמח הברונפליסיה: פרחים בשלבים שונים של התפתחות, עלים צעירים ובוגרים, גבעול ושורשים (איור 3). כמויות שוות של חלבון מכל איבר הורצו על ג'ל לבדיקת פעילות פראוקסידאז.



איור 3: ג'ל פעילות פראוקסידאז באברים שונים של צמח הברונפליסיה

כמויות אחידות של מיצוי חלבונים מסיסים כללי מאברי הצמח השונים הופרדו ע"י 10% SDS PAGE חצי נטיבי. דפוס פעילות האנזים התקבל ע"י בדיקת פעילותו על הג'ל בעזרת סובסטרט ספציפי (4-כלורו-1-נפטול).

ניתן לראות כי קיים ביטוי דיפרנציאלי ברקמות הצמח השונות ובשלבי ההתפתחות השונים של האיברים. נראה כי איזואנזים מספר 2 שפעילותו משתנה באופן הדרמטי ביותר עם פירוק הצבע בעלי הכותרת ומעוכבת ע"י ציקלוהקסמיד (איור 2 ב) לא מופיע בעלה בוגר, גבעול או שורש, אך מופיע בניצן סגור ובעלה צעיר.

איזואנזים מספר 1 משתנה עם התפתחות הפרח מופיע בפרח בשלב ההתפתחות המאוחר יותר (יום 3), אך לא מופיע ביום 0 (דפוס זה נראה גם באיור 2 א). איזואנזים זה לא מופיע באיברי הצמח האחרים ואף לא בניצן הפרח הסגור.

האיזואנזימים שפעילותם לא משתנה במהלך התפתחות הפרח ופירוק הצבע (מספר 3 ו-4) מופיעים בכל שלבי התפתחות הפרח ובעלה בוגר, פעילותם כמעט ולא קיימת בעלה צעיר. בשורש קיימים איזואנזימים רבים במשקלים מולקולריים הדומים לאיזואנזימים המדוברים, כך שלא ניתן לקבוע האם איזואנזימים מסויימים אלו פעילים בשורש.

נתונים אלו מחזקים את האפשרות כי לפחות חלק מהאיזואנזימים הפעילים בשלבי ההתפתחות השונים של פרח הברונפליסיה פעילים בתהליך פירוק האנטוציאנינים.

3.3 ניקוי, הפרדת וזיהוי אנזים הפראוקסידאז

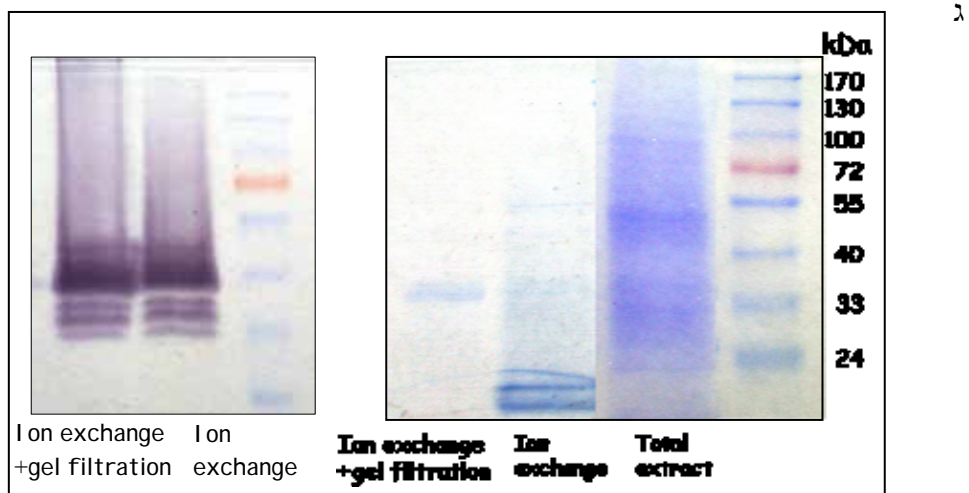
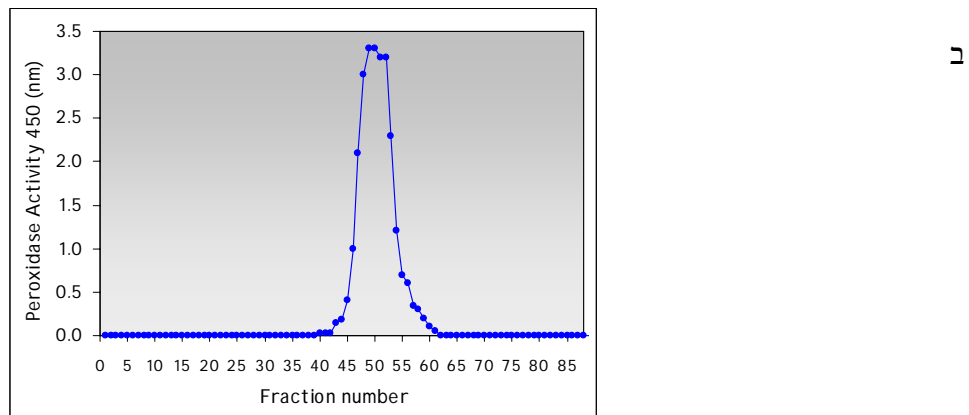
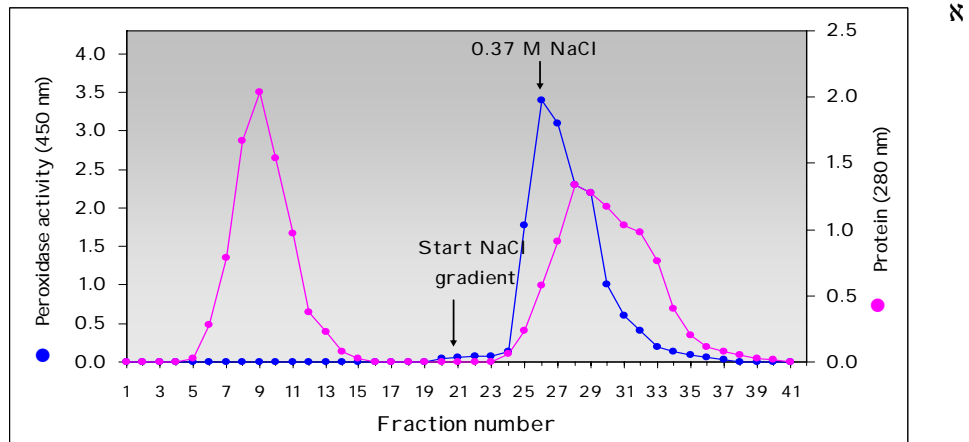
3.3.1 נסיון בידוד ואיפיון האיזואנזימים השונים בעזרת ג'ל פעילות

נעשו ניסיונות לזיהוי את האיזואנזימים אשר חשודים כקשורים לתהליך הפירוק על פי שינוי דפוס פעילותם עם התפתחות הפרח (איורים 2, 3), ע"י הרצת מיצוי חלבונים מסיסים משלב התפתחות יום 2 על ג'ל פעילות גדול, חיתוך הפיסות מג'ל הפעילות בהן מופיעים איזואנזימים אלו ושליחתם לזיהוי בעזרת MS. התוצאות הראו חלבונים רבים אך לא היה ביניהם אף חבר למשפחת הפראוקסידאזות. מכאן ניתן להסיק כי בפיסה זו מצויים חלבונים רבים בעלי משקל מולקולרי זהה לחלבון אותו אני מבקשים לזהות, ונראה כי למרות פעילותו החזקה, חלבון זה מצוי בפרח בכמות קטנה מאוד. לכן הוחלט לשלוח מיצוי חלבונים מסיסים כללי לחברת "רימון ביוטק" להפרדה בשיטות ביוכימיות על קולונות החלפת קטיונים וג'ל פילטרציה.

3.3.2 ניקוי החלבון ע"ג קולונות

לחברת "רימון ביוטק" נשלח 70 מ"ל מיצוי חלבונים מסיסים כללי בריכוז של $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ מפרחים בשלב ההתפתחות בו פעילות האנזים מוגברת יחסית לשלבי ההתפתחות הקודמים (יום 2). המיצוי הופרד באמצעות קולונת החלפת קטיונים SP Sepharose™ Fast Flow. הפרקציות בהן נראתה פעילות אנזימטית של פראוקסידאז נאספו והופרדו פעם נוספת ע"י קולונת ג'ל פילטרציה Superdex 75 בעלת טווח הפרדה של 30,000-70,000 kDa. הפרקציות בהן נראתה פעילות פראוקסידאז לאחר המעבר בקולונה זו רוכזו בעזרת vivaspin 6 (Vivascience). איורים 4 א, ב מציגים את תוצאות הניקוי כפי

שהתקבלו מחברת "רימון ביוטק", איור 4 ג מציג תוצאות הרצת פרקציות חלבון בדרגות ניקוי שונות על גל פעילות חצי נטיבי וג'ל דנטורטיבי.



איור 4: הפרדת מיצוי חלבונים כללי על קולונת החלפת יונים וג'ל פילטרציה.

א. רמת בליעת אור ב-280nm ורמות פעילות פראוקסידאז של הפרקציות השונות לאחר ניקוי בקולונת החלפת יונים. ב. רמות פעילות פראוקסידאז של הפרקציות השונות לאחר הרצת הפרקציות בעלות הפעילות המשמעותית ביותר (איור 2 א ב) מקולונת החלפת יונים בקולונת ג'ל פילטרציה. לא נראתה בליעת חלבונים ב-280nm. ג. הרצת הניקויים השונים על SDS-PAGE gel דנטורטיבי וצביעה בקומסי (מימין) וחצי נטיבי עם בדיקת פעילות (משמאל).

באיור 4 א ניתן לראות את פעילות חלבון הפראוקסידאז ע"י מדידת הסובסטרט TMB ואת ריכוז החלבון כפי שנקבע ע"י מדידת בליעת אור באורך גל של 280nm. לאחר ההפרדה על קולונת החלפת היונים ניתן לראות בבירור שני פיקים של חלבונים כאשר רק באחד מהם החלבונים קיימת פעילות פראוקסידאז. כדי לקבל העשרה נוספת של פראוקסידאז נלקחו הפרקציות בהן נראתה פעילות האנזים והורצו שוב על קולונת ג'ל פילטרציה. תוצאות הרצה זו ניתן לראות באיור 4 ב. באיור זה ניתן לראות שיא בפעילות פראוקסידאזות בפרקציות שעברו דרך שתי הקולונות, אך כמות החלבון בפרקציות אלו לא ניתנת לכימות ע"י מדידת בליעת אור באורך גל של 280nm. פרקציות אלו רוכזו פי 10 ע"י vivaspin 6 (Vivascience) והורצו על ג'ל SDS-PAGE (איור 4 ג).

השוואת הרצות החלבונים על הג'ל הדנטורטיבי הצבוע בקומסי מראה שהיתה העשרה וניקוי של חלבון מסויים ע"י שתי הקולונות. הרצת הפרקציות לאחר שלבי הניקוי השונים בג'ל חצי נטיבי ובדיקת פעילות פראוקסידאז מראה כי חלבון זה הוא אכן בעל פעילות של פראוקסידאז. בג'ל הפעילות ניתן להבחין במספר איזואנזימים כאשר האיזואנזים בעל הפעילות החזקה ביותר תואם במשקלו המולקולרי לאיזואנזים מספר 2 הנחשד במעורבות המשמעותית ביותר בתהליך פירוק האנטוציאנינים לפי איור 2 ו-3. שלושת האיזואנזימים האחרים תואמים במשקלם המולקולרי לאיזואנזימים מקבוצה מספר 3 שפעולתם נותרה קבועה בשלבים השונים של התפתחות הפרח. איזואנזימים אלו לא מופיעים בג'ל הצבוע בקומסי ולכן קיימת האפשרות כי למרות שפעילותם ניתנת לזיהוי, הם נמצאים בכמות קטנה בפרקציה שעברה ניקוי ע"י שתי הקולונות.

בג'ל הצבוע בקומסי ניתן להבחין בבנד יחיד אשר אינו תואם במשקלו המולקולרי לאיזואנזים בעל הפעילות החזקה ביותר. יתכן כי ניתן לייחס הבדל זה במרחק הריצה בג'ל להבדלים בין הג'לים ולאפשרות שאנזים הנמצא במצב חצי נטיבי ינוע בצורה אחרת מאנזים בעל משקל מולקולרי זהה המצוי במצב דנטורטיבי. יתכן גם כי הבנד שנראה בג'ל הצבוע בקומסי אינו תואם לחלבון בעל הפעילות החזקה ביותר אלא דוקא לאחד מהאיזואנזימים האחרים שמשקלם המולקולרי קטן יותר. יתכן כי למרות שפעילותם חלשה יותר כמותם בפרח גדולה יותר.

3.3.3 אנליזת LC-MS-MS

הפרקציות בהן נראתה הפעילות החזקה ביותר רוכזו ונשלחו לאנליזת LC-MS-MS במעבדת שירות בהנהלת עופרה מושל בהדסה עין כרם (ראה פרק שיטות וחומרים סעיף 2.4.1). החלבון נשלח לאנליזה על מנת לזהות את חומצות האמינו מהן מורכב החלבון וע"י כך לזהות את רצף בסיסי ה-DNA ובהמשך המחקר לזהות את הגן האחראי לפירוק אנטוציאנינים.

כיוון שאין מידע על גנים או חלבונים של ברונפליסיה, זיהוי החלבונים התבסס על חיפושים הומולוגיים במאגרי המידע הכלליים. המידע שהושג משרת ה-MASCOT הושווה למאגרים הכלליים של Swiss-prot ו-TrEMBL.

אנליזה ה-LC-MS-MS הראתה מספר רצפים, אך רק רצף אחד זוהה כחלבון מוכר. חלבון זה הופיע במאגרי הנתונים כהומולוגי לחלק מהאתר הפעיל של פראוקסידאזות רבים. תוצאה זו מראה כי החלבון

שבודד הוא אכן פראוקסידאז וכי במיצוי החלבונים שהופק מן הפרח ונוקה ע"י הקולונות קיים אנזים פראוקסידאז פעיל אחד.

רצף חומצות האמינו שזוהה כשייך לפראוקסידאז: **VSCADILALAAR**

פפטידים נוספים שהתקבלו מאנליזה זו:

CGPSSE
ANLPGNANLWVAP
DLLNGV
DALPF
SYSFDVSL
VPLDSQS
VALFSDQVLP
NGFGCEVVR
WQLNATQVELR
LPGFRLTGG
GLLLADL
QLSYNFG
MVVS-XX-ASVVAGELR
SFLCNV
Glycosylated peptides
MTQLTQXX-(NacHex)2(Hex)2

לאחר בדיקה במאגרי הנתונים, לא שוייכו מקטעים אלו לאף חלבון מוכר.

3.4 בידוד הגן לפראוקסידאז

במקביל לניסיון לבודד את חלבון הפראוקסידאז, נעשה ניסיון לבודד את הגנים לפראוקסידאז שביטויים עולה עם התפתחות הפרח ופירוק הצבע על מנת לבחון בשלב מאוחר יותר של המחקר את דפוס הביטוי שלהם בפרח ואת הקשר שלהם לפירוק האנטוציאנינים. לשם כך הושו רצפים מתפ"א ועגבניה אשר שייכים למשפחת הסולניים, כמו צמח הברונפליסיה, על מנת למצא אזורים שמורים בין פראוקסידאזות במשפחה זו. על פי אזורים אלו תוכננו תחלים (איור 5א). נוכחותם של תחלים אלו נמצאה גם בפראוקסידאזות בצמחים ממשפחות אחרות (איור 5 ב).

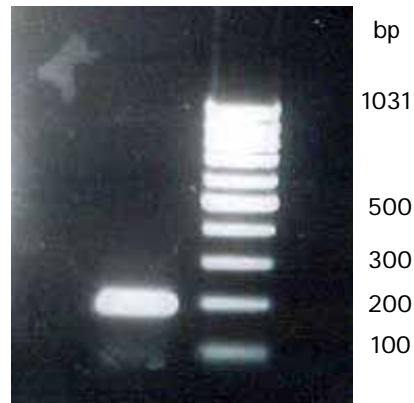
| | | |
|----------|--|-----|
| TC126825 | AGTTCCTAAGGCTCCAATACTGCAGCAGCCATCTCAGAATGCAATTTCCATGATTGCTT | 253 |
| TC154224 | AGTTCCTAAGGCTCCAATACTGCAGCAGCCATCTCAGAATGCAATTTCCATGATTGCTT | 285 |
| TC156173 | AATCCCAAACCGCTCCATCTCTTGCAGCTGCATGCTCAGAATGCAATTTCCAGGATTGCTT | 245 |
| TC126756 | CATTCCAAATGCTCCATCTCTTGCAGCTGCATGCTCAGAATGCAATTTCCATGATTGCTT | 248 |
| TC164601 | CATTCCAAATGCTCCATCTCTTGCAGCTGCATGCTCAGAATGCAATTTCCATGATTGCTT | 233 |
| TC126428 | TGTTGCCAAAGAAGCCGAATGCTGCTTCGTTGCTGAGGCTCCATTTCCATGATTGCTT | 289 |
| TC112641 | TTTTCAGTCTGATCCAAACGGTGGCACCAGGATTGTTGAGAATGCAATTTCCATGATTGCTT | 284 |
| TC162130 | TTTTCAGTCTGATCCAAACAGTGGCACCAGGATTGTTGAGAATGCAATTTCCATGATTGCTT | 288 |
| TC155556 | GTTTGATAAAGATCCTACAATTGCTGCTGGTTACTCAGGCTTCATTTCCATGATTGCTT | 176 |
| | * * * * * | |
| TC126825 | TGTCAGGGGTTGTGATGGATCTGTACTTCTTAATTTCACTTCGACTAACGGAAATCAGAC | 313 |
| TC154224 | TGTCAGGGGTTGTGATGGATCTGTACTTCTCAATTTCACTTCGACTAACGGAAATCAAAC | 345 |
| TC156173 | TGTCAGGGGTTGTGATGGTTCGTACTCCTGAACCTTCACTTCGAGCACTAAAAACAGAC | 305 |
| TC126756 | TGTCAGGGGATGTGATGCATCTGTGTTGTTGAATTTCACTTCAAGTACAGGAAACCAAAC | 308 |
| TC164601 | TGTCAGGGGATGTGATGCATCTGTGCTTGAATTTCACTTCAAGTACAGGAAACCAAAC | 293 |
| TC126428 | TGTCAGGGGTTGTGACGCGTCTTTGCTTCTGGACAGCAGGGGAAGCATAGTAA-----C | 443 |
| TC112641 | CGTACAAGTTGTGACGCGTTCATCT-----CATTCTGGTCTGGCA-----C | 229 |
| TC162130 | CGTACAAGTTGTGACGCGTTCATCT-----CATTCTGGTACTGGCA-----C | 333 |
| TC155556 | TGTTCCGGGTTGTGATGGTCTGTTTT-----GATATCTGGAAGCTCAG-----C | 221 |
| | * * * * * | |
| TC126825 | GGAAAACTAGCTAATCCTAATCTGA---CAGTAAGAGGTTTCTCATTTCATTGATGCTGT | 370 |
| TC154224 | TGAAAACTAGCTAATCCTAATTTGA---CATTGAGAGTTTCTCATTTCATTGATGCTGT | 402 |
| TC156173 | TGAAAAAGTAGCAGTTCTAATCAA---CGTGAAGGCTTCTCATTTCATTGATGGTGT | 362 |
| TC126756 | TGAAAAATTTGGTATCCAAATCTAA---CACTTAGAGGTTTCTCATTTCATTGACAAATG | 365 |
| TC164601 | TGAAAAAGTGTGGTCTCCAAATTTAA---CACTTAGAGGTTTCTCATTTCATTGATGATGT | 350 |
| TC126428 | TGAAAAGAGATCAAACCCCAACAGGAACCTCAGCTCGTGGATTGATGTCATTGATGAT | 403 |
| TC112641 | TGAGAGAAGCTCCTCCGAATACCT---TGTTGAGAGGATACGAGGTTATTGACGATGC | 386 |
| TC162130 | TGAGAGAAGCTCCTCCGAATTTCA---ATTTGAGAGGATTCGAGGTTATTGACGATGC | 390 |
| TC155556 | TGAAAAGAAATGCAGTGACTAATACGG---GACTGAGAGGATTTGAAGTATTGATGATGC | 278 |
| | * * * * * | |
| TC126825 | GAAGAGATTAGTTGAAGCTGAATGCCCGAAGTGTTCCTTGTGCTGATATTGTGCGGTT | 430 |
| TC154224 | TAAAAGATTAGTTGAAGCTGAATGCCCGGAGTGTTCCTTGTGCTGATATTGTGCGGTT | 462 |
| TC156173 | GAAGAAAGCAGTAGAAGCTGAGTGCCTGGAGTGTCTCTTGTGCGGATATTGTTGCCTT | 422 |
| TC126756 | GAAGAAAATTAATGAAGATGAATGCCCTGGAGTGTCTCTTGTGCTGATATTGTGCCTT | 425 |
| TC164601 | GAAGAAAATCATTGAAGATGAATGCCCTGGAGTGTCTCTTGTGCTGATATTGTTGCCTT | 410 |
| TC126428 | TAAATCTGCACTTGAGAAAAGATGCCCAAAACGTCTCTTGTGCTGATATTGTGCACT | 463 |
| TC112641 | TAAAGCAAAATGAAGCTGTTTGTCCCGGAGTGTTCATGTTGCTGACATCTTGTCTCT | 446 |
| TC162130 | TAAAGCAAAATGAAGCTGTTTGTCCCGGAGTGTTCATGTTGCTGACATCTTGTCTCT | 450 |
| TC155556 | AAAATCAAAGCTTGAAGCTTCATGCCCTTGGCGTGTCTCTTGTGCTGATATTGCTT | 338 |
| | * * * * * | |
| TC126825 | GGTTGCTAGAGATGCAGTTGTGGCTACAGGAGGTCCTTTTTGGAATGTACCAACTGGTAG | 490 |
| TC154224 | GGTTGCTAGAGATGCAGTTGTGGCTACAGGAGGTCCTTTTTGGAATGTACCAACTGGTAG | 522 |
| TC156173 | GGTTGCTAGAGACTGTTGTGGTACAGGAGGTCCTTTACGGAAGGTTCCAACGGTAG | 482 |
| TC126756 | AGTTGCTAGAGACTGTTGTGGTACAGGAGGTCCTTTCATGGAGTGTACCAACAGGAAG | 485 |
| TC164601 | AGTTGCTAGAGACTGTTGTGGTACAGGAGGTCCTTTCATGGAGTGTACCAACAGGAAG | 470 |
| TC126428 | TGCTGCAAGGGACTCCACTGTTTGGCTGGTGGACCAAACAGGAGGTTCCATTGGGAAG | 523 |
| TC112641 | TGCTGCTCGTGATCCGTTCTCGTGACTAAGGGACTGACCTGGTCTGTGCCACGGGACG | 506 |
| TC162130 | TGCTGCTCGTGATCCGTTCTCGTGACTAAGGATGACCTGGTCTGTGCCACGGGACG | 510 |
| TC155556 | AGCAGCTCGTGATGCAGTAGACTTGGTTGGAGGTCACAGCTGGGGAGTACCTACTGGTAG | 398 |
| | * * * * * | |

איור 5: רצפי גנים לפרקורסורים של פראוקסידאזות מעגבניה ותפוח אדמה. תפוח אדמה: [TC126825](#), [TC126756](#), [TC154224](#), [TC156173](#), [TC164601](#), [TC154224](#), [TC126756](#), [TC164601](#), [TC126428](#), [TC112641](#), [TC162130](#), [TC155556](#). עגבניה: [TC126825](#), [TC154224](#), [TC156173](#), [TC126756](#), [TC164601](#), [TC126428](#), [TC112641](#), [TC162130](#), [TC155556](#). האזור לפיו תוכננו התחלים מסומן בירוק.

| | | |
|----------|---|-----|
| TC12409 | AATAGCCAAAGAACGTCGATGGGGGCATCATTGCTCCGTATGCAATTTTCATGATTGCTT | 255 |
| NP842538 | -----TTGCATTTTCACGACTGCTT | 20 |
| NP966606 | ATCGTGAGGTGAGTTGTAGCCAAAGCTGTTGCAAGGGAGGCTCCATTTCCACGATTGTTT | 220 |
| TC154224 | AGTTTCTAAGGCTCCAATACTGCAGCAGCCATCTCAGAATGCAATTTCCATGATTGCTT | 285 |
| TC288744 | CGGGTCCGCCGACCCACCATCCTCCCGGCGCTCATCCGGCTCCAGTTCACGACTGCTT | 300 |
| | * * * * * | |
| TC12409 | TGTTAATGGATGTGATGGTTCGATTTTACTAGACGACACTTCAAAGTTCACAGGCGAGAA | 315 |
| NP842538 | TGTATTGGGATGTGATGCTTCTATATTATTGGATGGCACTGCAACCTTTACTGGAGAGAA | 80 |
| NP966606 | CGTTCAGGGTTGTGATGGATCTGTACTTCTCAATTTCACTTCGACTAACGGAAATCAAAC | 280 |
| TC154224 | TGTCAGGGGTTGTGATGGATCTGTACTTCTCAATTTCACTTCGACTAACGGAAATCAAAC | 345 |
| TC288744 | CGTCCGGGCTGCGACGGTGGTCTCATCAAGGGCGGCGCAACAACAACAACGC | 360 |
| | * * * * * | |
| TC12409 | AAATGCAGGTCCTCAATCGAAATT---CAGTCAGGGGATTTAATGTTATTGATGATATAAA | 372 |
| NP842538 | GACAGCAGGACCAAAATACAACCT---CTGTGAGAGGATATGAGGTGATCGACACCTTAA | 137 |
| NP966606 | GAACCTCAACCCGAACAGCAGAT---CGGCTCGCGGGTTTGAAGTTGTTGACGAGATCAA | 337 |
| TC154224 | TGAAAACTAGCTAATCCTAATTTGACATTGAGAGGTTTCTCATTTCATTGATGCTGTTAA | 405 |
| TC288744 | CGAGGTGGACAACGGCAAGCACCAGGGCTCCCGGGCTGGAGATCATCGAGGGCGCAA | 420 |
| | * * * * * | |
| TC12409 | ATCTGCTGTAGAGAAGGTGTGCCAAAGGTAGTCTCTTGTGCTGATATCCTGGCTACTGC | 432 |
| NP842538 | ATCTCAAGTGGGAAGTTTGTGCCCTGGAGTGTCTCTTGTGCGAGATATTGTAGCAGTGGC | 197 |
| NP966606 | GGCAGCATTAGAGAACAATGCCCTAACACTGTTTCTTGTGCTGATGCCCTAACCTTAGC | 397 |
| TC154224 | AAGATTAGTTGAAGCTGAATGTCCCGGAGTGTTCCTTGTGCTGATATTGCTGCTGGT | 465 |
| TC288744 | GACGCAGCTCGAGGGCAGTGCCCCGGCTGCTCTCTCGCCGACATCGTCTGTGCTCGC | 480 |
| | * * * * * | |

איור 5: רצפי גנים לפראוקסידאזות מדרגה III מצמחים ממשפחות שונות *Vitis vinifera* NP842538, *Aquilegia* NP966606, *Arabidopsis thaliana* TC12409, *Maize (Zea mays)* TC288744. האזור התואם לזה ממנו תוכננו התחלים בפראוקסידאזות הסולניים מסומן בירוק.

בעזרת תחלים אלו בודד מקטע בן כ-200 bp מגן המקודד לפראוקסידאז בברונפלסיה (איור 6).



איור 6 : תוצרי PCR על ג'ל אגרוז 12%.

ATGCATTCCATGATTGCTTGTAGGGGTTGTGATGGATCGGTGCTTCTC
 AATTTCACTTCAAGTACAGGAAACCAAACTGAAAACTGGTAATCCCAA
 TCTAACATTGAGAGGCTTCTCATTGATGCTGTGAAGAGAATGGTTGA
 AGCTGAATGTCCTGGA **GTTGTCTCTTGTGCTGATATTGT**

איור 7: רצף המקטע בן 200 bp שבודד מגן לפראוקסידאז בברונפלסיה. התחלים שתוכננו מסומנים בצבע.

תוצאות Blast למקטע

הרצף הוא בעל הומולוגיה של 89% לגן *Lycopersicon esculentum* peroxidase (TPX1) (Accession L13654.1). כמו כן הוא בעל הומולוגיה של 82% לגן *Lycopersicon esculentum*

(Accession L13653.1 peroxidase (TPX2) (איור 8).

גנים אלו מקודדים לחלבונים אשר מופרשים אל דופן התא ומעורבים בתהליכי יצירת ליגנין (Botella et al., 1993).

```

WTT -----ATGCAT 6
TPX1 TTTGTTTCAGCAACAAGTTCCTAAGGCTCCAAATACTGCAGCAGCCATACTCAGAATGCAT 231
TPX2 TATGTGTATAAGCAAATCCCAAACGCTCCATCTCTTGCAGCTGCATTGCTCAGAATGCAT 198
*****

WTT TTCCATGATTGCTTTGTTAGGGGTTGTGATGGATCGGTGCTTCTCAATTCACCTCAAGT 66
TPX1 TTCCATGATTGCTTTGTCAGGGGTTGTGATGGATCTGTACTTCTCAATTCACCTCGACT 291
TPX2 TTCCACGATGCTTTGTTCAGGGGTTGTGATGGTTCTGTACTCCTGAACCTCACCTCGAGC 258
***** ***** * * * * * * * * * *

WTT ACAGGAAACCAAACCTGAAAAACTTGGTAATCCCAATCTAACATTGAGAGGCTTCTCATTC 126
TPX1 AACGGAATCAAACCTGAAAAACTAGCTAATCCTAATTTGACATTGAGAGGTTTCTCATTC 351
TPX2 ACTAAAAACCAACTGAAAAAGTAGCAGTTCCTAATCAAACGCTGAGAGGCTTCTCATTC 318
* ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

WTT ATTGATGCTGTGAAGAGAATGGTTGAAGCTGAATGTCCTGGAGTTGTCTCTTGTGCTGAT 186
TPX1 ATTGATGCTGTAAAAGATTAGTTGAAGCTGAATGTCCTGGGAGTTGTTTCTTGTGCTGAT 411
TPX2 ATTGATGGTGTGAAGAAAGCAGTAGAAGCTGAGTGCCTGGAGTTGTCTCTTGTGCGGAT 378
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

WTT ATTGT----- 191
TPX1 ATTGTTCGGTTGGTTGCTAGAGATGCAGTTGTGGCTACGGAGGGTCCCTTTTGGAAATGTG 471
TPX2 ATTGTTGCCTTGGTTGCTAGAGACTCTGTTGTGGTCACGGGAGGCCCTTACTGGAAGGTT 438
*****

```

איור 8: השוואת רצפים בין המקטע שרוצף לבין הגנים TPX1 ו-TPX2.

על פי מקטע זה תוכנו תחלים עבור Race 5' ו Race 3'. התהליך בוצע בעזרת קיט smart race ע"י איילת בר-עקיבא. על בסיס הרצפים שרוצפו תוכנו תחלים לקצוות הגן. הגן הוגבר ע"י ריאקציית PCR ונשלח לריצוף ב"מעבדות חי" (איור 8).

```

1      GATTGTGCGG CCTTCGGTGA CACTATAGAA TACAGCGGCC GCGAGCTCGG GCCCCACAC
61     GTGTGGTCTA GAGCTAGCCT AGGCTCGAGA AGCTTGTCTGA CGAATTCAGA TTATGCAAAG
121    AGCTGTCCAA AGGCAGAAAA AATCATTCAA GACTACGTCC AGCAGCACGT TCCAAAGGCT
181    CCAAATACTG CAGCATCCAT TCTGAGAATG CATTTCCATG ATTGCTTTGT TAGGGGTTGT
241    GATGGATCGG TGCTTCTCAA TTTCACTTCA AGTACAGGAA ACCAAACTGA AAAACTTGGT
301    AATCCNGATC TAACATTGAG AGGTTTCTCA TTCATTGATG CTGTGAAGAG AGTGGTTGAA
361    GCTGAATGTC CTGGAGTACT TCTTGTGCT GATATTATTG CCTCGTTGC TAGAGATGCA
421    ATTGTGGTTA CAGGAGGTCC TTTTGGAAAT GTGCCAACTG GTAGAAGAGA TGGAACAATA
481    TCGAATACCT CAGAAGCCAA TGCTGACATC CCAGCTCCAA CTAGTAACGT CACCAGACTA
541    CAACAAGCTT TTGCTAAGAA GGGTCTTGAT CTAAAAGACT TAGTCCTATT GTCCCGGTGG
601    CCACACAATT GGAGTATCTC GTTGTCTGTC ATTTTCTGAG CGTTTGTACA ATTTACNGG
661    TGTTCTTGGT AGTCAAGGAT CCATCTCCTA GACNGCGAAT ACNCAGCCTA ATCTGAAGGC
721    NTNGAAAATG CAAGTCAATT AACGATAATA CCACAATAGT TGAAATAGAT CCAGGTAGTT
781    TCAGGACATT TGATCTTAGT TACTACAAGC TTTTACCTAA AAGGAGAGGC CTATTCCAAT
841    CTGATGCAGC CTTGACGAAA CTTTCTACGA CTAAGTCATT TGTCGACCAG CTTGTTAATG
901    GATCACTCAA AGAGTTCTAT GCTGAATTTG CTAAGGCCAT GGAGAAAATG GGCAGAGTTG
961    AAGTTAAAC AGGCAGTGCT GGTGAAATCA GGAAGCATTG TGCAGTTGTG AATAGTAATC
1021   ACGAATTTCG GATCCGGATA CGTAACCGCT CTGCAGCATG GCGGGTACCG ANGC

```

איור 9: רצף הגן לפראוקסידאז שהתקבל מה-race. בצבע, מסומן רצף הנוקלאוטידים המקביל לרצף חומצות האמינו. שזוהו ב-MS.

Lycopersicon esculentum peroxidase (TPX1) לגן 84% של בעל הומולוגיה של (Accession L13654.1).
Lycopersicon esculentum לגן 83% של בעל הומולוגיה של (Accession L13653.1) peroxidase (TPX2).

```
TPX1      GACGGATCGATAAGCTTGATATCGAATTCGCGGCCGAAATAACAAATGGCTTCATTTAGC 60
TPX2      -----TAAATGGCTAAATTTGGT 18
WTT      -----GATTGTGCGGCCCTTCGGTGACACTATAGAATACAGCGGCC -GC 42
                * * * *
TPX1      TATTTGATGAGTGTTTTGGTATTATGTGT-----AATCATAGGTTATACAATGGCT 111
TPX2      GATTTGAGTAACCTTCTAGTGTGTGTATTCTAGTAGGAATAGCGGGTCTAGCTATGGT 78
WTT      GAGCTCGGGCCCCACACGTGTGGTCTAG-----AGCTAGCCTAGGCTCGAGAAGCT 94
                * * * * * * * *
TPX1      CAATTAGAGCTTAAATTTCTATGCTAAAAGCTGTCCAAAAGCTGAGAAAAATTATTAAGAT 171
TPX2      CAGTTGCAGCTTAACTTCTATGCAAAGAGCTGTCCGCAAGCAGAAAAAGATAATTCAGAT 138
WTT      TGTCGACGAATTCAGAT-TATGCAAAGAGCTGTCCAAAGGCAGAAAAATCATTCAGAC 153
                ** * * * * * * * * * * * * * * * *
TPX1      TTTGTTTCAGCAACAAGTTCTTAAGGCTCCAAATACTGCAGCAGCCATACTCAGAATGCAT 231
TPX2      TATGTGTATAAGCAAATCCCAAACGCTCCATCTCTGCAGCTGCATTGCTCAGAATGCAT 198
WTT      TAGCTCCAGCAGCACGTTCCAAAGGCTCCAAATACTGCAGCATCCATTTGAGAAATGCAT 213
                * ** * * ** * ** * * * * * * * * * * * *
TPX1      TTCCATGATTGCTTTGTGTCAGGGGTTGTGATGGATCTGTACTTCTCAATTCACCTCGACT 291
TPX2      TTCCACGATTGCTTTGTGTCAGGGGTTGTGATGGTCTGTACTCCTGAACCTCACCTCGAGC 258
WTT      TTCCATGATTGCTTTGTTAGGGGTTGTGATGGATCGGTGCTTCTCAATTCACCTCAAGT 273
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * *
TPX1      AACGGAATCAAACCTGAAAACTAGCTAATCCATAATTTGACATTGAGAGGTTTCTCATTC 351
TPX2      ACTAAAAACCAGACTGAAAAAGTAGCAGTTCCATAATCAAACGCTGAGAGGCTTCTCATTC 318
WTT      ACAGGAACCAAACCTGAAAACTGAGTTAATCCNGATCTAACATTGAGAGGTTTCTCATTC 333
                * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
TPX1      ATTGATGCTGTTAAAAGATTAGTTGAAGCTGAATGTCCGGGAGTTGTTTCTGTGCTGAT 411
TPX2      ATTGATGGTGAAGAAAGCAGTAGAAGCTGAGTGCCCTGGAGTTGTCTCTTGTGCGGAT 378
WTT      ATTGATGCTGTGAAGAGAGTGGTTGAAGCTGAATGTCTGAGGAGTATTCTTGTGCTGAT 393
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * * *
TPX1      ATTGTGCGGTTGGTTGCTAGAGATGCAGTTGTGGCTACGGAGGTCCTTTTGGAAATGTG 471
TPX2      ATTGTTGCCTTGGTTGCTAGAGACTCTGTTGTGGTACGGGAGGCCCTTACTGGAAGGTT 438
WTT      ATTATTGCCTTGGTTGCTAGAGATGCAATGTGGTTACAGGAGTCCTTTTGGAAATGTG 453
                *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
TPX1      CCAACTGGTAGAAGAGATGGAACGATATCAAATGTGTCAGAAGCCAATGGTGATATCCCA 531
TPX2      CCAACTGGTAGAAGAGATGGGGAGATATCAAACGCTCGGAAGCCTTGGCAAACATCCCT 498
WTT      CCAACTGGTAGAAGAGATGGAACAAATATCGAATACCTCAGAAGCCAATGTGACATCCCA 513
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * * *
TPX1      GCACCAACTAGTAACTTTACTAGACTGCAACAATCCTTCGCGAAGAAAGGTCTTGATCTG 591
TPX2      CCTCCGACAAGTAACTTTTCCAGTCTCCAGACGCTTTTGGCAGCAAGGGTCTTGACCTA 558
WTT      GCTCCAACACTAGTAACTTACCAGACTACAACAAGCTTTTGCTAAGAAGGTCTTGATCTA 573
                * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
TPX1      AATGACCTGGTCTTCTATCA-GGTGCCATACTATTGGAGTGCTCGTTGCTCATCATT 650
TPX2      AAAGACTTGGTACTATTGTCT-GGTGCACATACCATTGGAGTCTCTCATTGCCCGTCATT 617
WTT      AAAGACTTAGTCTATTGTTCCCGGTGGCCACACAATTGGAGTATCTCGTTGCTCGTCA 633
                ** *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
TPX1      TTCAGAGCGTCTATACAATTTACCAGGGTGTAGGTACACAAG-ATCCATCTC-TAGAC 708
TPX2      TTCATCACGTTTATACAATTTTACTGGAGTTTGGGGCA--AAA-AGTCCTCTC-TAGAC 672
WTT      TTCTGAGCGTTTGTACAATTTACNGGTGTTCTTGGTAGTCAAGGATCCATCTCCTAGAC 693
                *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
TPX1      AGTGAATATGCGGA-TAATCTCAAGTCA-AGAAAATGCAGATCAATCAATGACAATACTA 766
TPX2      AGCGAATATGCAGC-TAATCTTAAGATG-AAGAAAATGCAAATCCATCAATGACAACACCA 730
WTT      NGCGAATACNCAGCCTAATCTGAAGGCNTNGAAAATGCAAGTCAATTAACGATAATACCA 753
                * ***** * * ***** * * ***** * * * * * * * *
TPX1      CTATAGTAGAAAATGGATCCAGGTAGTTTCAAGACATTTGATCTCAGCTACTTCAAGCTTT 826
TPX2      CAATTGTCGAAAATGGATCCTGAAGTTCAGTAAATTTGATCTTAGCTACTTCCAGCTTG 790
WTT      CAATAGTTGAAAATAGATCCAGGTAGTTTCAAGACATTTGATCTTAGTTACTACAAGCTTT 813
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

```

TPX1      TGCTCAAAAGGAGAGGTCTGTTCCAATCCGATGCAGCATTGACAACACGTACCTCAACGA 886
TPX2      TGCTCAGAAGAAAAGGGCTGTTCCAATCTGATGCAGCCTTGACAACAAGTGCACAAACA 850
WTT       TACCTAAAAGGAGAGGCCTATTCCAATCTGATGCAGCCTTGACGAAACTTCTACGACTA 873
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
TPX1      AATCGTTTATCGAGCAGCTGTAGATGGACCACTCAACGAATTTTTCGATGAATTTGCTA 946
TPX2      AGTCATTTCATCAACCAGCTAGTACAAGGATCAGTGAAACAATTCATGCGGAACCGG--- 907
WTT       AGTCATTTGTGACAGCTGTGTTAATGGATCACTCAAAGAGTTCTATGCTGAATTTGCTA 933
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
TPX1      AATCGATGGAGAAAATGGGAAGAGTTGAAGTTAAGACAGGGAGTGTGGTGAAATCAGGA 1006
TPX2      GAGCAATGGAGAAAATGGGAAAGATTGAAGTGAAGACCGGCTCTGCTGGTGAGATTAGGA 967
WTT       AGGCCATGGAGAAAATGGGCAGAGTTGAAGTTAAAACAGGCAGTGTGGTGAAATCAGGA 993
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
TPX1      AGCATTGTGCATTTGTGAATAGTTAAAAATTGAAGTTTAAATTAATGATTTT---GTGTT 1062
TPX2      AGCACTGTGCAGCTGTGAATAGTTAAGAGCTAGCTTTCTTTCCCTTTGTTCCCAACTTC 1027
WTT       AGCATTGTGCAGTTGTGAATAGTTAATCAGGAATTTCCGGATCCGGATACGTAACGCGTCTG 1053
          **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

איור 10: השוואת רצפים בין הגן לפראוקסידאז שהתקבל מה-race לגנים TPX1 ו-TPX2.

למרות הדמיון הרב שלו לגנים המעורבים בליגניפיקציה המשכנו לעבוד עם מקטע זה מכמה סיבות. ראשית, זהו מקטע קצר שתוכנו מלכתחילה על פי איזור שמור בפראוקסידאז של משפחת הסולניים, לכן צפינו להומולוגיה לגנים המקודדים לחלבונים אחרים. שנית, בהמשך המחקר יתכן ונבדוק את פעילותן של ע"י השתקתו, ולשם כך דרוש לנו רצף קרוב אליו ולא בהכרח הגן עצמו. כמו כן אין מידע על המצאות ליגנין בעלי כותרת ולכן יתכן ואין פעילות יצירת ליגנין ע"י פראוקסידאזות בפרח.

Met HFHDCFV R G C D G S V L L N F T S S T G N Q T E K L G N X D L T L
R G F S F I D A V K R V V E A E C P G V **V S C A D I I A L V A R D A I V V T G**
G P F W N V P T G R R D G T I S N T S E A N A D I P A P T S N V T R L Q Q A
F A K K G L D L K D L V L L S R W P H N W S I S L L V I F **Stop**

איור 11: רצף חלבון מתורגם של פראוקסידאז מברונפולסיה

3.4.1 השוואה בין רצף החלבון והגן

לאחר שרוצף גן הפראוקסידאז ע"י הקיט ותורגם בעזרת כלים מאתר <http://expasy.org> לחומצות אמינו נערכה השוואה בין רצף החלבון שתורגם מרצף הגן שבודד מה-race לרצף החלבון TPX1 (איור 12).

```

WTT       DCAAFGDTIEYSGRELGPPHVWSRASLGSRLSTNSDYAKSCPKEKIIQDYVQQHVPKA 60
TPX1      -MASF--SYLMSVLVLCVIIIGYTNAQLELN-----FYAKSCPKEKIIKDFVQQQVPKA 51
          *:* : * * : : . * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
WTT       PNTAASILRMETHFHDFVRGCDGSVLLNFTSSSTGNQTEKLGXDLTLRGRFSFIDAVKRV 120
TPX1      PNTAAAILRM--HFHDCFVRGCDGSVLLNFTSTNGNQTEKLANPNLTLRGRFSFIDAVKRL 109
          *****:***** :*****:*****:*****:*****:*****:
WTT       VEAECPGVVSCADIIALVARDAIVVTGGPFWNVPTGRRDGTISNTSEANADIPAPTSNVT 180
TPX1      VEAECPGVVSCADIVALVARDAVVATEGPFWNVPTGRRDGTISNVSEANGDIPAPTSNFT 169
          *****:*****:* * *****:*****:*****:*****:

```

```

WTT      RLQQAFAKKGLDLKDLVLLSRWPHNWSISLLVIFSTPAFVQFHXCSTWSTPSRIHLLDKEY 240
TPX1     RLQQSFAKKGLDLNDLVLLS-GAHTIGVSRCSSFSERLYNFTGVVGTQDPS----LDSEY 224
          ****:*****:***** . * . . : * * * : . . . * * * *

WTT      XASTPSEGXENASQLTIIPQSTPLKSTPIQVVSGLLILVTTSFYLGAEAYSNLMETQPST 300
TPX1     ADNLKSRKCRSINDNTTIVEMDPGSFKTFDLSYFKLLLKRRGLFQSDAALT----TRTST 280
          . * . . . . : * * * : * . . . . : * * * : . . . * : * : *

WTT      PRNFLRLSHLSTSLMETDHSKSSMETLNLLRPWRKWAELKQAVLVKSGSIVQLSTPI 360
TPX1     KSFIEQLVDGPLNEFFD-EFAKS-MEKM-----RVEVKTGSAGBIRKHC 323
          : * . . . . : : * * * * * . . . . * * * * * : :

WTT      VITNFGSGYVTRLQHGGYRX 380
TPX1     AFVNS----- 328

```

איור 12: השוואה בין רצף החלבון שתורגם מרצף הגן שבודד מה-race לרצף החלבון TPX1.

ניתן לראות כי באזור תחילת הגן ההומולוגיה בין מעקובות חומצות האמינו היא חלשה. כמו כן כאשר נעשה ניסיון לזהות סיגנל הובלה בגן לפראוקסידאז מברונפליסיה בעזרת התוכנה TargetP 1.1 Server (<http://expasy.org>) לא זוהה כזה ברצף הגן. בעוד שבגן ה-TPX1 מצוי סיגנל החשוד כיסגנל הובלה לדופן התא (Botella et al., 1993).

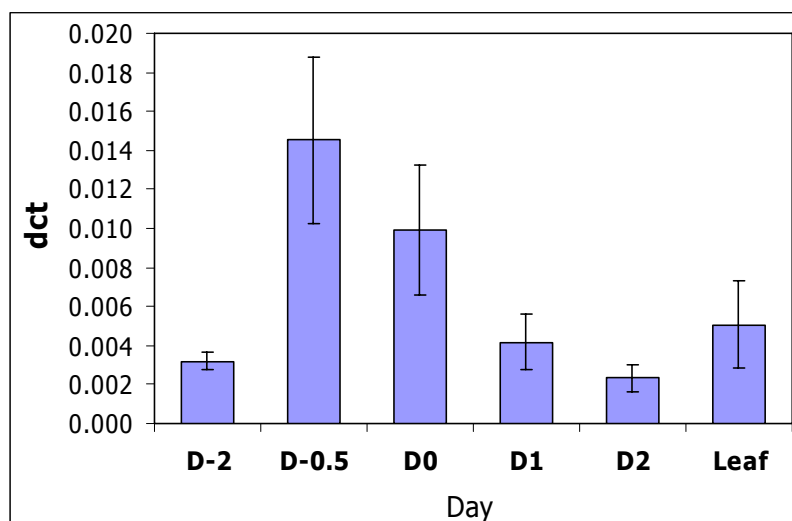
כמו כן נערכה השוואה בין הרצף שזוהה ע"י אנליזת ה-MS לבין הרצף המקביל בגן.

LC-MS-MS רצף שזוהה ע"י אנליזת ה- VSCADIIALAAR
 רצף מתורגם על בסיס הגן שרוצף VSCADIIALVAR

התוצאות מראות שוני בחומצת אמינו אחת בין שני הרצפים. רוב הרצף הנ"ל שמור מאוד בין הפראוקסידאזות השונות, אך קיימים שינויים בחומצת האמינו המסויימת הזו. הצורה הנפוצה יותר בקרב הפראוקסידאזות השונות היא זו שזוהתה ע"י אנליזת ה- LC-MS-MS. במאגרי המידע היא מזוהה כחלק מהאתר הפעיל של קבוצה גדולה מאוד של פראוקסידאזות. הרצף המתורגם על בסיס הגן שרוצף אינו מזוהה כחלק מהאתר הפעיל של אנזים הפראוקסידאז במאגרי המידע. הוא מופיע במספר פראוקסידאזות, אבל בד"כ עם ולין במקום שבו מופיע האיזולאוצין השני (למשל בגנים TPX1 ו-TPX2) היא מופיעה בצורה זו רק בפראוקסידאז מסויים מצמח התרד *Spinacia oleracea* (Accession CAA76374) שתפקידו בצמח אינו ידוע. מכאן ניתן להסיק שיש אפשרות שהגן שרוצף אינו מקודד לאנזים הפראוקסידאז שנוקה ע"י הקולונות האנטוציאנינים בפרח הברונפליסיה.

Real time PCR 3.5

לאחר שאופיין דפוס פעילות האנזים בשלבים השונים של התפתחות הפרח, נבדק דפוס הביטוי של הגן. לשם כך תוכננו תחלים מהמקטע המופיע בסעיף 3.4.1 ואיתם נערכו ריאקציות Real time PCR על cDNA שמקורו ב-RNA שהופק מפרחים בשלבי התפתחות שונים ובאברי הצמח השונים.



איור 13: ביטוי דיפרנציאלי של גן הפראוקסידאז על פי ריאקציה real time PCR

ניתן לראות שבפקע הסגור ביטוי הגן הוא חלש. ביטוי הגן ועולה עם התפתחות ניצן הפריחה, מגיע לשיאו מעט לפני האנטזיס והולך ופוחת עם המשך התפתחות הפרח. האנזים, בהשוואה, אכן קיים בפקע הסגור אך פעילותו הולכת ומתגברת עם התפתחות הפרח. אנו רואים גם ביטוי מסויים של האנזים בעלה בוגר.

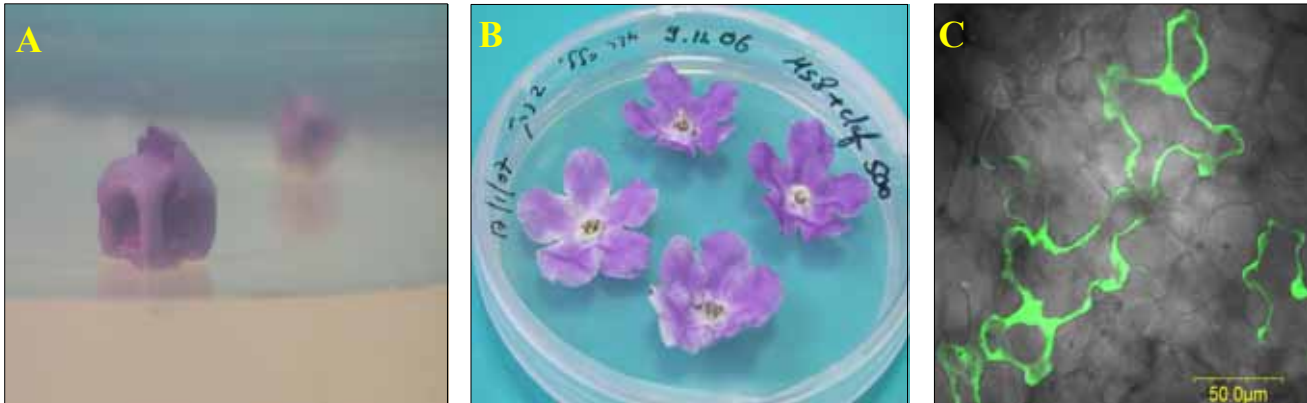
3.6 מערכת התמרה חולפת

יצירת מערכת התמרה חולפת לפרחים של צמח הברונפלוסיה היא חשובה מאוד לשלבים המאוחרים יותר של המחקר, כדי לאפשר החדרת מקטע של הגנים המועמדים ולגרום להשתקתם או לכיטויים ביתר. שלב זה הוא חיוני לבדיקת מעורבות האיזואנזים של פראוקסידאז בפירוק אנטוציאנינים. השתקת הגן היא לא בהכרח המפתח לזיהוי מעורבות גן מסויים בתהליך פירוק האנטוציאנינים. יתכן ואיזואנזימים אחרים יפצו על אובדן הפעילות של גן מסויים ולא יתקבל פנוטיפ נראה לעין. ביטוי ביתר של אנזים זה עשוי להוביל לפירוק צבע מהיר הרבה יותר או לאובדן צבע בשלב מוקדם מאוד של התפתחות ניצן הפרח, מה שיביא לפריחת פרחים לבנים לגמרי.

נערכו נסיונות רבים להתמרה עם חיידקי אגרובקטריום EHA105 המכילים פלסמיד PME504 המבטא את הגן המדווח GUS. הזרקת חיידקים בלחץ לא הוכחה מועילה כיוון שרקמת הפרח רגישה מאוד ובעלת נטיה לצבור אנטוציאנינים בתגובה לפציעה, מה שהקשה על זיהוי הצבע הכחול שיוצר חלבון ה-GUS. שיטות פחות מזיקות כגון החדרה בואקום, הגמעה וטבילה נוסו גם כן, אך ללא תוצאות. לכן הוחלט על מעבר לגן המדווח GFP שזיהויו אינו מושפע מרמת האנטוציאנינים ברקמה. נבדקה ונשללה האפשרות לפלורוסנציה עצמאית של עלי הכותרת.

ניצנים סגורים של פרחי ברונפלוסיה הושרו בתמיסה המכילה חיידקי אגרובקטריום מזן EHA105 המכילים את הפלסמיד הבינארי - pBIN GFP למשך הלילה בטילטול. לאחר ההשריה הניצנים ננעצו

במצע המכיל MS 2.2 g/l, סוכרוז 15 g/l. 48 שעות לאחר פתיחת הפרח הם הועברו למצע המכיל אניבוטיקה מסוג כלפורן 500 mg/l ונבדקה נוכחות חלבון ה-GFP במהלך 5 הימים הבאים.

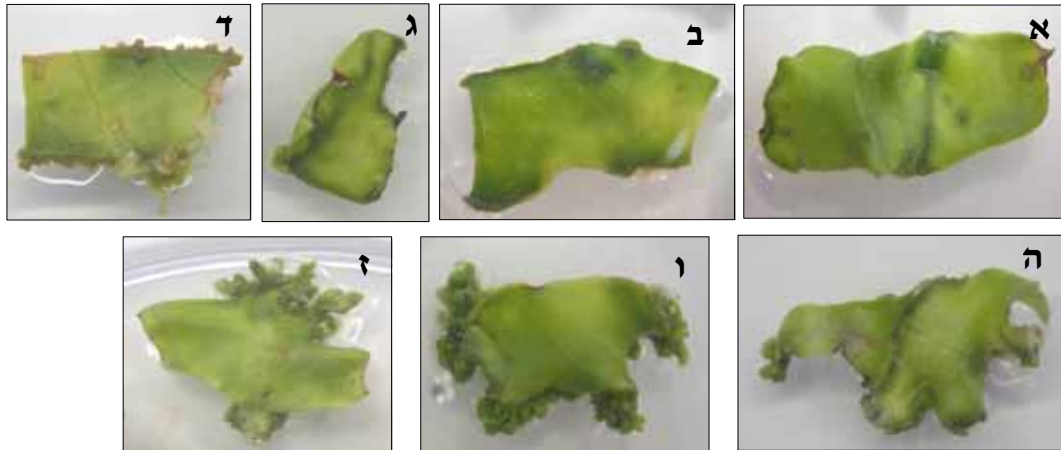


איור 14: תאי פרח ברונפליסיה לאחר טרנספורמציה עם אגרובקטריום מזן EHA105 המכילים את הפלסמיד הבינארי - pBIN GFP . A. פקע פרח פרונפליסיה על מצע ההזנה לאחר הדבקה. B. פרחי ברונפליסיה יומיים לאחר ההדבקה. C. תאי פרח הברונפליסיה המבטאים את חלבון ה-GFP. התאים צולמו בהגדלה פי 60 בעזרת מיקרוסקופ קונפוקלי FLUOVIEW 500 יומיים לאחר ההדבקה.

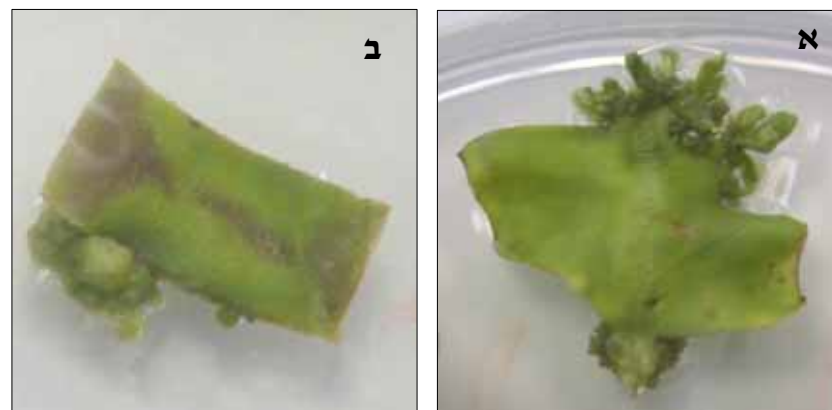
3.7 תרביות רקמה

במקביל פותח פרוטוקול ליצירת צמחי ברונפליסיה בתרביות רקמה. מטרת פיתוח פרוטוקול זה הוא לאפשר יצירת צמח ברונפליסיה מותמר עם הגנים לפראוקסידאז שאנו מעוניינים לוודא את פעילותם. בפרח הברונפליסיה פירוק הצבע מתרחש במהירות רבה וקיים קושי לגרום לביטוי חולף של גנים בשלב מוקדם מספיק להשפיע על ביטוי זה. לכן יש צורך בהתמרת צמחי ברונפליסיה לבחינת השפעת השתקה או ביטוי ביתר של גן מסויים על פירוק הצבע.

בשלב הראשון נבדקו חלקי צמח שונים על מצעים המכילים הורמונים בריכוזים שונים. הרכב המצעים השונים מוצג בפרק שיטות וחומרים בסעיף 2.9. בשלב זה התברר שחלק הצמח שעובר רגנרציה בצורה המיטבית הוא העלה. כמו כן התברר כי המצע אליו מגיב הצמח הצורה המיטבית הוא מצע A, המכיל 0.5 mg/l IAA-1mg/l BA (איור 15). קיים הבדל מסויים בתגובה למצע הרגנרציה בין עלים בוגרים וצעירים (איור 16).



איור 15: רגנרציה של עלים צעירים במצעים בעלי הרכב הורמונלי שונה (ראה טבלה 1 בסעיף 2.9 בפרק שיטות וחומרים). א. מצע G. ב. מצע F. ג. מצע E. ד. מצע D. ה. מצע C. ו. מצע B. ז. מצע A



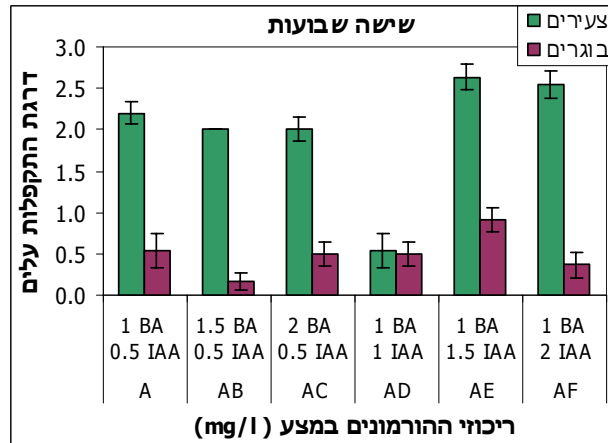
איור 16: רגנרציה בעלים בשלבי התפתחות שונים במצע A. א. עלה צעיר. ב. עלה בוגר.

במאמץ למצוא את המצע האופטימלי נעשה ניסוי נוסף בו נלקח המצע האופטימלי מהניסוי הראשון - A, המכיל 0.5 mg/l IAA ו-1 mg/l BA, וריכוזי ההורמונים המרכיבים מצע זה שונו ליצירת 6 מצעים שונים עליהם נבדקו רגנרציית עלים בוגרים וצעירים (טבלה 2) לכל טיפול (מצע וסוג עלה) היו 10 חזרות. תוצאת הניסוי היא ממוצע של כל צלחות טיפול מסויים.

| BA mg/l | IAA mg/l | מצע |
|---------|----------|-----|
| 1 | 0.5 | A |
| 1.5 | 0.5 | AB |
| 2 | 0.5 | AC |
| 1 | 1 | AD |
| 1 | 1.5 | AE |
| 1 | 2 | AF |

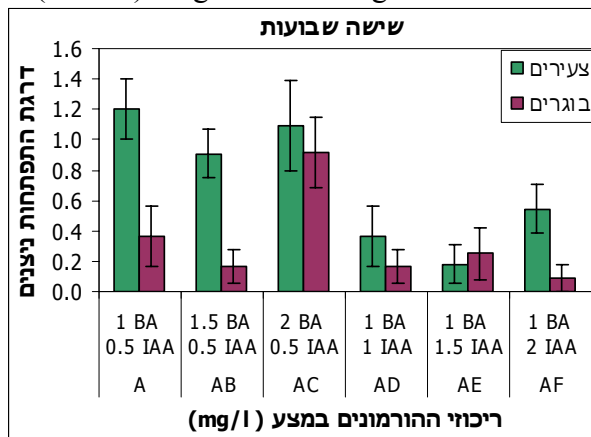
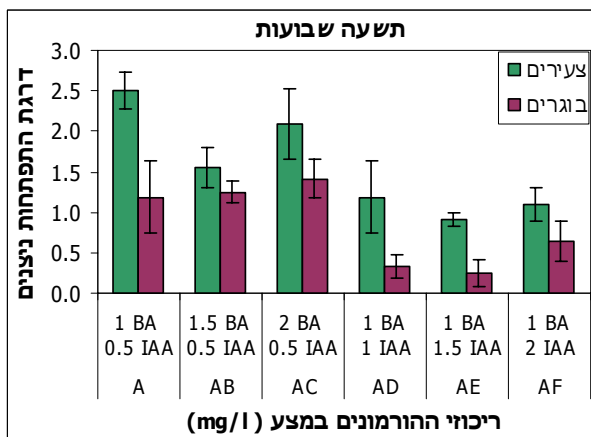
טבלה 2: הרכבי מצעי הרגנרציה שנבחנו בניסוי השני.

השינוי הראשון הנראה לעין בעלים הנמצאים במצע הרגנרציה הוא התקפלות העלה. ברוב המצעים ניכר שוני רב בהתקפלות העלה בין עלים צעירים ובוגרים במהלך 6 שבועות הגידול במצע הרגנרציה, מלבד במצע AD המכיל 1mg/l BA-11 mg/l IAA (איור 17). בהמשך הגידול לא ניכר שינוי משמעותי נוסף בדרגת התקפלות העלים.



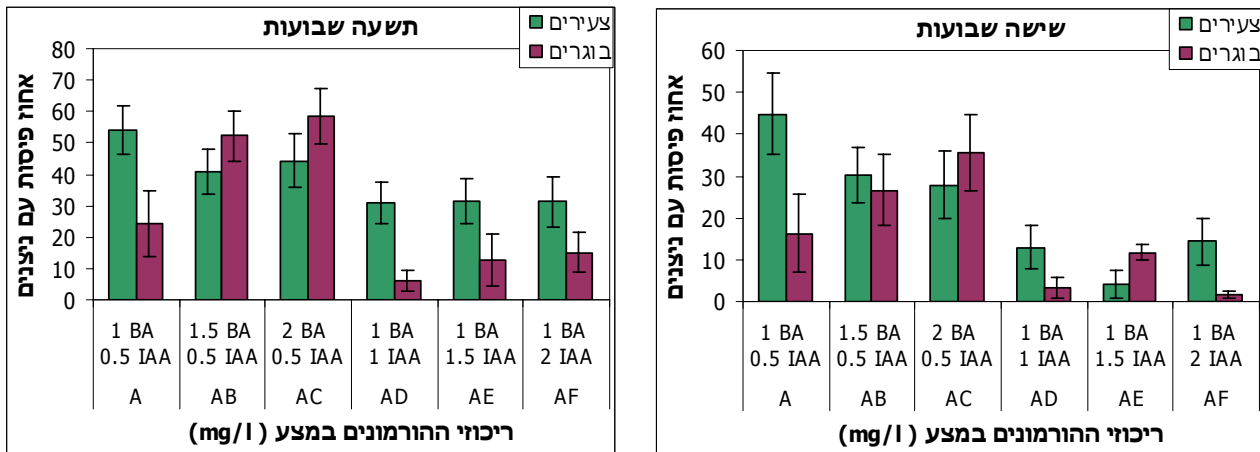
איור 17: דרגת התקפלות העלים של עלים צעירים ובוגרים במצעים בעלי ריכוז IAA ו-BA משתנים. דרגת התקפלות העלים נבחנה מדי שלושה שבועות. לכל מצע היו 10 חזרות והתוצאות המוצגות הן ממוצע החזרות לכל מצע. מדד דרגות ההתפתחות נקבע על פי שפע הניצנים ואורכם. קיים הבדל בדרגת התפתחות הניצנים בין עלה בוגר לעלה צעיר בכל המצעים, אך המצעים בהם נצפתה ההתפתחות הנמרצת ביותר של ניצנים היו A ו-18).

AC המכיל 2mg/l BA-10.5 mg/l IAA (איור 18).



איור 18: דרגת התפתחות הניצנים של עלים צעירים ובוגרים במצעים בעלי ריכוז IAA ו-BA משתנים. דרגת התפתחות הניצנים נבחנה מדי שלושה שבועות. לכל מצע היו 10 חזרות והתוצאות המוצגות הן ממוצע החזרות לכל מצע.

לא כל פיסות העלים פיתחו ניצנים, אך את האחוזים הגבוהים ביותר של פיסות שאכן פיתחו ניצנים ניתן למצוא לאחר 6 שבועות במצע הרגנרציה A. לאחר 9 שבועות במצע הרגנרציה התפתחו ניצנים בפיסות נוספות בשאר המצעים, אך קצב יצירת הניצנים היה גבוה יותר במצע A (איור 19).



איור 19: מדדים לרגנרציה של עלים צעירים ובוגרים במצעים בעלי ריכוז IAA ו-BA משתנים. אחוז הפיסות שפיתחו ניצנים נבחן מדי שלושה שבועות. לכל מצע היו 10 חזרות והתוצאות המוצגות הן ממוצע החזרות לכל מצע.

נעשה ניסיון להעביר את הפיסות בעלות הניצנים למצעי התארכות שהכילו את ההורמונים המצויים בשני המצעים שנראו כמוצלחים ביותר, A, המכיל 0.5 mg/l IAA ו-1 mg/l BA ו-AC המכיל 0.5 mg/l IAA. כאשר לכל אחד מהם הוסף ג'יברלין בריכוזים 0.25, 0.5 ו-1 mg/l. אך בעקבות העברה זו חלה האטה ואף עצירה מוחלטת בהתפתחות הניצנים, במקרים מסויימים מתו הניצנים הצעירים.

ניסוי הרגנרציה הראשוני הניב שני צמחונים בעלי שורשים שהועברו למצע השרשה שהכיל את הורמון ההשרשה IBA בריכוז 0.5 mg/l. הצמחונים הועברו ממצע A למצע ההשרשה כאשר הגיעו לגודל סנטימטר וחצי.

לסיכום, ניסוי זה הראה כי חלק צמח הברונפלוסיה המגיב באופן טוב ביותר לרגנרציה הוא עלה צעיר. במדד התקפלות עלים הגיבו הצמחים יותר למצעים שהכילו ריכוזים עולים של IAA (1.5-12 mg/l). התקפלות העלים נגרמת כתוצאה מהתארכות של התאים בצד התחתון של הרקמה. ידוע כי אחת ההשפעות של אוקסין על צמחים בתרבות רקמה היא התארכות תאים (Breviario et al, 1992).

בחלק מן המצעים הגיעו העלים הבוגרים לרמת ההתפתחות ניצנים קרובה לזו של העלים הצעירים, אך בקצב איטי יותר. המצעים בהם ניכרה התפתחות הניצנים הנמרצת ביותר היו אלו בעלי ריכוז נמוך של ההורמון IAA (0.5 mg/l) וריכוזים משתנים של ההורמון BA שאחת מהשפעותיו העיקריות היא התחלקות תאים (Ziv, 1989), מבין מצעים אלו המצע בו נצפתה התפתחות הניצנים הנמרצת והרבה ביותר הייתה במצע המכיל שהכיל את ריכוז ה-BA הנמוך ביותר שנבדק בניסוי (1mg/l).

צמח הברונפליסיה נבחר כמערכת מודל לחקירת הפירוק האקטיבי של אנטוציאנינים כיוון שפרחיו עוברים שינוי צבע מהיר ומשמעותי תוך זמן קצר ביותר. הפרח נפתח כאשר הוא בצבע סגול כהה, ובמהלך שלושת הימים הבאים הוא מאבד את צבעו בהדרגה והופך לבן כשלג. ריכוז האנטוציאנינים במהלך שלושת הימים מרגע פתיחת הפרח קטן באופן משמעותי עד לרמה כמעט אפסית (Vaknin et al., 2005). בעבודה קודמת שנערכה במעבדתנו הוכח כי יש צורך ביצירת חלבונים חדשים לצורך פירוק הצבע (Vaknin et al., 2005). אנזימים ממשפחת הפראוקסידאזות הם מועמדים סבירים למעורבות בפירוק כיוון שהם אנזימים מחמצנים הנמצאים בוקואולה (Welinder et al., 2002), דבר המאפשר להם גישה ישירה לאנטוציאנינים.

בפרח הברונפליסיה פעילים מספר איזואנזימים ממשפחת הפראוקסידאזות, שפעילותם משתנה עם התפתחות הפרח והעלמות הצבע. כאשר הוסף מעכב יצירת החלבונים ציקלוהקסמיד לתמיסת הגידול של הפרח, ניכר עיכוב בפעילות איזואנזימים זה ועיכוב בפירוק הצבע (Vaknin et al., 2005). במשפחת הפראוקסידאזות קיימים איזואנזימים רבים בעלי תפקידים רבים בצמח כמו ליגניפיקציה, שיעום וקטבוליזם של אוקסין (Hiraga et al., 2001), אך בפרח הברונפליסיה פעילים איזואנזימים ספורים בלבד. על מנת לברר היכן מתבטאים שאר האיזואנזימים ממשפחה זו נבדקה נוכחות איזואנזימים ממשפחת הפראוקסידאז באיברים שונים של צמח הברונפליסיה, נצפתה דיפרנציאליות רבה של איזואנזימים ממשפחת הפראוקסידאזות. האיזואנזימים הפעילים בפרח כמעט ולא מופיעים באברי הצמח האחרים. ניתן לראות פעילות של שניים מאיזואנזימים אלו בעלה בוגר ובאופן חלש מאוד בעלה צעיר. האיזואנזימים שהוא החשוך המרכזי במעורבות בפירוק לא מופיע באף אחד מאברי הצמח האחרים, מלבד רמה מסוימת של פעילות בעלה צעיר. בשורש פעילים יותר איזואנזימים מבכל אחד מהאיברים שנבדקו בניסוי. תוצאות אלו תואמות למחקרו של Welinder וחבריו (2002) שהראו דיפרנציאליות בביטוי האיזואנזימים השונים בחלקם שונים של צמח הארכידופסיס וביטוי של חלק גדול מאיזואנזימים אלו בשורש.

דפוסי פעילות אלו מראים כי קיימים איזואנזימים של פראוקסידאז הפעילים בפרח הברונפליסיה ופעילותם מתגברת בקורלציה לפירוק הצבע. איזואנזימים אלו הם מועמדים סבירים למעורבות בתהליך פירוק האנטוציאנינים בפרח.

על פי תוצאות אלו הוחלט לבודד ולזהות את האיזואנזימים הפעילים בצמח. בידוד זה נעשה ע"י הרצה על קולונת החלפת קטיונים וקולונת ג'ל פילטרציה. תוצר הבידוד על הקולונות נבדק ע"י הרצה על ג'ל SDS-PAGE בתנאים דנטורטיביים וצביעה בקומסי, והרצה על ג'ל SDS-PAGE בתנאים חצי נטיביים ובדיקת פעילות פראוקסידאז. בג'ל הצבוע בקומסי נראה חלבון נקי אחד הקרוב, אך לא זהה, במשקלו

המולקולרי לאיזואנזים בעל הפעילות החזקה ביותר הנחשד כמעורב בפירוק. ניתן לייחס הבדלים אלו להבדלים בתנאי ההרצה בין חלבון הנמצא במצב חצי נטיבי לחלבון בעל משקל מולקולרי זהה המצוי במצב דנטורטיבי. בג'ל הפעילות נראו גם האיזואנזימים הנוספים הפעילים בפרח, אך איזואנזימים אלו לא נראו כאשר הורץ התוצר בג'ל דנטורטיבי ונצבע בקומסי. על כן קיים הסיכוי כי החלבון שנוקה ע"י הקולונות אינו החלבון בעל הפעילות החזקה ביותר אלא לאחד מהאיזואנזימים האחרים המופיעים בג'ל הפעילות ומשקלם המולקולרי קטן יותר. יתכן כי למרות שפעילותם חלשה יותר כמותם בפרח גדולה יותר.

תוצאות אנליזת ה-LC-MS-MS מצאו מקטע חלבון בן 12 חומצות אמינו ששוויך לאתר הפעיל של אנזימים ממשפחת הפראוקסידאזות על פי השוואה למאגרי המידע. התוצאות הראו גם מקטעים נוספים אותם לא ניתן היה לשייך לחלבונים מוכרים, למרות שחלקם היו ארוכים יחסית. יתכן שחלק מקטעים אלו שייכים לאיזואנזים ממשפחת הפראוקסידאז אשר מפרק אנטוציאנינים, והסיבה שהם לא נמצאים במאגרי הנתונים היא שפעילות אנזים זה היא יחודית ולכן המקטעים השייכים לאתר הפעיל המבצע את הפירוק לא נמצאים במאגרי הנתונים. יתכן גם שהם שייכים לחלבונים נוספים שדומים בתכונותיהם לחלבון אותו בודדנו ולכן עברו את תהליך הבידוד בשתי הקולונות יחד איתו. יתכן ורצוי לנקות את החלבון באמצעים נוספים ואז לרצפו.

במקביל לניסיון לבדוד את חלבון הפראוקסידאז, נעשה ניסיון לבדוד את התעתיקים לפראוקסידאז שביטויים עולה עם התפתחות הפרח ופירוק הצבע על מנת לבחון בשלב מאוחר יותר של המחקר את דפוס הביטוי שלהם בפרח ואת הקשר שלהם לפירוק האנטוציאנינים. לשם כך הושאו רצפים של גנים שונים המקודדים לפראוקסידאזות מקבוצה III שזו הקבוצה אליה משתייכים רוב הפראוקסידאזות הצמחיות, הנמצאים בצמחים ממשפחת הסולנניים, תפוח אדמה ועגבניה. תחלים לגן הפראוקסידאז תוכננו על פי איזורים שמורים בגנים אלו ונוכחות רצף התחלים הללו נבדקה ונמצאה גם בצמחים ממשפחות אחרות (תירס, ארבידופסיס), כדי לוודא שאלו אכן רצפים השמורים במשפחת הפראוקסידאזות.

תחלים אלו הגבירו מקטע יחיד בן 200bp השייך ככל הנראה לגן המקודד לאיזואנזים ממשפחת הפראוקסידאזות. אורך מקטע זה היה כמצופה על פי מיקום של הרצפים מהם תוכננו התחלים בגנים של פראוקסידאזות ממשפחת הסולנניים. חציו של רצף הנוקלאוטידים של מקטע החלבון אשר זוהה באנליזת ה-LC-MS-MS זהה לתחל הנמצא בסוף המקטע שהוגבר.

בהמשך העבודה תוכננו תחלים ממקטע זה עבור Race 5' ו Race 3', על מנת לרצף את הגן כולו. הרצף שנמצא בעקבות ה-Race של הגן הוא בעל הומוולוגיה גבוהה (84%) לגן מעגבניה הנקרא TPX1 ולגן TPX2 (83%) אשר שניהם מקודדים לפראוקסידאז המעורב בתהליך יצירת ליגנין בשורש העגבניה. TPX1 מקודד לאנזים ממשפחת הפראוקסידאזות בעל נקודה איזואלקטרית בסיסית. ביטוי אנזים זה בשורש צמח העגבניה עולה לאחר טיפול ב-100mM NaCl (Botella et al., 1994). בנוסף לכך, תעתיקים של TPX1 נוצרו ברקמות הצמח העיליות לאחר פציעה (Botella et al., 1994). בצמחי עגבניה שהונדסו לבטא TPX1 ביתר הובחנה עליה בתכולת ליגנין בעלי הצמח

(Mansouri et al. 1999). In situ RNA hybridization הראתה שביטוי TPX1 מוגבל לתאים שעוברים סינתזת ליגנין וסוברין בשורשי צמח העגבניה (Quiroga et al., 2000). תוצאות אלו מרמזות שפראוקסידאז TPX1 עשוי להיות מעורב ביצירת ליגנין וסוברין בשורש ובחלקי הצמח העיליים.

TPX2 מקודד לאנזים ממשפחת הפראוקסידאזות בעל נקודה איזואלקטרית בסיסית. זהו אנזים המכוון לדופן התא ושדפוסי הביטוי שלו גבוהים בזמן גדילת התא (Henshaw et al., 1966; Narita et al., 1995) בדומה לפראוקסידאזות אחרות שפעילות בדופן התא (Henshaw et al., 1966). כאשר הושם תחת הבקרה של פרומוטור CaMV 35S והוחדר לצמחי טבק לא ניכרה השפעה על זן הבר תחת תנאי גדילה נורמליים. אך, קצב בנביטה של הצמחים הטרנסגניים גדל מאוד תחת תנאים של ריכוז מלח גבוה (250 mM NaCl) או לחץ אוסמוטי (470 mM mannitol). נמצא כי גודל הנקבוביות היה קטן יותר בדופן הזרעים הטרנסגניים. תוצאות אלו מרמזות כי TPX2 עשוי להיות מעורב במודיפיקצית הארכיטקטורה של דופן התא (Amaya et al., 1999). בנוסף, צמחים טרנסגניים של טבק שמבטאים ביתר את הגן הוכיחו יכולת מוגברת של קשירת מים לדופן התא (Mercado et al., 2004).

למרות הדמיון הרב של רצף הגן מצמח הברונפליסיה לגנים אלו המעורבים בליגניפיקציה בצמח העגבניה, המשכנו לעבוד עם מקטע זה מכמה סיבות. ראשית, התחלים שבהם השתמשנו למציאה וריצוף של המקטע ההתחלתי תוכננו על פי איזור שמור בפראוקסידאז של משפחת הסולניים, לכן ציפינו להומולוגיה לגנים המקודדים לחלבונים אחרים. שנית, בהמשך המחקר יתכן ונבדוק את פעילות גן זה ע"י השתקתו, ולשם כך דרוש לנו רצף קרוב אליו ולא בהכרח הגן עצמו.

כמו כן יש סיבה להאמין כי הרצף שרוצף בעקבות ה-race אינו מייצג את הגן בשלמותו. כאשר חושב המשקל המולקולרי של חלבון הפראוקסידאז על פי רצף זה, התברר כי המשקל המולקולרי שהתקבל (15 kDa) לא תואם למשקל המולקולרי של החלבון כפי שהוא מתקבל מהרצה על 10% SDS PAGE חצי נטיבי (כ-37 kDa) כך שכל הנראה מצויים בידנו כ-40% מהנוקלאוטידים המרכיבים את מסגרת הקריאה של הגן. כמו כן ההומולוגיה בין רצף זה לגן TPX1 חלשה במיוחד בתחילתה של מסגרת הקריאה בגן TPX1, ועל הגן שנצא בברונפליסיה לא קיים סיגנל הובלה מכל סוג שהוא. כך שניתן לשער כי חסרה חלק ממסגרת הקריאה שבה עשוי היה להמצא סיגנל שכזה. אפשרות נוספת היא שהחלבון הוא אותו החלבון שמתבטא בשורש צמח העגבניה אך תפקידו בעלי הכותרת של ברונפליסיה שונה בתכלית.

נושא יצירת ליגנין בעלי הכותרת של הברונפליסיה עדיין אינו ברור. למרות חיפושים בספרות ובדיקות שנערכו במעבדתינו, עדיין לא ידוע אם עלי הכותרת של הברונפליסיה מכילים ליגנין, ובהתאם לכך, האם יש פעילות של פראוקסידאז המעורב ביצירת ליגנין. יתכן ומצוי ליגנין בצורות ההובלה של עלי הכותרת. במקרה זה תידרש פעילות של פראוקסידאזות המעורבות ביצור ליגנין כיוון שעלי הכותרת גדלים ומתרחבים בימים שלאחר פתיחת הפרח. דרך אחת לבדוק את האפשרות שפראוקסידאז הפעיל בעלי כותרת מעורב ביצירת ליגנין היא לבצע בדיקת פעילות פראוקסידאז *in situ*. אם מירב הפעילות

תתרכז בצרורות ההובלה, ניתן יהיה להסיק כי קיימת יצירה של ליגנין בעלי הכותרת ע"י איזואנזים של פראוקסידאז.

ברצף הגן שהתקבל מצמח הברונפלוסיה הופיע המקטע החלבוני שזוהה בשלמותו, כהמשך ישיר לרצף בין ה-200bp שהוגבר קודם לכן, חוץ משינוי בחומצה אמינית אחת.

VSCADIALAAR רצף שזוהה ע"י אנליזת ה-LC-MS-MS

VSCADIALVAR רצף מתורגם על בסיס הגן שרוצף.

הצורה הנפוצה יותר בקרב הפראוקסידאזות השונות היא זו שזוהתה ע"י אנליזת ה-LC-MS-MS. במאגרי המידע היא מזוהה כחלק מהאתר הפעיל של קבוצה גדולה מאוד של פראוקסידאזות.

הצורה השנייה שתורגמה על בסיס הגן שרוצף אינה מזוהה כחלק מהאתר הפעיל של אנזים הפראוקסידאז במאגרי המידע. היא מופיעה בצורה זו רק בפראוקסידאז מסויים בצמח התרד *Spinacia oleracea*.

שוני זה עשוי לנבוע מסיבות שונות. יתכן ואחד הרצפים אינו נכון והתקבל כתוצאה מטעות בריצוף הגן שהביא להחלפת אחת מחומצות האמינו. אך סיבה זו אינה סבירה ביותר כיוון שרצף זה התקבל בשלושה ריצופים שונים של אזור זה בגן. הטעות יכולה היתה להתקבל גם מטעות בקריאת חומצות האמינו בשיטת ה-LC-MS-MS. האפשרות של טעות טכנית ניתנת להפרכה גם בהתחשב בעובדה ששני רצפי חומצות האמינו קיימים בטבע ושניים לאיזואנזים של חלבון הפראוקסידאז. מכאן ניתן להסיק שיש אפשרות שהגן שרוצף אינו מקודד לאנזים הפראוקסידאז שנוקה ע"י הקולונות. לא ניתן לדעת בשלב זה איזו משתי האופציות הוא האנזים בו אנו חושדים כמשתתף בתהליך פירוק האנטוציאנינים בפרח הברונפלוסיה.

קיים קושי בשיוך איזואנזימים של פראוקסידאז לתפקודם בצמח. בארבידופסיס קיימים 73 גנים המקודדים לפראוקסידאזות (Tognolli et al., 2002; Welinder et al., 2002), מתוכם 58 מתבטאים במהלך חיי הצמח, והשאר מתבטאים בעקבות עקות ביוטיות או אביוטיות. שיוך פונקציונלי של פראוקסידאזות אינדוידואליות מבין 73 הגנים לפראוקסידאזות בארבידופסיס עדיין לוקה בחסר. דבר זה נובע מטווח סובסטראטים רחב, בגלל שהיצור של פראוקסידאזות רקומביננטיות המכילות קבוצת heme הוא קשה ובנוסף אין קורלציה פשוטה בין הדמיון ברצף חומצות האמינו והתפקוד, כפי שניתן לראות במחקר על פראוקסידאז קשור-ליגנין באספראגוס שבו זיהו שלושה איזואנזימים של פראוקסידאז העשויים להיות מעורבים ביצירת ליגנין, אך לא הצליחו לקבוע אם רק אחד מהם מעורב או כולם גם יחד (Holm et al., 2003).

בנוסף לאפיון דפוס פעילות האיזואנזימים בשלבים השונים של התפתחות פרח הברונפלוסיה, נערך אפיון ביטוי הגן לאיזואנזים שמתבטא בשלבים השונים של התפתחות הפרח. אפיון זה נעשה ע"י ריאקצית real time PCR בעזרת תחלים שתוכננו מהמקטע בן ה-200pb שהוגבר קודם לכן. ניתן לראות כי קיים ביטוי מסויים של הגן בניצן הסגור וכי ביטוי הגן הולך ומתגבר עם התפתחות הניצן עד שעות ספורות לפני הפתיחה. שיעתוק הגן בפרח הפתוח הולך ופוחת. אם נשווה דפוס פעילות זה לפעילות האיזואנזים מספר 2 נראה שאכן קיימת פעילות מסויימת של האיזואנזים בפרח הסגור וכי פעילותו הולכת ומתגברת עם פתיחת הפרח עד שהיא מגיעה לשיא הפעילות ביום 2 ונותרת קבועה ביום 3. יתכן כי מרווח הזמן בין

שיא התבטאות הגן לבין שיא פעילות האנזים נובע מהצורך לתרגם ולייצר את האיזואנזים. תמיכה נוספת בהשערה שהגן המדובר אכן קשור לפירוק האנטוציאנינים ניתן למצא בעובדה שביטוי בעלה בוגר היא זניחה, וניתן לייחס ביטוי זה לחוסר הספציפיות של הפריימרים. בנוסף לכך בדיקת דפוס פעילות איזואנזימים של פראוקסידאז באיברי הצמח השונים של הברונפלסיה, הראתה שאיזואנזים זה לא פעיל בעלה בוגר.

כאשר יושם על הפרחים מעכב סינטזת mRNA (Vaknin et al., 2005) גם ניכר עיכוב בפירוק הצבע, מה שלא לגמרי תואם את התוצאות של ה-*real time PCR* שמראות שעיקר ביטוי הגן מתרחש בשלבים שלפני פתיחת הפרח. יתכן וחלבונים נוספים מעורבים בפירוק האנטוציאנינים והם אלו שמשועתקים לאחר פתיחת הפרח. חלבונים אלו יכולים להיות בטא-גלוקוזידאזות, שידועים כמעורבים בתהליך פירוק אנטוציאנינים.

Calderon et al (1992) חקרו את פירוק האנטוציאנינים ואנטוציאנידינים ע"י פראוקסידאזות בגפן בנוכחות מי חמצן. התוצאות שלהם הראו שאנטוציאנידינים הם סובסטרטים טובים לפראוקסידאזות של גפן. הפעילות של פראוקסידאז בקטבוליזם של אנטוציאנינים דורש את הפעילות המוקדמת של בטא-גלוקוזידאז להסרת החלק הסוכרי מהגלוקוזידים כדי לשחרר את צורות האגליקון שמחומצנות ע"י פראוקסידאז בנוכחות מי חמצן. העובדה שגם פראוקסידאז וגם בטא-גלוקוזידאז נמצאים בוקואולה תומכת במעורבות האפשרית שלהם בשינוי ופירוק אנטוציאנינים בצמח. בעבודת מחקר שהתבצעה במעבדתנו עוכבה פעילות האנזים בטא-גלוקוזידאז ע"י מעכב פעילות גלוקוזידאז D-Gluconic Acid (ואקנין 2005). בפרחים בהם עוכבה פעילות האנזים ניכרה האטה בקצב פירוק הצבע, מה שתומך במעורבות אפשרית של אנזימים אלו בפירוק, אך מפריך את האפשרות שהם המפרקים העיקריים.

על מנת לבחון את תפקיד הפראוקסידאז בצמח הברונפלסיה יש צורך בהתמרת צמח הברונפלסיה, אם באופן חולף ואם באופן קבוע. התמרה חולפת בעלי כותרת אינה תהליך נפוץ ונוסחה במספר מצומצם של צמחים. התמרה חולפת בעזרת ירי המקטע ישירות אל עלי הכותרת נוסחה בפרחי לוע הארי (Shang, 2007) ובפרחי הסחלב *Phalaenopsis* (Su and Hsu, 2003). שיטה זו אינה יעילה במקרה של פרח הברונפלסיה כיוון שהפרחים עדינים מאוד והבדלי הלחץ הדרושים לישום שיטה זו גורמים להרס עלי הכותרת, אך ניסויים ראשוניים שנערכו במעבדתנו הראו כי ירי על פקעים סגורים עשוי לפתור בעיה זו.

שיטת האינפילטרציה של חיידקי אגרובקטריום עם המקטע הנדרש להשתקת הגן הרצוי נוסחה במחקרם של Shang וחובריו (2007) שם החדירו את הגנים המדווחים GUS ו-GFP לעלי הכותרת של פרחי פטוניה וטבק. שיטה זו נוסחה בהצלחה בצמח הברונפלסיה בעזרת חיידקי אגרובקטריום המכילים את הגן המדווח GFP. בתחילה נוסחה המערכת בפרחים פתוחים, אך כיוון שתוצאות ה-*real time PCR* הראו שזמן השיעוּק העיקרי של הזן הנחשד כמעורב בפירוק הוא בשעות שלפני פתיחת הפרח, הותאמה המערכת להתמרת פקעים סגורים.

כדי לאפשר התמרה קבועה של צמח הברונפלסיה בעתיד, פותחה מערכת רגנרציה שבחנה איזה איבר צמח עובר רגנרציה יעילה ביותר, ומהו מצע הרגנרציה האופטימלי לצמח זה.

סיכום, מסקנות ומחקר עתידי

בעבודה זו היה ניסיון להוכיח את מעורבותו של אנזים ממשפחת הפראוקסידאזות בפירוק אקטיבי של אנטוציאנינים בפרח הברונפלסיה. הוכחנו שפעילות איזואנזימים מסויימים משתנה עם העלמות הצבע בפרחים, והראנו שפעילות איזואנזים מסוים תואמת לדפוס ביטוי גן לפראוקסידאז. הראינו כי איזואנזים זה פעיל בעיקר בפרחים וכי ביטוי הגן קיים בעיקר בפרחים.

על מנת לבחון את מעורבות איזואנזים ממשפחת הפראוקסידאזות בפירוק אנטוציאנינים בפרח הברונפלסיה יש לבחון את פעילותו בצמח עצמו. התמרה חולפת של פרח הברונפלסיה ע"י החדרת מקטע מן הגן שרוצף מצמח הברונפלסיה עשויה לסייע בחקר מעורבות איזואנזימים ממשפחת הפראוקסידאזות בפירוק הפיגמנט בעלי הכותרת. התמרה קבועה של צמח הברונפלסיה עשויה לסייע בחקר תפקידם של איזואנזימים מסויימים בפירוק הפיגמנט.

מערכות אלו דורשות פיתוח וכיול נוספים על מנת שיוכלו לשמש ככלי לבחינת פעילות פראוקסידאזות וגנים נוספים הקשורים לפירוק אנטוציאנינים ומגוון תהליכים ביולוגיים נוספים בצמח הברונפלסיה.

ואקנין, ה. (2005). פירוק אנטוציאנין בפרחי ברונפלסיה. עבודת גמר שהוגשה לפקולטה לחקלאות של האוניברסיטה העברית בירושלים.

Abdel-Aal, E.S.M., and Hucl, P. (2003). Composition and stability of anthocyanins in blue-grained wheat. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 2174-2180.

Amaya, I., Botella, M.A., de la Calle, M., Medina, M.I., Heredia, A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Quesada, M.A., and Valpuesta, V. (1999). Improved germination under osmotic stress of tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *FEBS Lett.* **457**, 80-84.

Andrews, J., Adams, S.R., Burton, K.S., and Evered, C.E. (2002). Subcellular localization of peroxidase in tomato fruit skin and the possible implications for the regulation of fruit growth. *J. Exp. Bot.* **53**, 2185-2191.

Andrews, J., Malone, M., Thompson, D.S., Ho, L.C., and Burton, K.S. (2000). Peroxidase isozyme patterns in the skin maturing tomato fruit. *Plant Cell Environ.* **23**, 415-422.

Asada, K. (1992). Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plantarum* **85**, 235-241.

Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 601-639.

Barcelo, A.R., Ferrer, M.A., Florenciano, E.G., and Munoz, R. (1991). The Tonoplast Localization Of 2 Basic Isoperoxidases Of High Pi In *Lupinus*. *Bot. Acta* **104**, 272-278.

Botella, M.A., Quesada, M.A., Hasegawa, P.M., and Valpuesta, V. (1993). Nucleotide-Sequences Of 2 Peroxidase Genes From Tomato (*Lycopersicon-Esculentum*). *Plant Physiol.* **103**, 665-666.

Botella, M.A., Quesada, M.A., Medina, M.I., Pliego, F., and Valpuesta, V. (1994). Induction Of A Tomato Peroxidase Gene In Vascular Tissue. *FEBS Lett.* **347**, 195-198.

Botella, M.A., Quesada, M.A., Kononowicz, A.K., Bressan, R.A., Pliego, F., Hasegawa, P.M., and Valpuesta, V. (1994). Characterization And In-Situ Localization Of A Salt-Induced Tomato Peroxidase Messenger-RNA. *Plant Mol. Biol.* **25**, 105-114.

Brenes, C.H., del Pozo-Insfran, D., and Talcott, S.T. (2005). Stability of copigmented anthocyanins and ascorbic acid in a grape juice model system. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 49-56.

Brenzel, K.N. (2001). *Western Garden Book*. (Sunset Publishing Corporation).

- Breviario, D., Giani, S., Divietri, P., and Coraggio, I.** (1992). Auxin and growth-regulation of rice Coleoptile segments - molecular analysis. *Plant Physiol.* **98**, 488-495.
- Bridle, P., and Timberlake, C.F.** (1997). Anthocyanins as natural food colours - Selected aspects. *Food Chem.* **58**, 103-109.
- Brouillard, R.** (1981). The chemistry of anthocyanin pigments.7. origin of the exceptional color stability of the Zebrina anthocyanin. *Phytochemistry* **20**, 143-145.
- Brouillard, R.** (1988). Flavonoids and flower colour. In *The Flavonoids. Advance In Research Since 1986*, J.B. Harbone, ed (London: Chapman and Hall LTD).
- Calderon, A.A., Garciaflorenciano, E., Munoz, R., and Barcelo, A.R.** (1992). Gamay grapevine peroxidase - its role in vacuolar anthocyanin(di) degradation. *VITIS* **31 (3)**, 139-147.
- Cevallos-Casals, B.A., and Cisneros-Zevallos, L.** (2004). Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. *Food Chem.* **86**, 69-77.
- Chevalier, T., de Rigal, D., Mbeguie-A-Mbeguie, D., Gaillard, F., Richard-Forget, F., and Fils-Lycaon, B.R.** (1999). Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase. *Plant Physiol.* **119**, 1261-1269.
- Christie, P.J., Alfenito, M.R., and Walbot, V.** (1994). Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* **194**, 541-549.
- Claus, H.** (2004). Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* **35**, 93-96.
- Dehon, L., Macheix, J.J., and Durand, M.** (2002). Involvement of peroxidases in the formation of the brown coloration of heartwood in *Juglans nigra*. *J. Exp. Bot.* **53**, 303-311.
- Dehon, L., Mondolot, L., Durand, M., Chalies, C., Andary, C., and Macheix, J.J.** (2001). Differential compartmentation of o-diphenols and peroxidase activity in the inner sapwood of the *Juglans nigra* tree. *Plant Physiol. Biochem.* **39**, 473-477.
- Del Pozo-Insfran, D., Balaban, M.O., and Talcott, S.T.** (2006). Enhancing the retention of phytochemicals and organoleptic attributes in muscadine grape juice through a combined approach between dense phase CO₂ processing and copigmentation. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 6705-6712.
- Dougall, D.K., and Vogelien, D.L.** (1987). The stability of accumulated anthocyanin in suspension-cultures of the parental line and high and low accumulating subclones of wild carrot. *Plant Cell Tiss. Org.* **8 (2)**, 113-123.

- Duroux, L., and Welinder, K.G.** (2003). The peroxidase gene family in plants: A phylogenetic overview. *J. Mol. Evol.* **57**, 397-407.
- El Mansouri, I., Mercado, J.A., Santiago-Domenech, N., Pliego-Alfaro, F., Valpuesta, V., and Quesada, M.A.** (1999). Biochemical and phenotypical characterization of transgenic tomato plants overexpressing a basic peroxidase. *Physiol. Plantarum* **106**, 355-362.
- Garzon, G.A., and Wrolstad, R.E.** (2001). The stability of pelargonidin-based anthocyanins at varying water activity. *Food Chem.* **75**, 185-196.
- Gong, Q.Q., and Tian, S.P.** (2002). Partial characterization of soluble peroxidase in pericarp of litchi fruit. *Prog. Biochem. Biophys.* **29**, 891-896.
- Gradinaru, G., Biliaderis, C.G., Kallithraka, S., Kefalas, P., and Garcia-Viguera, C.** (2003). Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition. *Food Chem.* **83**, 423-436.
- Gutierrez, I.H.** (2003). Influence of ethanol content on the extent of copigmentation in a Cencibel young red wine. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 4079-4083.
- Haffner, K., Finstad, M.B., Rosenfeld, H.J., and Skrede, G.** (2003). Colour of raspberry jam as influenced by cultivar, temperature and light during storage. *Acta Hort.* **628**, 829-834.
- Halevy, A.H.** (1985). *Handbook of Flowering.* (CRC).
- Harbone, J.B.** (1984). *Phytochemical method.* (London: Chapman and Hall LTD.).
- Heide, O.M.** (1963). Effect of temperature and day-length on flower initiation of *brunfelsia calycina* (Hook) benth. *Physiol. Plantarum* **16**, 104-109.
- Henshaw, G.G., Jha, K.K., Mehta, A.R., Shakesha.Dj, and Street, H.E.** (1966). Studies on growth in culture of plant cells.1. growth patterns in batch propagated suspension cultures *J. Exp. Bot* **17**, 362-377
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., and Matsui, H.** (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol.* **42**, 462-468.
- Hiraga, S., Yamamoto, K., Ito, H., Sasaki, K., Matsui, H., Honma, M., Nagamura, Y., Sasaki, T., and Ohashi, Y.** (2000). Diverse expression profiles of 21 rice peroxidase genes. *FEBS Lett.* **471**, 245-250.
- Holm, K.B., Andreasen, P.H., Eckloff, R.M.G., Kristensen, B.K., and Rasmussen, S.K.** (2003). Three differentially expressed basic peroxidases from wound-lignifying *Asparagus officinalis*. *J. Exp. Bot.* **54**, 2275-2284.
- Ishikawa, T., Yoshimura, K., Sakai, K., Tamoi, M., Takeda, T., and Shigeoka, S.** (1998). Molecular characterization and physiological role of a glyoxysome-bound ascorbate peroxidase from spinach. *Plant Cell Physiol.* **39**, 23-34.

- Janna, O.A., Khairul, A., Maziah, M., and Mohd, Y.** (2006). Flower pigment analysis of *Melastoma malabathricum*. *Afr. J. Biotechnol.* **5**, 170-174.
- Jespersen, H.M., Kjaersgard, I.V.H., Ostergaard, L., and Welinder, K.G.** (1997). From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase. *Biochem. J.* **326**, 305-310.
- Jiang, Y.M., and Fu, J.R.** (1999). Biochemical and physiological changes involved in browning of litchi fruit caused by water loss. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **74**, 43-46.
- Jiang, Y.M., and Li, Y.B.** (2003). Effects of low-temperature acclimation on browning of litchi fruit in relation to shelf life. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **78**, 437-440.
- Jiang, Y.M., Fu, J.R., Zauberman, G., and Fuchs, Y.** (1999). Purification of polyphenol oxidase and the browning control of litchi fruit by glutathione and citric acid. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 950-954.
- Jiang, Y.M., Duan, X.W., Joyce, D., Zhang, Z.Q., and Li, J.R.** (2004). Advances in understanding of enzymatic browning in harvested litchi fruit. *Food Chem.* **88**, 443-446.
- Jonsson, L.M.V., Donker Koopman, W.E., and Schram, A.W.** (1984). Turnover of anthocyanins and tissue compartmentation of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Petunia hybrida*. *J. Plant Physiol.* **115**, 29-37.
- Kader, F., Nicolas, J.P., and Metche, M.** (1999). Degradation of pelargonidin 3-glucoside in the presence of chlorogenic acid and blueberry polyphenol oxidase. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 517-522.
- Kader, F., Haluk, J.P., Nicolas, J.P., and Metche, M.** (1998). Degradation of cyanidin 3-glucoside by blueberry polyphenol oxidase: kinetic studies and mechanisms. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 3060-3065.
- Kader, F., Irmouli, M., Nicolas, J.P., and Metche, M.** (2002). Involvement of blueberry peroxidase in the mechanisms of anthocyanin degradation in blueberry juice. *J. Food Sci.* **67**, 910-915.
- Kirca, A., Ozkan, M., and Cemeroglu, B.** (2006). Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. *Food Chem.* **97**, 598-605.
- Koes, R.E., Spelt, C.E., Elzen, P.J.M.v.d., and Mol, J.N.M.** (1989). Cloning and molecular characterization of the chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida*. *Gene* **81**, 245-257.
- Leyva, A., Jarillo, J.A., Salinas, J., and Martinez Zapater, J.M.** (1995). Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs of *Arabidopsis thaliana* in a light-dependent manner. *Plant Physiol.* **108**, 39-46.

- Lin, Z.F., Li, S.S., Zhang, D.L., Lin, G.Z., Li, Y.B., Liu, S.X., and Chen, M.D.** (1988). The changes of pigments, phenolic content and activities of polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia-lyase in pericarp of postharvest litchi fruit. *Acta Bot. Sin.* **30**, 40-45.
- Maccarone, E., Maccarrone, A., and Rapisarda, P.** (1985). Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice. *J. Food Sci.* **50**, 901-904.
- Maccarone, E., Maccarrone, A., and Rapisarda, P.** (1987). Color stabilization of orange fruit juice by tannic-acid. *Int. J. Food Sci. Technol.* **22**, 159-162.
- Markakis, P., Livingston, G.E., and Fellers, R.C.** (1957). Quantitative aspect of strawberry pigment degradation. *Food Res. Intern.* **22**, 117-121.
- Marusek, C.M., Trobaugh, N.M., Flurkey, W.H., and Inlow, J.K.** (2006). Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *J. Inorg. Biochem.* **100**, 108-123.
- Matsufuji, H., Otsuki, T., Takeda, T., Chino, M., and Takeda, M.** (2003). Identification of reaction products of acylated anthocyanins from red radish with peroxy radicals. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3157-3161.
- Mayer, A.M.** (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry* **67**, 2318-2331.
- Mayer, A.M., and Staples, R.C.** (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* **60**, 551-565.
- Mazza, G., and Brouillard, R.** (1990). The mechanism of copigmentation of anthocyanins in aqueous-solutions. *Phytochemistry* **29**, 1097-1102.
- Mazza, G., and Miniati, E.** (1993). Color stabilization and intensification. In *Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains*. G. Mazza and E. Miniati, eds (Boca Raton, Florida; USA: CRC Press), pp. 1-20.
- McCaig, B.C., Meagher, R.B., and Dean, J.F.D.** (2005). Gene structure and molecular analysis of the laccase-like multicopper oxidase (LMCO) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **221**, 619-636.
- McDougall, G.J.** (1991). Cell-wall-associated peroxidases and lignification during growth of flax fibers. *J. Plant Physiol.* **139**, 182-186.
- McDougall, G.J.** (1992). Changes in cell wall-associated peroxidases during the lignification of flax fibers. *Phytochemistry* **31**, 3385-3389.
- Medina, M.I., Botella, M.A., Quesada, M.A., and Valpuesta, V.** (1997). Expression of a highly basic peroxidase gene in NaCl-adapted tomato cell suspensions. *FEBS Lett.* **407**, 357-360.
- Mercado, J.A., Matas, A.J., Heredia, A., Valpuesta, V., and Quesada, M.A.** (2004). Changes in the water binding characteristics of the cell walls from

- transgenic *Nicotiana tabacum* leaves with enhanced levels of peroxidase activity. *Physiol. Plantarum* **122**, 504-512.
- Miniati, E., Damiani, P., and Mazza, G.** (1992). Copigmentation and self-association of anthocyanins in food model systems. *Itali. J. Food Sci.* **4**, 109-116.
- Mol, J., Grotewold, E., and Koes, R.** (1998). How genes paint flowers and seeds. *Trends Plant Sci.* **3**, 212-217.
- Mori, K., Goto-Yamamoto, N., Kitayama, M., and Hashizume, K.** (2007). Effect of high temperature on anthocyanin composition and transcription of flavonoid hydroxylase genes in 'Pinot noir' grapes (*Vitis vinifera*). *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **82**, 199-206.
- Narita, H., Asaka, Y., Ikura, K., Matsumoto, S., and Sasaki, R.** (1995). Isolation, characterization and expression of cationic peroxidase isozymes released into the medium of cultured tobacco cells. *Eur. J. Biochem.* **228**, 855-862.
- Nissim-Levi, A., Kagan, S., Ovadia, R., and Oren-Shamir, M.** (2003). Effects of temperature, UV-light and magnesium on anthocyanin pigmentation in cocoplum leaves. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **78**, 61-64.
- Niyogi, K.K.** (1999). Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 333-359.
- Ono, E., Hatayama, M., Isono, Y., Sato, T., Watanabe, R., Yonekura-Sakakibara, K., Fukuchi-Mizutani, M., Tanaka, Y., Kusumi, T., Nishino, T., and Nakayama, T.** (2006). Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles. *Plant J.* **45**, 133-143.
- Oren-Shamir, M., and Levi-Nissim, A.** (1997). Temperature effects on the leaf pigmentation of *Cotinus coggygia* 'Royal Purple'. *J. Hortic. Sci.* **72**, 425-432.
- Oren-Shamir, M., and Nissim-Levi, A.** (1999). Temperature and gibberellin effects on growth and anthocyanin pigmentation in Photinia leaves. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **74**, 355-360.
- Otter, T., and Polle, A.** (1994). The influence of apoplastic ascorbate on the activities of cell wall-associated peroxidase and nadh oxidase in needles of norway spruce (*Picea-Abies* L). *Plant Cell Physiol.* **35**, 1231-1238.
- Otter, T., and Polle, A.** (1997). Characterisation of acidic and basic apoplastic peroxidases from needles of Norway spruce (*Picea abies*, L, Karsten) with respect to lignifying substrates. *Plant Cell Physiol.* **38**, 595-602.
- Passardi, F., Penel, C., and Dunand, C.** (2004). Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci.* **9**, 534-540.
- Perez-Vicente, A., Serrano, P., Abellan, P., and Garcia-Viguera, C.** (2004). Influence of packaging material on pomegranate juice colour and bioactive compounds, during storage. *J. Sci. Food Agric.* **84**, 639-644.

- Pourcel, L., Routaboul, J.M., Kerhoas, L., Caboche, M., Lepiniec, L., and Debeaujon, I.** (2005). TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in Arabidopsis seed coat. *Plant Cell* **17**, 2966-2980.
- Quiroga, M., Guerrero, C., Botella, M.A., Barcelo, A., Amaya, I., Medina, M.I., Alonso, F.J., de Forchetti, S.M., Tigier, H., and Valpuesta, V.** (2000). A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol.* **122**, 1119-1127.
- Ranocha, P., McDougall, G., Hawkins, S., Sterjiades, R., Borderies, G., Stewart, D., Cabanes-Macheteau, M., Boudet, A.M., and Goffner, D.** (1999). Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases - a divergent gene family - in poplar. *Eur. J. Biochem.* **259**, 485-495.
- Riva, S.** (2006). Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol.* **24**, 219-226.
- Sankat, C.K., Basanta, A., and Maharaj, V.** (2000). Light mediated red colour degradation of the pomegranate (*Syzygium malaccense*) in refrigerated storage. *Postharvest Biol. Technol.* **18**, 253-257.
- Schultes, R.E.** (1966). Search for new natural hallucinogens. *Lloydia* **29**, 293-308.
- Schultes, R.E.** (1969). Hallucinogens of Plant Origin. *Science* **163**, 245-254.
- Schultes, R.E., and Holmsted.B.** (1971). Comments on poisonous plants from tropical new world.8. Miscellaneous plants of South-America. *Lloydia* **34**, 61-90
- Shaked-Sachray, L., Weiss, D., Reuveni, M., Nissim-Levi, A., and Oren-Shamir, M.** (2002). Increased anthocyanin accumulation in aster flowers at elevated temperatures due to magnesium treatment. *Physiol. Plantarum* **114**, 559-565.
- Shang, Y., Schwinn, K.E., Bennett, M.J., Hunter, D.A., Waugh, T.L., Pathirana, N.N., Brummell, D.A., Jameson, P.E., and Davies, K.M.** (2007). Methods for transient assay of gene function in floral tissues. *Plant Methods* **3**:1.
- Simpson, K.L.** (1985). Chemical changes in food during processing. In *Chemical Changes in Natural Food Pigments*, T.R.a.J.W. Finley, ed (New York: Van Nostrand Reinhold), pp. 409-441.
- Steiner, D., Aharoni, A., Banin, U., and Millo, O.** (2006). Level structure of InAs quantum dots in two-dimensional assemblies. *Nano Lett.* **6**, 2201-2205.
- Su, V., and Hsu, B.D.** (2003). Cloning and expression of a putative cytochrome P450 gene that influences the colour of *Phalaenopsis* flowers. *Biotechnol. Lett.* **25**, 1933-1939.
- Sussman, J., Aharoni, A., Harel, M., Gaidukov, L., Brumshtein, B., Khersonsky, O., Yagur, S., Toker, L., Silman, I., and Tawfik, D.** (2006). 3D structure of mammalian paraoxonase at 2.2 Å resolution. *Toxicol. Lett.* **164**.

- Takahama, U.** (1992). Hydrogen-peroxide scavenging systems in vacuoles of mesophyll-cells of *Vicia faba*. *Phytochemistry* **31**, 1127-1133.
- Takahama, U.** (1993). Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics by ascorbic-acid - different effects of ascorbic-acid on the oxidation of coniferyl alcohol by the apoplastic soluble and cell wall-bound peroxidases from epicotyls of *Vigna angularis*. *Plant Cell Physiol.* **34**, 809-817.
- Takahama, U., and Oniki, T.** (1992). Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics in the apoplast of spinach leaves by ascorbate. *Plant Cell Physiol.* **33**, 379-387.
- Talcott, S.T., Peele, J.E., and Brenes, C.H.** (2005). Red clover isoflavonoids as anthocyanin color enhancing agents in muscadine wine and juice. *Food Res. Intern.* **38**, 1205-1212.
- Teh, L.S., and Francis, F.J.** (1988). Stability of anthocyanins from *Zebrina pendula* and *Ipomoea tricolor* in a model beverage. *J. Food Sci.* **53**, 1580-1581.
- Thomas, R.L., and Jen, J.J.** (1980). The cytochemical-localization of peroxidase in tomato fruit cells. *J. Food Biochem.* **4**, 247-259.
- Tognolli, M., Penel, C., Greppin, H., and Simon, P.** (2002). Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **288**, 129-138.
- Tseng, K.C., Chang, H.M., and Wu, J.S.B.** (2006). Degradation kinetics of anthocyanin in ethanolic solutions. *J. Food Process Preserv.* **30**, 503-514.
- Underhill, S.J.R., and Critchley, C.** (1995). Cellular localisation of polyphenol oxidase and peroxidase activity in *Litchi chinensis* Sonn. pericarp. *Aust. J. Plant Physiol.* **22**, 627-632.
- Vaknin, H., Bar-Akiva, A., Ovadia, R., Nissim-Levi, A., Forer, I., Weiss, D., and Oren-Shamir, M.** (2005). Active anthocyanin degradation in *Brunfelsia calycina* (yesterday-today-tomorrow) flowers. *Planta* **222**, 19-26.
- Welinder, K.G., and Gajhede, M.** (1993). Structure and evolution of peroxidases. In *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*, K.G. Welinder, S.K. Rasmussen, C.P. Enel, and H. Greppin, eds (Geneva: University of Geneva, Switzerland).
- Welinder, K.G., Justesen, A.F., Kjaersgard, I.V.H., Jensen, R.B., Rasmussen, S.K., Jespersen, H.M., and Duroux, L.** (2002). Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.* **269**, 6063-6081.
- Winkel-Shirley, B.** (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* **126**, 485-493.

- Yamaguchi, K., Mori, H., and Nishimura, M.** (1995). A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. *Plant Cell Physiol.* **36**, 1157-1162.
- Yoruk, R., and Marshall, M.R.** (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *J. Food Biochem.* **27**, 361-422.
- Zapata, J.M., Calderon, A.A., and Barcelo, A.R.** (1995). Actual browning and peroxidase level are not correlated in red and white berries from grapevine (*Vitis vinifera*) cultivars. *Fruit Varieties Journal* **49**, 82-84.
- Zhang, W., Seki, M., and Furusaki, S.** (1997). Effect of temperature and its shift on growth and anthocyanin production in suspension cultures of strawberry cells. *Plant Sci.* **127**, 207-214.
- Zhang, Z.Q., Pang, X.Q., Duan, X.W., Ji, Z.L., and Jiang, Y.M.** (2005). Role of peroxidase in anthocyanin degradation in litchi fruit pericarp. *Food Chem.* **90**, 47-52.
- Zhong, J., and Yoshida, T.** (1993). Effect of temperature on cell growth and anthocyanin production in suspension cultures of *Perilla frutescens*. *J. Ferment. Bioeng.* **76**, 530-531.
- Zimmer, k.** (2000). *Brunfelsia pauciflora* var calycina. In CRC Handbook of Flowering, A.H. Halevy, ed (Boca Raton: CRC Press, Inc.), pp. 85-88.
- Ziv, M.** (1989). Enhanced shoot and cormlet proliferation in liquid cultured gladiolus buds by growth-retardants. *Plant Cell Tiss. Org.* **17**, 101-110.

Abstract

The primary group of pigments in plants, comprised of hundreds of components, is the anthocyanin group. Anthocyanins accumulate in the epidermal cell vacuoles in flower petals and also in other plant organs, such as the stem, leaves and fruit. They are responsible for colors ranging from pink and red to blue. The stability of these pigments depends on microenvironmental conditions in the vacuole, such as metal and flavonoid concentration and pH conditions.

The biosynthetic course of the anthocyanins as part of the phenylpropanoid pathway has been thoroughly researched and characterized in several model plants, such as *Arabidopsis*, *petunia* and maize sprouts. Contrary to the detailed molecular information available of the synthesis, there is very little information on the stability and catabolism of these pigments in plant tissue. Despite this, it is clear that a degradation process does occur in plant anthocyanins and it is reasonable to assume that this breakdown process significantly influences the color of agricultural products. Research conducted on the litchi fruit has shown that there is a breakdown of anthocyanins in the husk of the fruit during storage. There has also been research proving an enzymatic breakdown of anthocyanins in blueberry juice. In another study conducted recently on vines, they show a breakdown of marked anthocyanins following exposure to high temperatures.

In our laboratory, we have recently characterized an active degradation process of anthocyanins and proven that there is a need to create new proteins in order to break down color. As far as we know, this study is the first to describe active degradation, *in planta*, of anthocyanins. The *Brunfelsia* flowers serve as an excellent subject for study on anthocyanin degradation for several reasons: (1) The flowers undergo a dramatic and rapid color change from dark purple on the day of their unfurling and then stark white two days later. This change is the result of decreased levels of pigments in the tissue (2) This process of anthocyanin breakdown occurs even when the flowers are detached from the plant on the day of their unfurling and dipped in a sucrose solution (3) Belonging to the Solanaceae

Family, studying *Brunfelsia* allows us to characterize the proteins or genes by comparing them to other model plants from this family, such as the tomato and tobacco.

Based on studies conducted on wine and fruit juices, likely candidates for enzymatic anthocyanin degradation are peroxidases. This group of enzymes is usually active in most cell organelles, including the cell vacuoles. In a preliminary study in our lab, we saw a clear correlation between general peroxidase activity and anthocyanin degradation in *Brunfelsia*. In this study we examined the involvement of isoenzymes from the peroxidase family in active anthocyanin degradation in the *Brunfelsia* flower, and we developed transformation and regeneration systems that will serve to examine enzymatic activity of these enzymes in the *Brunfelsia* plant.

There are several isoenzymes of the peroxidase family active in the *Brunfelsia* flower and their level of activity varies with the development of the flower and the fading of its hue. On seeing enzymatic activity in the various plant organs we observed differential activity of the peroxidase family isoenzymes. The active isoenzymes in the flower barely appear in the other plant organs. The activity of two isoenzymes was observed in the mature leaf and to a much lesser degree in a young leaf.

We observed that the activity of several peroxidase isoenzymes increased in correlation to the pigment degradation. Isolation of those enzymes was conducted by running soluble protein extracts from the *Brunfelsia* flower on an Ion exchange and gel filtration columns. One protein with peroxidase activity was isolated and sent for LC-MS-MS analysis. The analysis revealed a partial sequence homologous to peroxidase enzymes. Along with isolating the peroxidase protein, we also isolated a partial sequence from a peroxidase gene expressed in the *Brunfelsia* flower. This sequence is highly homologous with two tomato genes encoding for peroxidase involved in a process of creating lignin in tomato roots. In comparison to these sequences, the gene sequence isolated from the *Brunfelsia* represents around 40% of the whole gene sequence. As there is no information about anthocyanin-degrading enzymes of the whole plant in relevant literature, it is possible that the result of this gene in the *Brunfelsia* is activity related to pigment breakdown.

The expression of this isolated gene during the flowers development and the anthocyanin degradation was examined with real time PCR reactions conducted on the cDNA that originated from the RNA derived from plants in various developmental

stages. The expression level was found to peak several hours before flower opening and decreased to very low levels by day 2 after opening. These results strengthen the possibility that the isolated gene product may be involved in anthocyanin degradation.

Continued research of the gene activity of the Brunfelsia plant requires transient transformation or permanent transformation of the Brunfelsia plant. For this purpose, transformation and regeneration systems were developed for the Brunfelsia plant. Transformation systems for flowers were developed using agrobacterium that contain the GFP reporter gene. The regeneration system was developed by comparing the reaction of various plant organs to mediums with similar hormonal components. In this experiment we determined that the optimal plant organ for regeneration is a young leaf as it has the optimal medium for regeneration.

In summation, in this study we have proven that the activity of several peroxidase isoenzymes increases in correlation with color fading, and this increase is in relation to the increase in expression of the isolated peroxidase gene. Furthermore, we have developed systems that will serve in future study of enzymatic activity in the Brunfelsia plant.