

מסלולי ביוסינתיזה לייצור פרמוני מין והבקרה ע"י PBAN  
בשני מיני פרפראיים מייצגים, *Helicoverpa armigera*,  
: *Plodia interpunctella*, Pyralidae-ו Noctuidae  
שלבי מפתח במסלולי הביוסינתיזה

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

מאת  
אורן צפדיה

עבודה זו נעשתה בהדרכתה שלי:

**פרופ' עדה רפאלי**

המכון לטכנולוגיה ואחסון של תוצרת חקלאית,  
מנהל המחקר החקלאי, בית דגן.

תודות,

ברצוני להודות מעומק לבי לפרופ' עדה רפאלי על ההדרכה, העזרה, התמיכה ותחושת האמהות (אנא קבלי התנצלותי שלא סיפקתי "נכד" נוסף ...).  
לאביהו עזריאלי על עזרתו הרבה במעבדה ובגידול העשים והשיחות ההזויות.  
לד"ר ענת זדה על העבודה עם מכשיר ה-GC/MS וד"ר לילי פלח על הזרקת הדוגמאות.  
לחברי למעבדה זין, אורלי ודנה על שסבלתם אותי והייתם במה לשטויות שלי...  
לתמר צור על היותה תמר צור!  
לערני היקר על העזרה עם התמונות.  
לארבעת אחי היקרים: כהן, ערני, מלר וגולו על שאתם תמיד שם.  
להורי ולאחותי שהביאוני עד הלום, על אהבתם וסבלנותם.  
ולבסוף תודה מיוחדת לבנות שבחיי, ענבל אהבת חיי ומוקלולי כלבתי המתוקה. על האהבה האין סופית וההשראה לחיים שאתן מספקות לי בכל יום !! המון המון תודה לכן!!!

## תקציר

עשים הם אחת מקבוצות החרקים המזיקים העיקריות בחקלאות. כיום קיימות מספר שיטות המבוססות על חומרי הדברה כימית, בכדי לבקר את אוכלוסיית העשים בשדות ואסמי האחסון של התוצרת החקלאית. בשנים האחרונות, מטעמים של בריאות, מודעות לאיכות הסביבה ופיתוח עמידות על ידי העשים לחומרי ההדברה, קיימת מגמה של פיתוח אסטרטגיות לניהול אוכלוסיית העש באופן שיפחית את השימוש בחומרים רעילים במזון ותוצרת חקלאית. אחת הדרכים לעשות כן, היא על ידי בקרת פוריות נקבות העש. במיני עשים רבים תקשורת כימית היא הדרך של זכרים ונקבות להיפגש למטרת זיווג ורבייה. ברוב המינים הנקבה משחררת תערובת של פרומון מין שנועדה למשוך באופן ספציפי זכרים מאותו המין, לצורך הזדווגות ורבייה. הבנה של השלבים העיקריים במסלול הביוסינתזה של פרומון המין בנקבה ומנגנוני הבקרה המולקולאריים של אנזימי מפתח המעורבים בייצור פרמוני המין, תספק כלים לפיתוח שיטות להפרעה של ייצור פרומון המין בעתיד ובכך תסלול את הדרך לעיכוב ההתנהגות הרבייתית במיני עשים המזיקים בחקלאות.

עבודה זו התמקדה בפענוח שלבי המפתח במסלולי ייצור פרומון המין של שני מיני עשים מייצגים: *Helicoverpa armigera* ו *Plodia interpunctella*. ייצור הפרומון מתרחש בגוף הנקבה בבלוטת הפרומון הנמצאת בין הפרק השמיני לתשיעי בבטן הנקבה. התחלת ייצור הפרומון בשני המינים הנ"ל זהה לביוסינתזה של חומצות שומן. אנזים המפתח בתהליך ייצור חומצות השומן, הנחשב כאנזים המפתח בייצור פרמוני מין, הוא האנזים acetyl coenzyme A carboxylase (ACCase). אנזים זה אחראי על מעבר acetyl CoA ל-malonyl CoA. כמו במיני עשים רבים המשתמשים בחומצות שומן כפרקורסרים לייצור פרומון המין, גם אצל שני המינים הנ"ל המנגנון העיקרי המבקר את ייצור הפרומון, הוא הניורופפטיד: Phormone Biosynthesis Activating Neuropeptide (PBAN) (Rafaeli, 2002, Rafaeli & Jurenka, 2003).

בעבודה זו בוצעו ניסויי ביוסינתזה (*in vitro*) המשתמשים בטכניקת מעבד אחר הפיכתם של פרקורסרים מסומנים לתוצרי הביניים ולתרכובת הפרומון הסופית בנוכחות PBAN ובהעדרו. חדירת הפרקורסרים המסומנים נוטרה בעזרת מכשיר GC/MS (Jurenka, 2003). בניסויים אלו הוכח כי גם ב- *P. interpunctella* וגם ב- *H. armigera*, PBAN משפיע על אנזים ה-ACCase. לכן ניתן להסיק כי זהו השלב הקובע את קצב יצירת פרומון המין בשני מיני העשים.

בשלבים שלאחר יצירת חומצת השומן, במסלול יצירת הפרומון, נקבעים אורך השרשרת הסופית, כמות הקשרים הכפולים ואופי הקבוצה הפונקציונאלית. תרכובת הפרומון העיקרית של *P. interpunctella*, Z9, E12 tetradecenyl acetate, היא שרשרת בת ארבע עשר פחמנים המכילה שני קשרים כפולים. מכאן שלאחר יצירת החומצה הפלמיטית (16:CoA), חל קיצור של זוג פחמנים והוספה של שני קשרים כפולים. האופן שבו מתרחשים שלבי

הסיום במסלול הביוסינתיזה בעש *P. interpunctella*, פוענח גם הוא ע"י ניסויי ביוסינתיזה עם הפרקורסרים המסומנים  $d_3-16:COOH$  ו  $d_3-14:COOH$  שהראו סימון בתרכובת הפרומון העיקרית.

המשמעות של תוצאות אלו הן שלאחר יצירת חומצת השומן הפלמיטית במסלול יצירת הפרומון של *P. interpunctella*, חלה הפחתה של שני פחמנים לקבלת חומצת שומן בת ארבעה עשר פחמנים ולה מתווספים שני הקשרים הכפולים ע"י אנזימי *desaturase*, לקבלת מרכיב הפרומון העיקרי Z9, E12 tetradecenyl acetate. תוצאות אלו מוכיחות את השימוש באנזימי  $\delta 9$ -*desaturase* ו  $\delta 12$ -*desaturase* בבלוטת פרומון המין במסלול יצירת הפרומון.

השלב הבא בעבודה עסק באפיון הגנים המקודדים לאנזימי *desaturase*, בבלוטת המין של העש *P. interpunctella*. בתחילה זוהו, כפי שנעשה בעבר, ה- *central region* של תשעת הגנים הפוטנציאליים המקודדים לאנזימי  $\delta$ -*desaturase* (Knipple *et al.*, 2002), בבלוטת פרומון המין של *P. interpunctella*. כמו כן הוכחה הספציפיות שלהם לנקבה בלבד. לאחר מכן נערכו ניסויים לזיהוי רמת הביטוי של כל אחד מהם בבלוטת הפרומון תוך כדי שימוש ב-PCR כמותי (qRT-PCR). מהתוצאות ניתן להסיק בזהירות, כי הגנים AF482924 ו AF482923, הם אלו המקודדים לאנזימי  $\delta 9$ -*desaturase* ו  $\delta 12$ -*desaturase* המשתתפים בתהליך ייצור הפרומון של *P. interpunctella*.

חשוב לציין שבכדי להוכיח טענה זו ולהתאים לכל גן את האנזים לו הוא מקודד, יש צורך לבדוק את הגן במלואו ולבצע אפיון ביוכימי לשני הגנים הנ"ל על ידי טרנספורמציה וביטוי בתאים שבאופן טבעי אינם מבטאים גנים אלו (functional assay). אפשרות נוספת להוכחת אחריותם של גנים אלו ליצירת הקשרים הכפולים במסלול הפרומון, היא ע"י השתקה מוצלחת של שני גנים אלו בטכניקת RNAi, ובדיקת ההשפעה על רמת ייצור הפרומון. ניסוי ראשוני שכזה נערך גם הוא בעבודה זו.

## תוכן העניינים

7.....	רשימת קיצורים.....
8.....	רשימת טבלאות.....
9.....	רשימת איורים ותמונות.....
10.....	<b>1. מבוא כללי.....</b>
10.....	1.1 הקדמה.....
10.....	1.2 תקשורת כימית.....
12.....	1.3 ביוסינתזה של פרמוני מין בעשים.....
12.....	1.4 בקרה על ייצור פרמוני המין בעשים.....
15.....	<b>2. פענוח שלבי מפתח במסלול הביוסינתזה בשני מיני עשים מייצגים.....</b>
15.....	<b>2.1 מבוא.....</b>
15.....	2.1.1 אפיון מסלולי ביוסינתזה של פרמוני מין בעשים.....
15.....	2.1.2 פענוח שלבי המפתח במסלולי הביוסינתזה.....
17.....	<b>2.2 שיטות וחומרים.....</b>
17.....	2.2.1 גידול החרקים.....
17.....	2.2.1.1 גידול <i>Plodia interpunctella</i> .....
18.....	2.2.1.2 גידול <i>Helicoverpa armigera</i> .....
18.....	2.2.2 ניסויי <i>in vitro</i> לאפיון שלבי מפתח במסלול ייצור הפרומון.....
18.....	2.2.2.1 הכנת הבלוטות לניסויי <i>in vitro</i> .....
	2.2.2.1.1 הכנת הבלוטות לניסויי <i>in vitro</i> עם sodium acetate ו malonyl
18.....	coenzyme A כפרקורסור.....
	2.2.2.1.2 הכנת הבלוטות לניסויי <i>in vitro</i> עם חומצות שומן מסומנות כפרקורסור
19.....	.....
19.....	2.2.1.2.3 הפרדה ב- GC/MS.....
20.....	2.2.3 אנליזת אינקורפורציה ומבחני סטטיסטיקה.....
21.....	<b>2.3 תוצאות.....</b>
	2.3.1 אינקורפורציה של פרקורסרים מסומנות לתוך תרכובת הפרומון העיקריות של
21.....	<i>P. interpunctella</i> ו <i>H. armigera</i> ( <i>de novo</i> ).....
21.....	2.3.1.1 אינקורפורציה של $^{14}\text{C}$ sodium acetate.....
22.....	2.3.1.2 אינקורפורציה של $^{13}\text{C}$ sodium acetate.....
24.....	2.3.1.3 אינקורפורציה של חומצות שומן מסומנות ב-deuterium.....
25.....	2.3.1.4 אינקורפורציה של חומצת השומן $\text{d}_3\text{-16:COOH}$ .....
26.....	2.3.1.5 אינקורפורציה של חומצת השומן $\text{d}_3\text{-14:COOH}$ .....
29.....	2.3.1.6 אינקורפורציה של $^{13}\text{C}$ malonyl coenzyme A.....

31.....	<b>2.4 דיון ומסקנות</b>
	<b>3. קביעת רמת הביטוי של גנים המקודדים ל-<math>\delta</math>-desaturase</b>
35.....	<b>בבלוטת הפרומון של <i>Plodia interpunctella</i></b>
35.....	<b>3.1 מבוא</b>
35.....	3.1.1 אנזימי - $\delta$ -desaturase
36.....	3.1.2 התבטאות גני $\delta$ -desaturase בעש <i>Plodia interpunctella</i>
36.....	<b>3.2 שיטות וחומרים</b>
	3.2.1 בידוד 9 גני $\delta$ -desaturase של <i>P. interpunctella</i>
36.....	מ-cDNA של בלוטות הפרומון
36.....	3.2.1.1 הפקת RNA
	3.2.1.2 בידוד ושיבוט של 9 הגנים המקודדים ל- $\delta$ -desaturase
37.....	מ-cDNA של בלוטות הפרומון
	3.2.1.3 חיפוש אחר 9 גני $\delta$ -desaturase
37.....	של <i>P. interpunctella</i> כביקורת אצל זכרים
38.....	3.2.2 אפיון רמת הביטוי של הגנים תוך שימוש ב-PCR כמותי (qRT-PCR)
38.....	3.2.2.1 תכנון תחלים עבור ריאקציות qRT-PCR
38.....	3.2.2.2 אימות הספציפיות של תוצרי ה-qRT-PCR באמצעות PCR
39.....	3.2.2.3 ריאקציות qRT-PCR
40.....	3.2.3 ניסיון להשתקת ביטוי הגנים AF482923 ו AF482924 באמצעות RNAi
41.....	3.2.3.1 ריאקציית PCR להכנת תבנית DNA לסינתזה של ds-RNA
41.....	3.2.3.2 סינתזת, ניקוי וכימות ה- dsRNA
41.....	3.2.3.3 ניסוי השתקת ביטוי הגנים <i>in vivo</i>
42.....	<b>3.3 תוצאות</b>
	3.3.1 בידוד 9 הגנים המקודדים ל $\delta$ -desaturase
42.....	מ-cDNA של בלוטות הפרומון ב- <i>P. interpunctella</i>
43.....	3.3.2 קביעת רמות ביטוי גנים בעזרת Real Time PCR (qRT-PCR)
44.....	3.3.3 ניסיון להשתקת ביטוי הגנים AF482923 ו AF482924 באמצעות RNAi
45.....	<b>3.4 דיון ומסקנות</b>
47.....	<b>4. דיון מסכם</b>
48.....	רשימת ספרות
61.....	תקציר באנגלית

$\mu$ Ci - micro-curie  
 $\mu$ M - micro-molar  
 $\mu$ l - micro-liter  
ACCase - acetyl coenzyme A carboxylase  
bp - base pair  
CA - corpora allata  
cDNA - complimentary deoxyribonucleic acid  
con - concentration  
CR - central region  
 $C_t$  - cycle threshold  
 $d_3$ -14:COOH - tetradecanoic 14, 14, 14- $d_3$  acid  
 $d_3$ -16:COOH - hexadecanoic 16, 16, 16- $d_3$  acid  
DNA - deoxyribonucleic acid  
dsRNA - double strand ribonucleic acid  
FAR - fatty acyl reductase  
FAS - fatty acid synthetase  
GC - gas chromatograph  
GC/MS - gas chromatograph / mass spectrometer  
GPCR - G protein coupled receptors  
JH - juvenile hormone  
mM - milli-molar  
MS - mass spectrometer  
NCBI - National Center for Biotechnology Information  
ng - nano-gram  
PBAN - pheromone biosynthesis activating neuropeptide  
PBAN-R - pheromone biosynthesis activating neuropeptide receptor  
PCR - polymerase chain reaction  
pmole - pico-mole  
qRT-PCR - quantitative real time PCR  
RNA - ribonucleic acid  
RNAi - ribonucleic acid interference  
RT-PCR - reverse transcriptase-polymerase chain reaction

SIM - single ion monitoring  
 SOG - suboesophageal ganglion  
 TAG - terminal abdominal ganglion  
 UV - ultra violet  
 VNC - ventral nerve cord  
 Z11-16: Ald - Z 11 hexadecanal  
 Z11-16: OH - Z 11 hexadecanol  
 Z9-16: Ald - Z 9 hexadecanal  
 ZETA - Z9, E12 tetradecenyl acetate

## רשימת טבלאות

מספר עמוד	טבלה
29	<u>טבלה מספר 1</u> : אחוז האינקורפורציה של $d_3$ -14:COOH לתרכובת הפרומון העיקרית של <i>H. armigera</i> ו <i>P. interpunctella</i> בנכוחות PBAN ובהיעדרו.
37	<u>טבלה מספר 2</u> : רצפי התחלים ששמשו לריאקציות PCR לבידוד ה- CR של תשעת גני ה- $\delta$ -desaturase.
38	<u>טבלה מספר 3</u> : רצפי התחלים ששמשו לריאקציות qRT-PCR.
42	<u>טבלה מספר 4</u> : רצפי התחלים ששימשו ל- RNAi.
44	<u>טבלה מספר 5</u> : ריכוז משוואות עקומת הכיול של גני $\delta$ -desaturase בריאקציות qRT-PCR.
45	<u>טבלה מספר 6</u> : רמות פרומון לאחר הזרקת RNAi לנקבות של <i>P. interpunctella</i> .



## רשימת איורים ותמונות

מספר עמוד	איור
17	<u>איור מספר 1</u> : : שלבי המפתח המשוערים במסלולי הביוסניתיזה של המרכיבים העקריים של פרמוני המין במיני העשים <i>Helicoverpa armigera</i> ו <i>Plodia interpunctella</i> .
22	<u>איור מספר 2</u> : השפעת PBAN ו tralkoxydim על אחוז האינקורפורציה של sodium acetate רדיואקטיבי ( $^{14}\text{C}$ ) לתרכובת הפרומון העיקרית של <i>H. armigera</i> ו <i>P. Interpunctella</i> .
23	<u>איור מספר 3</u> : פרופיל הפרדה חלקי של דוגמאות מיצוי בלוטת הפרומון של <i>H. armigera</i> ב GC/MS – כאשר ניתן הפרקורסר sodium acetate המסומן ב- $^{13}\text{C}$ .
23	<u>איור מספר 4</u> : פרופיל הפרדה חלקי של דוגמאות מיצוי בלוטת הפרומון של <i>P. interpunctella</i> – GC/MS כאשר ניתן הפרקורסר sodium acetate המסומן ב- $^{13}\text{C}$ .
24	<u>איור מספר 5</u> : השפעת PBAN, ומעכבים על אחוז האינקורפורציה של $^{13}\text{C}$ sodium acetate לתרכובת הפרומון העיקרית של <i>H. armigera</i> ו <i>P. interpunctella</i> .
25	<u>איור מספר 6</u> : פרופיל הפרדה חלקי של דוגמת מיצוי בלוטת הפרומון של <i>P. interpunctella</i> ב GC/MS – כאשר ניתן הפרקורסור המסומן בדיאטריום $\text{d}_3\text{-16:COOH}$ .
26	<u>איור מספר 7</u> : פרופיל הפרדה חלקי של דוגמאות מיצוי בלוטת הפרומון של <i>H. armigera</i> ב GC/MS – כאשר ניתן הפרקורסור המסומן בדיאטריום $\text{d}_3\text{-16:COOH}$ .
27	<u>איור מספר 8</u> : אחוז האינקורפורציה של חומצות השומן המסומנות $\text{d}_3\text{-C:16}$ לתרכובת הפרומון העיקרית של <i>H. armigera</i> Z11 hexadecenal ושל <i>P. interpunctella</i> Z9, E12 tetradecenyl acetate.
28	<u>איור מספר 9</u> : פרופיל הפרדה חלקי של דוגמת מיצוי בלוטת הפרומון של <i>P. interpunctella</i> ב GC/MS – כאשר ניתן הפרקורסור המסומן בדיאטריום $\text{d}_3\text{-14:COOH}$ .
28	<u>איור מספר 10</u> : פרופיל הפרדה חלקי של דוגמת מיצוי בלוטת הפרומון של <i>H. armigera</i> ב GC/MS – כאשר ניתן הפרקורסור המסומן בדיאטריום $\text{d}_3\text{-14:COOH}$ .
30	<u>איור מספר 11</u> : פרופיל הפרדה חלקי של דוגמת מיצוי בלוטת הפרומון של <i>P. interpunctella</i> ב – GC/MS כאשר ניתן הפרקורסר Malonyl CoA המסומן ב- $^{13}\text{C}$ .
30	<u>איור מספר 12</u> : פרופיל הפרדה חלקי של דוגמת מיצוי בלוטת הפרומון של <i>H. armigera</i> ב GC/MS – כאשר ניתן הפרקורסור Malonyl CoA המסומן ב- $^{13}\text{C}$ .
31	<u>איור מספר 13</u> : השפעת PBAN, acetyl CoA, sodium acetate, ו tralkoxydim על אחוז האינקורפורציה של $^{13}\text{C}$ malonyl CoA לתרכובת הפרומון העיקרית של <i>H. armigera</i> ו <i>P. interpunctella</i> .
33	<u>איור מספר 14</u> : האפשרויות הקיימות של שילוב קשרים כפולים ע"י אנזימי desaturase שונים וקיצור שרשרת הפחמנים במסלול הביוסניתיזה של פרומון המין של <i>P. interpunctella</i> .
40	<u>איור מספר 15</u> : דוגמה לעקומת ההתכה (Melting curve) של הגן AF482924 לצורך המחשת הספציפיות של תוצרי ריאקציה ה-qRT-PCR בכל ארבעת מיהולי ה-cDNA השונים והביקורת השלילית.
40	<u>איור מספר 16</u> : דוגמה לעקומת סטנדרט של הגן AF482924. שיפוע הגרף שווה ל 3.3-
43	<u>איור מספר 17</u> : רמת ביטוי של 9 גני desaturase- דםספריות cDNA של בלוטת הפרומון של <i>P. interpunctella</i> .
18	<u>תמונה מספר 1</u> : כלוב הטלה של <i>P. interpunctella</i> וצנצנות עם מצע המזון עליהם מונחות הביצים מכלוב ההטלה לצורך הגחה, הזנה והתגלמות.
42	<u>תמונה מספר 2</u> : תוצרי ריאקציה PCR עם התחלים הספציפיים לכל גן ועם cDNA מבלוטות הפרומון.
43	<u>תמונה מספר 3</u> : תוצרי ריאקציה PCR עם התחלים הספציפיים לכל גן ועם cDNA מנקבות זכרים בוגרים.

## 1. מבוא כללי

### 1.1 הקדמה

עשים הם אחת מקבוצות החרקים המזיקים העיקריות בחקלאות. כיום קיימות מספר שיטות המבוססות על חומרי הדברה כימית, בכדי לבקר את אוכלוסיית העשים בשדות ואסמי האחסון של התוצרת החקלאית. בשנים האחרונות, מטעמים של בריאות, מודעות לאיכות הסביבה ופיתוח עמידות על ידי העשים לחומרי ההדברה, קיימת מגמה לפתח אסטרטגיות לניהול אוכלוסיית העש באופן שיפחית את השימוש בחומרים רעילים במזון ותוצרת חקלאית. אחת הדרכים לעשות כן, היא על ידי בקרה על פוריות נקבות העש. במיני עשים רבים תקשורת כימית היא הדרך של זכרים ונקבות להיפגש למטרת זיווג ורבייה. ברוב המינים הנקבה משחררת תערובת של פרומון מין, שנועדה למשוך באופן ספציפי זכרים מאותו המין, לצורך הזדווגות ורבייה. לאחר שזוהו תרכובות פרומון של מיני עשים רבים, נעשה שימוש בפרומונים סינטטיים, אך לאלו הייתה הצלחה מוגבלת בהדברת אוכלוסיות העשים. הבנה של השלבים העיקריים במסלול הביוסינתיזה של פרומון המין בנקבה ומנגונון הבקרה המולקולאריים של אנזימי מפתח המעורבים בייצור פרומוני המין, תספק כלים לפיתוח שיטות להפרעה של ייצור פרומון המין ובכך תסלול את הדרך לעיכוב ההתנהגות הרבייתית במיני עשים המזיקים בחקלאות.

בעבודה זו נתמקד במסלולי ייצור פרומון המין של שני מיני עשים מייצגים: *Helicoverpa armigera* ו- *Plodia interpunctella*. העש *Helicoverpa armigera* מזיק עיקרי בגידולים בעלי חשיבות כלכלית רבה ברחבי העולם כגון כותנה, פשתן, תירס, תפוח אדמה, חיטה ועגבנייה (Germain, 2003). העש *Plodia interpunctella* מזיק קוסמופוליטי לתוצרי חקלאות מאוחסנת, בעיקר לדגניים כמו תירס וחיטה.

### מטרות עבודה זו הן:

1. פענוח שלבי מפתח במסלול הביוסינתיזה של פרומון המין בנקבות של שני מיני עשים מייצגים (*Helicoverpa armigera*, Noctuidae, ו- *Plodia interpunctella*, Pyralidae).
2. קביעת רמת הביטוי של גנים המקודדים לאנזימי -  $\delta$ -desaturase שהם אנזימי מפתח במסלול ייצור פרומון המין בבלוטת הפרומון של העש *Plodia interpunctella* ואחראיים על הוספת שני קשרים כפולים בתרכובת הפרומון העיקרית.

### 1.2 תקשורת כימית

פרומונים הם מולקולות המופרשות מבעל-חיים אחד לצורך איתות לבעלי חיים אחרים מאותו המין. בטבע קיימים סוגים רבים של פרומונים המסווגים ע"פ התגובה שהם מעוררים למשל:

פרומוני התקבצות, סימון שביל למקור מזון, אזהרה מפני סכנה, בשלות מינית ופרומוני מין (Bjostad *et al.*, 1987). מגדירים פרומוני מין, כנדיפים המיוצרים על ידי פרט בודד מאותו המין על מנת למשוך את הזוויג השני למטרת הזדווגות ורבייה. בעשי לילה בדרך כלל הנקבה משחררת תערובת של תרכובת כימית המרכיבה את הפרומון והזכר קולט אותה באברי החישה ועף נגד כיוון הרוח אל מקור הריח. שחרור הפרומון נעשה בדרך כלל בשעות החושך שבהן הזכרים פעילים (Rafaeli & Jurenka, 2003). יש לשימוש בפרומון לצורך משיכה של זכרים לנקבות לצרכי רבייה, מספר יתרונות: פרומונים הם חומרים כימיים הנישאים ברוח והם יכולים להיות מושאים גם לטווחים ארוכים ומאפשר להם לעבור מחסומים פיסיים. כמו כן היכולת של העש לזהותם בריכוזים נמוכים הופכים אותם לרווחיים מבחינה אנרגטית (Hansell, 1985).

המבנה הכימי של פרומוני מין הוא בדרך כלל מבנה פשוט הבנוי משרשרת פחמנים ומכיל אטומי פחמן, מימן וחמצן. לרוב, תרכובות הפרומון מכילות גם קבוצה פונקציונאלית מחומצנת ובעלות מספר משתנה של קשרים כפולים המקנים להם את הספציפיות למין (Jurenka, 2003). היחס בין כמויות המרכיבים השונים בתערובת הפרומון משפיעה גם על הספציפיות של תערובת הפרומון מין (Tumlinson & Teal, 1987). האנזימים הספציפיים לכל מין של חרק, המשתתפים במסלול ייצור הפרומון, יוצרים את היחס המתאים לייצור פרומון ספציפי למין (Jurenka, 2003, Jurenka & Roelofs, 1993).

### 1.3 ביוסינתיזה של פרומוני מין בעשים

מגוון רחב של מיני עשים מסנתזים את פרומוני המין מ-*acetate* (*de novo*) בגופם ע"י שימוש בתהליכים מטבוליים שונים (Tillman *et al.*, 1999). המבנה של פרומוני מין רמז לחוקרים הראשונים בתחום על כך שרבים מהם נגזרות של חומצות שומן. הנחה זו פרצה את הדרך לחקר מסלולי הביוסינתיזה של פרומוני מין באמצעות מעקב אחרי ההפיכה של חומצות השומן לתרכובת הפרומון הסופית באמצעות מספר אנזימי מפתח. חלק מהאנזימים המשתתפים בביוסינתיזה של פרומוני המין הם אנזימים האחראים על מטבוליזם של חומצות שומן בגוף החרק. אנזימים אחרים הם אנזימים המשתתפים בתהליכים מטבוליים בגוף החרק, שעברו מודיפיקציה במהלך האבולוציה לשימוש ספציפי במסלולי ייצור פרומוני המין. בעשים שבהם פרומוני המין הם נגזרות של חומצת שומן מסלול הביוסינתיזה מתחיל מחומצת שומן פלמיטית (*acid*:16) או סטארית (*acid*:18) ולאחר מכן נקבע אורכה הסופי של שרשרת הפחמנים ע"י אנזימי קיצור. כמות הקשרים הכפולים, מיקומם והאיזומרציה שלהם (*Trans* (*E*) או *Cis* (*Z*)), נקבעת ע"י אנזימי ה- $\delta$ -desaturase הספציפיים לאותו מין עש. במיני עשים שונים התהליך יכול להתבצע באופן הפוך, שבו קודם נקבעים הקשרים

הכפולים ולאחר מכן שרשרת הפחמנים מקוצרת. בשלב הסופי נקבעת הקבוצה הפונקציונאלית הבנויה בדרך כלל מאלדהיד, אלקוהול או אצטט אסטר (Jurenka, 2003). ברוב מיני העשים הפרומון מיוצר בבלוטה הנמצאת בקצה הבטן בין הפרקים השמיני והתשיעי ומשחרר בעת התנהגות המאותתת על שחרור הפרומון, "Calling behavior" במהלכה מבליטה הנקבה את הבלוטה החוצה ומשחררת את הפרומון לאוויר (Raina & Menn, 1987).

#### 1.4 בקרה על ייצור פרומון המין בעשים

כאמור, נקבות משחררות את פרומון המין בעקבות calling behavior והזכר קולט את הריח ועף אל מקור הריח להזדווגות. התיאום בין האירועים הנ"ל תלוי, בהרבה מיני עשים, ביכולתה של הנקבה לווסת את ייצור הפרומון על ידי מנגנוני בקרה נירואנדוקריניים הקיימים בגוף הנקבה ונמצאים תחת בקרה צירקאדית. מנגנונים אלו מושפעים ע"י גורמים סביבתיים ופיסיולוגיים כגון: פוטופריודה, טמפרטורה, צמחים פונדקאים, הזדווגות, גיל, הרמונים, נירוהורמונים ונירומודולטורים.

במיני עשים המשתמשים בחומצות שומן כפרקורסרים לייצור פרומון המין, המנגנון העיקרי המבקר את ייצור הפרומון, הוא הניורופפטיד Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptide (PBAN) (Rafaeli, 2002, Rafaeli & Jurenka, 2003). PBAN מיוצר בגנגליון התת-וישטי, suboesophageal ganglion (SEG) המקושר בשלוחות אל ה- Kingan *et al.*, (CC) corpus cardiacum ומשחרר את PBAN להמולימפה של החרק (Kingan *et al.*, 1996, Davis *et al.*, 1992). האופן בו מועבר PBAN בגוף החרק עדיין לא ברור לחלוטין, יש הטוענים כי הוא מועבר דרך מערכת העצבים המרכזית בגוף, ventral nerve cord (VNC), מגיע אל ה- terminal abdominal ganglion (TAG) ומשם משוחרר ומגיע אל בלוטת הפרומון וישנם אחרים הטוענים כי PBAN מגיע אל בלוטת הפרומון על ידי שחרור מה CC ישירות להמולימפה (Raina *et al.*, 1989, Kingan *et al.*, 1992, Fabrias *et al.*, 1994, Ramaswamy *et al.*, 1995, Davis *et al.*, 1996, Golubeva *et al.*, 1997, Nagalakshmi *et al.*, 2004).

עבודות שנעשו על מנת לאפיין את הניורופפטיד הראו שהרצף המינימאלי הדרוש לפעילות הפפטיד מכיל 33 חומצות אמינו והוא משתייך למשפחת ה- PBAN/pyrokinin המתאפיינת בקצה C טרמינלי בעל המוטיב FXPRLamide (Raina *et al.*, 1989, Raina & Kempe, 1992). פעילותם של נירוהורמונים מהמשפחה של PBAN מתועדת בהרבה מיני פרפראיים; גנים רבים המקודדים לרצפי ניורופפטידים בעלי המוטיב של FXPRLamide זוהו במיני עשים רבים ומייצגים משפחה של גנים שרשימתה הולכת ומתארכת ככל שהמחקר בתחום מתקדם (Jurenka, 2004).

הזיהוי של PBAN ע"י הקולטן (PBAN-R), נעשה על פי אזור זה של 33 חומצות האמינו. כמו כן נראה שלרצף השלם של הפפטיד יש תפקיד בקישור/עיגון סלקטיבי לקולטן (Nachman *et al.*, 1992). PBAN נקשר לקולטן שקשור לחלבון G (ממשפחת החלבונים (G Protein Coupled Receptors, GPCR) בתאי בלוטת הפרומון (Rafaeli & Gileadi, 2003, Choi *et al.*, 1995). הקשירה של PBAN לקולטן המעוגן בממברנת התא גוררת שרשרת של אירועים המבוצעים ע"י שליחים משניים. בתחילה חלה עלייה בשטף של  $Ca^{2+}$  מחוץ לתא לתוכו דרך תעלות (Choi *et al.*, 2003). בעש *Bombyx mori* ובמספר מיני עשים נוספים, עליית ה- $Ca^{2+}$  התוך תאי יכולה לגרום באופן ישיר להפעלת האנזימים המשתתפים בייצור פרומון המין, על ידי הפעלת קינאזות או פוספטאזות (Ma & Roelofs, 1995, Fonagy *et al.*, 1992, Fonagy *et al.*, 1999). במינים אחרים של עשים כמו בעש *H. armigera* עליית הסיידן התוך תאי גורמת באופן עקיף להפעלת האנזימים, על ידי יצירת cyclic-AMP המפעיל קינאזות/פוספטאזות המעודדות ייצור של חומצות שומן המיועדות לשימוש בתהליך ייצור פרומון המין (Rafaeli & Soroker, 1989a, Rafaeli & Soroker, 1994, Rafaeli, 2002). פעילות האנזימים השונים המשתתפים בייצור פרומון המין מושפעת מ-PBAN. בנוסף ל-PBAN ישנם הורמונים נוספים המשתתפים בתהליך ייצור פרומון המין. לדוגמה הורמון הנעורים (Juvenile Hormone, JH), שבנוסף לתפקידים הידועים שלו כמבקר תהליכים של מטבוליזם, גדילה, התפתחות ומטמורפוזה, משחק תפקיד חשוב בבקרה של תהליכי הרבייה בחרקים. JH מסונתז ומשוחרר מה- corpora allata (CA) ומשפעל איברים כמו השחלות, בלוטות העזר (accessory glands) וגופי שומן. בנקבה הבוגרת JH מעודד התפתחות הביציות וייצור פרומון המין (Rafaeli *et al.*, 2003). אצל נקבות לאחר זיווג JH מעודד ייצור ביצים (Ramaswamy *et al.*, 1997). ככל הנראה JH אינו מבקר את ייצור הפרומון באופן ישיר. במספר מיני עשים נודדים נראה כי הוא מעורב בשחרור ה-PBAN מהמוח (ממערכת העצבים המרכזית) (Cusson & McNeil, 1989, Cusson *et al.*, 1994). בנוסף נראה כי בעש *H. armigera* JHII גורם לבשלות בלוטת הפרומון בגלמי נקבות יום לפני ההגחה (ב-pharate) וגורם לייצור פרומון בנקבות בנות יום אשר באופן טבעי אינן מייצרות פרומון (Fan *et al.*, 1999). ייתכן ותופעה זו נגרמת כתוצאה מבקרה מוגברת של הקולטן ל-PBAN בגלמי הנקבות (Rafaeli *et al.*, 2003).

ניסויים שנערכו עם האמין הביוגני Octopamine ואמינים ביוגניים נוספים, בעשים *H. armigera* ו-*Plodia interpunctella*, הראו כי Octopamine וכן אנאלוגים שלו, מעכבים את ייצור הפרומון בניסויי *in vitro* ו-*in vivo*. הוצע כי Octopamine משמש כנירומודולטור לייצור הפרומון הנגרם בעקבות PBAN (Rafaeli & Gileadi, 1995a, Rafaeli *et al.*, 1999, Hirashima *et al.*, 2001). ייתכן ו-Octopamine הינו

מעכב אנדוגני ותפקידו לעכב את ייצור פרומון המין בזמן ה- photophase (Rafaeli *et al.*, 1997).

ברוב מיני העשים, הזדווגות מוצלחת גורמת להפסקה של ייצור פרומון המין (Raina, 1989), Foster, 1993, Raina *et al.*, 1993, Kingan *et al.*, 1995, Ramaswamy *et al.*, 1996). במינים מסוימים הירידה בכמות הפרומון בנקבה נמשכת רק למשך הלילה שלאחר ההזדווגות, ובלילות העוקבים כמות הפרומון חוזרת לרמה הדומה לרמה לפני ההזדווגות (Raina, 1989). במינים אחרים יש הפסקה של ייצור הפרומון לאחר ההזדווגות באופן תמידי (Perez & Long, 1964). הסיבה לירידה מיוחסת לחומרים שונים המועברים מהזכר לנקבה בזמן ההזדווגות, כולל הזרע עצמו (Wolfner, 1997). בעשים נמצא פפטיד המעכב את פעילות ייצור הפרומון (Raina *et al.*, 1994, Kingan *et al.*, 1995), ופעילותו אומתה בעש *H. armigera* (Fan *et al.*, 1999, Nagalakshmi *et al.*, 2004).

## 2. פענוח שלבי מפתח במסלול הביוסינתיזה בשני מיני עשים מייצגים

(*Plodia interpunctella*, Pyralidae ו *Helicoverpa armigera*, Noctuidae)

### 2.1 מבוא

#### 2.1.1 אפיון מסלולי ביוסינתיזה של פרמוני מין בעשים

מסלולי ביוסינתיזה של פרמוני מין נחקרו במספר רב של מיני עשים תוך כדי שימוש בפרקורסרים מסומנים. שיטות המחקר כללו טכניקות מעקב אחר הפיכתם של חומצות שומן מסומנות לתוצרי הביניים ולתרכובת הפרומון הסופית (Jurenka, 2003). הטכניקה המובילה כיום במחקר של מסלולי ביוסינתיזה בפרמוני מין כוללת שימוש במכשיר GC/MS Gas-Chromatography-Mass Spectrometry. היתרון של השימוש ב-GC/MS הוא יכולת המעקב אחרי הפרקורסרים בעלי סימון כשהם חודרים לתרכובת הפרומון הסופית והאפשרות לזהותם באופן מפורש. הסימונים שבהם משתמשים בדרך כלל הם: חומצות שומן מסומנות באיזוטופ מימן יציב, deuterium, ותרכובות המכילות פחמן מסומן  $^{13}\text{C}$ . ניטור של תרכובות הפרומון הסופיות המכילות יונים מסומנים באמצעות MS מוכיח את השתלבותם לפרומון המין (Jurenka, 2003).

#### 2.1.2 פענוח שלבי המפתח במסלול הביוסינתיזה

כאמור בלוח הפרומון הממוקמת בין הפרק השמיני לתשיעי בגוף הנקבה, היא אתר המטרה של PBAN בהרבה מיני עשים כולל במיני העשים *Plodia interpunctella* ו *Helicoverpa armigera* (Soroker & Rafaeli, 1989, Rafaeli & Gileadi, 1995b). על ידי שימוש בבלוטת הפרומון בניסויי *in vitro* הוכחה השפעתו הישירה של PBAN על בלוטת הפרומון ואת ייצורה מחדש (*de novo*) של תרכובת הפרומון בבלוטות אלו במיני עשים רבים (Rafaeli, 2002). בעשים *H. armigera* ו *Plodia interpunctella* תהליך ייצור הפרומון מתחיל בציטופלסמה כסינתזה של חומצות שומן. האנזים ACCase הופך Acetyl-CoA ל Malonyl-CoA בצורה בלתי הפיכה, ובעזרת קומפלקס האנזימים fatty acid synthetase (FAS), מוארכת השרשרת לחומצת שומן בת 16-18 פחמנים (Bjostad et al., 1987). למרות המחקר הנרחב והידע שהצטבר לגבי האנזימים המשתתפים במסלול ייצור הפרומון, עדיין חסר מידע לגבי האנזימים המושפעים ע"י PBAN במסלול הביוסינתיזה. אלה הם אותם אנזימים שבשלב הפעולה שלהם נקבע קצב הפיכת הפרקורסרים לתוצרי הפרומון העיקריים. כפי הנראה אין דפוס המאפיין את אופן השפעתו של PBAN על אנזימי המסלול במיני העשים השונים. במיני עשים המשתמשים בחומצות שומן כפרקורסרים לייצור פרומון המין, כפי הנראה, השלבים המושפעים ע"י PBAN הם השלבים של התחלת יצירת חומצות השומן או השלבים של חיזורם (Rafaeli, 2005).

ניסויים המשתמשים בטכניקת סימון פרקורסרים ומעקב אחרי השתלבותם לתרכובת הפרומון הסופית, בנוכחות ובהעדר PBAN, הראו כי PBAN אינו משפיע על פעילות desaturase (Gosalbo et al., 1994, Arsequell et al., 1990), אך כן משפיע על פעילות fatty acyl reductase (FAR), ההופך Acyl-CoA לאלכוהול במספר מיני עשים, לדוגמה בעשים *Spodoptera littoralis* ו-*B. mori* (Martinez et al., 1990, Ozawa et al., 1995). במגוון עשים אחרים, בכללם בעש *H. zea* ובעש *Agrotis segetum* נראה כי PBAN מבקר את ייצור פרומון המין, על ידי השפעתו על שלב בתוך או לפני יצירת חומצות השומן (Jurenka et al., 1991, Zhu et al., 1995). האנזים ACCase אחראי על השלב המגביל ביצירת חומצות השומן. ישנן עדויות נסיבתיות המצביעות על כך, כי בעש *H. armigera* ישנה השפעה של PBAN על פעילות האנזים (Soroker & Rafaeli, 1989, Eliyahu et al., 2003), אולם השפעתו עדיין לא הוכחה בצורה חד משמעית (Jurenka, 2004).

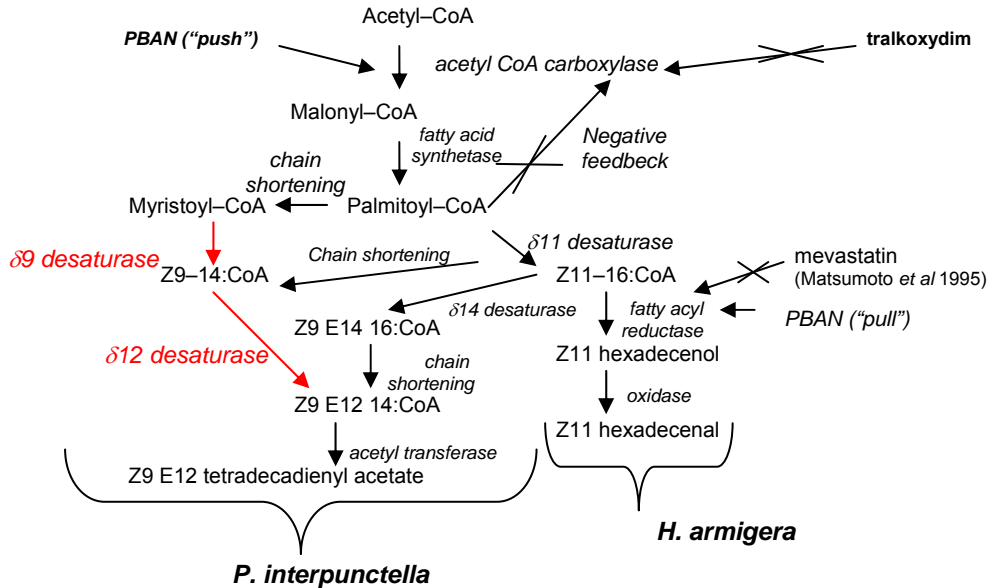
שימוש בחומרים המעכבים את פעילות אנזימי המפתח המשתתפים במסלול הבייוסינתזה, מספק כלי נוסף לפענוח השלבים המושפעים ע"י PBAN (Rafaeli, 2005). עבודות קודמות הראו ששימוש בקוטלי עשבים כנגד צמחים ממשפחת הדגניים, מעכבים את פעילות ACCase בעש *H. armigera*. עובדה זו מרמזת על היותו של ACCase אנזים מפתח במסלול הבייוסינתזה של פרמוני מין בפרפראיים (Eliyahu et al., 2003). מעכב אנזימי נוסף שיכול לספק כלי להבנת פעילות אנזימי המפתח, הוא mevastatin. mevastatin ידוע כמעכב האנזים המפתח HMG reductase, במסלול המבלונאט. מסלול המבלונאט הוא מסלול מטבולי בסיסי חשוב לבניה של חלבונים, חומצות שומן וכולסטרול באוקריוטים עליונים (Endo et al., 1976, Monger et al., 1982). הוספתו של mevastatin עיכבה ייצור פרומון בעש *B. mori* על ידי עיכוב האנזים FAR (Ozawa et al., 1995).

לאחרונה נערכו ניסויים ע"י Eltahlaway et al., שמטרתם הייתה מעקב אחר התקדמות ניצול הפרקורסורים ויצירת התוצרים לאורך הזמן, בתהליך מסלול הבייוסינתזה של פרמוני מין. תוצאות ניסויים אלו הראו ירידה מתמדת בכמות חומצות השומן (פלמיטית וסטארית) ועליה מתמדת בכמויות הפרומון ("pull"), מיד בעקבות טיפול הוספה של PBAN. אם ייצור הפרומון המתמיד שמושפע ע"י PBAN היה נגרם רק ע"י ייצור *de novo* של חומצות השומן, כמות חומצות השומן הרוויות הכללית במערכת לא הייתה צריכה לרדת בשלבים המוקדמים של הניסוי. העלייה המאוחרת בריכוזן של חומצות השומן הרוויות לאחר מכן, מרמזת על ייצור איטי יותר, *de novo* של חומצות השומן ("push"), מאשר קצב ניצולן לייצור הפרומון (Eltahlaway et al., 2007). תיאורית ה-*pull and push*, אולי מסבירה את האמביוולנטיות הקיימת לגבי ההיפותזות על אופן השפעתו של PBAN על השלבים קובעי הקצב במסלול הבייוסינתזה של פרמוני מין בעשים, שכן לפני כן לא בוצעו ניסויים הבודקים את ניצול הפרקורסרים לאורך הזמן.



המחקר הנוכחי מציג שימוש בפרקורסרים מסומנים ומעכבי אנזימים בכדי לאפיין את מסלול הביוסנתזה ושלבי המפתח המבוקרים ע"י PBAN בייצור פרומון המין בשני מיני עש מייצגים *Plodia interpunctella* ו *H. armigera*.

### Hypothetical pathways and rate-limiting steps proposed for the two moth species



איור 1: שלבי המפתח המשוערים במסלולי הביוסנתזה של המרכיבים העקריים של פרומוני המין במיני העשים *Plodia interpunctella* ו *Helicoverpa armigera*. X מסמן עיכוב.

## 2.2 שיטות וחומרים

### 2.2.1 גידול החרקים

#### 2.2.1.1 גידול *Plodia interpunctella*

זחלים של *P. interpunctella* גודלו במשטר הזנה הכולל 80 גרם חיטה טחונה, 10 גרם גליצרין, 5 גרם שמרים ו5 גרם דבש בטמפרטורה של 25-26°C ובמשטר פוטו פריודי ביחס של 14:10 (חושך:אור), בצנצנות זכוכית בנפח של 500 מ"ל שנחתמו בשכבה כפולה של נייר מגבת. הנייר הודק לפתח הצנצנת בעזרת רצועה אלסטית (תמונה 1). עשים בוגרים שוכנו יחד בצנצנת לצורך הזדווגות, פתח הצנצנת כוסה ברשת תיל. לנקבות ניתן היה להטיל ביצים, ואלה נאספו דרך רשת התיל והועברו לצנצנות חדשות המכילות את המזון (150-200 ביצים לצנצנת). זחלי הנקבה הופרדו מזחלי הזכרים בשלב הנדידה (Wandering). אשכי הזכרים המתפתחים המופיעים ככתמים אדומים דרך הקוטיקולה של שכבת הבטן שימשו לזיהויים. זחלי הנקבה הנבחרות הונחו במבחנות נפרדות, שנאטמו בצמר גפן לצורך התגלמות. יום ההגחה צוין, ונקבות בתולות בוגרות בנות 2-4 ימים שימשו לניסויי *in vitro* (Rafaeli & Gileadi, 1995b) ולבידוד RNA.



תמונה 1: כלוב הטלה של *P.interpunctella* וצנצנות עם מצע המזון עליהם מונחות הביצים מכלוב ההטלה לצורך הגחה, הזנה והתגלמות.

#### 2.2.1.2 גידול *Helicoverpa armigera*

*H. armigera* גודלו במשטר מזון מלאכותי ( *Heliopsis* Premix, Stonefly Industries, Inc, Bryan, TX, USA בטמפרטורה קבועה של 25-26°C ובמשטר פוטופריודי ביחס של 14:10 (חושך: אור), (Rafaeli & Soroker, 1989b). זחלים בדרגות 2-3 בודדו בתאי תרבית שקופים (J-2 cavities, Nu-Trend Container, Jacksonville, Florida, USA) בשל טבעם הקניבאלי. מין הגלמים זוהה בעזרת קצוות שכבות הבטן ששימשו כאינדיקאטור, וניתן לזכרים ולנקבות להגיח בכלובים נפרדים המכילים צלוחיות של 10% תמיסת סוכרוז, עד לניתוח של בלוטות הפרומון. תאריך ההגחה צוין. נקבות בנות 2-3 ימים שימשו לניסויים *in vitro* (Soroker & Rafaeli, 1989).

#### 2.2.2 ניסויי *in vitro* שלבי מפתח במסלול ייצור הפרומון

##### 2.2.2.1 הכנת הבלוטות לניסויי *in vitro*

##### 2.2.2.1.1 הכנת הבלוטות לניסויי *in vitro* עם malonyl coenzyme A ו sodium acetate

##### כפרקורסור

בלוטות פרומון של נקבות בנות 2-3 ימים, המכילות את הפרקים ה-8-9 והממברנה המקשרת ביניהן, הוסרו ורקמותיהן הפנימיות נוקו כשהן בתוך התמיסה על גבי קרח, בעזרת מיקרוסקופ בינוקולרי (Zeiss, Oberkochen, Germany). הבלוטות הועברו לתמיסה פיסיוולוגית (calcium chloride 3 mM, magnesium chloride 18 mM, pipes Buffer 5 mM, potassium chloride 21 mM, sodium chloride 12 mM, (D+) 85 mM)

phenol red-ו- (D+) trehalose 43 mM, glucose כאינדיקאטור ל- pH. התמיסה הותאמה בעזרת KOH ל- 6.6 pH (Jurenka *et al.*, 1991). לאחר השטיפה בתמיסה הפיסיולוגית הבלוטות הועברו לתמיסה המכילה את הפרקורסרים (precursors), sodium acetate (Sigma-Aldrich, Rehovot, Israel) בריכוז 5mM או malonyl coenzyme A (Isotec, Miamisburg, Ohio, USA) בריכוז 2mM, מסומנים ב- $^{13}\text{C}$  (בחלק מהניסויים sodium acetate היה מסומן ב- $^{14}\text{C}$  רדיואקטיבי), בנוכחות או בהיעדרות תרכובות מעודדות או מעכבות את ייצור הפרומון. במקרים שבהם malonyl coenzyme A שימש כפרקורסור, Saponin 0.01% (Fluka, steinheim, Germany) הוסף לתמיסה על מנת לייעל את חדירת ה-malonyl (שהיא איננה מולקולה ליפופילית) דרך ממברנת התא. לאחר הדגרה של שעתיים בטמפרטורת החדר, הבלוטות מוצו ב- 100µl הקסאן (Hexane for GC, Carlo ERBA Reagents, Rodano, Italy) למשך 15 דקות. אחוז הפרקורסרים המסומנים שהשתלבו לתוך מרכיבי הפרומון העיקרי נטרו בעזרת GC/MS (כמפורט בהמשך).

#### 2.2.2.1.2 הכנת הבלוטות לניסוי *in vitro* עם חומצות שומן מסומנות כפרקורסור

כיוון שחומצות השומן אינן מסיסות בתמיסה הפיסיולוגית, הן ניתנו לנקבות ע"י טפטוף על גבי הקצה של הבטן (בנפח של 0.1µl ובריכוז של 1µg/400). לאחר 15 דקות מנוחה שבהן התמיסה נספגה לתוך גוף הנקבות הבלוטות נותחו ונוקו והועברו לתמיסה פיסיולוגית בנוכחות או בהיעדרות תרכובות מעודדות או מעכבות את ייצור הפרומון ואח"כ למיצוי בהקסאן כפי שמתואר בסעיף 2.2.2.1.1

#### 2.2.2.3 הפרדה ב- GC/MS

השימוש במכשיר GC/MS (gas chromatograph / mass spectrometer) מאפשר זיהוי של תרכובות מסומנות באיזוטופ יציב (מימן  $^2\text{H}$  (d- deuterium) או פחמן  $^{13}\text{C}$ ) בתוך מרכיבי הפרומון העיקריים. מרכיב הפרומון העיקרי של *Plodia interpunctella* הוא: Z9, E12 tetradecenyl acetate, ועבור *Helicoverpa armigera* הוא: Z11- hexadecenal. חומצות שומן מסומנות ב- $^3\text{d}_3$ - deuterium (d<sub>3</sub>- hexadecanoic 16, 16, 16-d<sub>3</sub> acid (d<sub>3</sub>- COOH) ו- tetradecanoic 14, 14, 14-d<sub>3</sub> acid (d<sub>3</sub>- COOH), המשתלבות לתוך מרכיב הפרומון העיקרי, יגרמו לו להיות בעל יחידת מסה גדולה בשלוש יחידות אטומיות ביחס לרכיב הפרומון הלא-מסומן. לעומת זאת כאשר משתמשים ב- sodium acetate מסומן ב- $^{13}\text{C}$  ישנן אפשרויות של הוספת עד 14 פחמנים מסומנים בפלודיה ו- 16 פחמנים מסומנים בהליוטיס למרכיב הפרומון העיקרי באופן תאורטי, באופן מעשי יתכן פחות. המספר של הפחמנים המסומנים המשתלבים לתוך מרכיב הפרומון העיקרי יגרמו לו להיות בעל

יחידת מסה אטומית גדולה באחת עבור כל אטום מסומן שחדר למרכיב העיקרי. כאשר malonyl CoA הוא פרקורסור, אזי ההחדרה של הפחמנים למרכיב הפרומון העיקרי נעשית בזוגות ולכן הפחמנים המסומנים המשתלבים לתוך רכיב הפרומון העיקרי יגרמו לו להיות בעל יחידת מסה גדולה בשתיים עבור כל יחידת malonyl CoA שחדרה למרכיב העיקרי לעומת המסה של אותה תרכובת כשהיא אינה מסומנת.

בכל הזרקה, הדוגמא המכילה מיצוי של 4 בלוטות (*H. armigera*) או מיצוי של 10 בלוטות (*P. interpunctella*) נודפה בחנקן לנפח של 2-3 µg והוזרקה למכשיר ה-GC/MS (Agilent GC-689N; MS-5973) המצויד בעמודה קפילרית (phase:RTX-5SILMS, Restek), באורך 30 מטר, קוטר פנימי 0.25 מ"מ, עובי המילוי 0.25 מיקרומטר). הגז הנשא היה הליום וקצב הזרימה 1.5 ml/min. תנאי ההזרקה: בניסויים לצורך הפרדת מרכיבי הפרומון של *H. armigera* הטמפרטורה ההתחלתית של התנור הייתה 60 °C למשך 2 דקות ולאחר מכן הועלתה בקצב של 5 מעלות לדקה עד לטמפרטורה של 170 °C שם היא נשארה למשך 12 דקות. בניסויים לצורך הפרדת מרכיבי הפרומון *P. interpunctella* הטמפרטורה ההתחלתית של התנור הייתה 90 °C למשך 2 דקות ולאחר מכן הועלתה בקצב של 20 מעלות לדקה עד לטמפרטורה של 160 °C שם היא נשארה למשך 8 דקות.

### 2.2.3 אנאליזת אינקורפורציה ומבחני סטטיסטיקה

ניטור של היונים המסומנים והלא מסומנים ע"י MS נעשה בשיטת SIM, ניטור יון בודד-Single Ion Monitoring של MS, מה שהופך אותה להיות רגישה יותר משיטת-SCAN. ומאפשרת בעזרת פונקציית ion extraction בתכנת עיבוד הנתונים של חברת Agilent להשתמש בהזרקה אחת לכל דגימה על מנת לקבל את דרגת האינקורפורציה. לעומת זאת שיטת SCAN מאפשרת זיהוי וכימות של רכיבי הפרומון העיקרי. היות ומטרת הניסויים הייתה לברר את אחוז שילוב הסימון לתוך מרכיב הפרומון הידוע לנו, לא היה צורך בשימוש ב-SCAN ובסטנדרט פנימי. וכך, לאחר שנמדדה כמות היונים המסומנים שחדרה לפרומון חושב אחוז ההשתלבות של היונים המסומנים מתוך כלל היונים של אותו הפרומון שנבדק ב-SIM. לאחר מכן חושבו הממוצעים של אחוזי ההשתלבות ביחס לפרומון בלתי-מסומן בכל ניסוי לפי מספר החזרות.

הניתוח הסטטיסטי בניסויי ה-*in vitro* לאפיון שלבי מפתח במסלול ייצור הפרומון נערך בעזרת תוכנת StatView 5.0 (Macintosh). נערכו מבחני ANOVA tail-2. רמת המובהקות הייתה 0.05 במבחני Fisher PLSD.

## 2.3 תוצאות

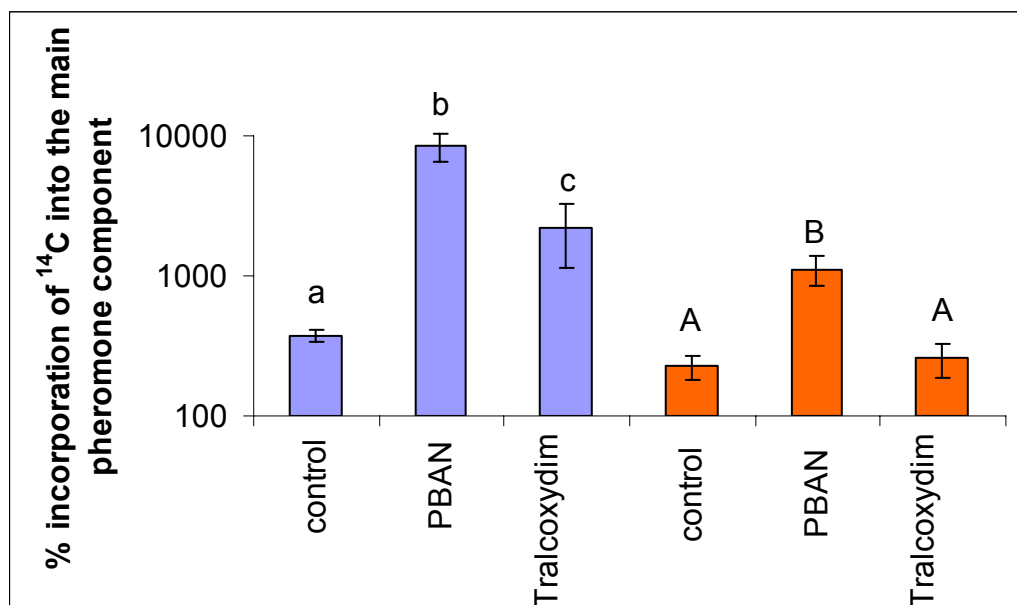
### 2.3.1 אינקורפורציה של פרקורסרים מסומנות לתוך תרכובת הפרומון העיקריות של *P.*

#### *interpunctella* ו *H. armigera* (de novo)

בחלק זה הניסויים תוכננו כך שחומצות השומן המסומנות יסייעו לפענח את שלב המפתח במסלול הביוסינטטי, המבוקר על ידי PBAN הן ב- *P. Interpunctella* והן ב- *H. armigera*. פרקורסרים מסומנים באיזוטופים יציבים (כמפורט בשיטות וחומרים בסעיפים 2.2.2.1-2) שימשו למעקב אחר המסלול הביוסינטטי לייצור רכיבי הפרומון העיקריים. בנוסף, השפעתו של  $0.5 \mu\text{mol/l}$  PBAN (Hez-PBAN, Bachem, AG, Bubendorf, Switzerland) נבחנה בכל שלב במסלול הביוסינטטי ע"י הוספה של חומרים הידועים כמעכבים של שלבים מסוימים במסלול הביוסינטיזה: הוספת מעכב אנזים ה- ACCase,  $100 \mu\text{M}$  tralkoxydim ((RS)-2-[(EZ)-1-(ethoxyimino)propyl]-3-hydroxy-5-) (mesitylcyclohex-2-en-1-one), Zeneca, UK  $0.64 \text{mM}$  mevastatin (Sigma-Aldrich, Rehovot, Israel) המעכב את ניצול acetyl CoA במסלול המבלונאט והוספת  $10 \mu\text{M}$  palmitoyl CoA (Sigma-Aldrich, Rehovot, Israel) הידוע במערכות בעלי חיים כמעקב משוב חוזר של האנזים ACCase.

#### 2.3.1.1 אינקורפורציה של $^{14}\text{C}$ sodium acetate

כדי לבדוק את ההשערה ש- PBAN הוא האחראי לשילוב של אצטט בייצור הפרומון בשני המינים, נערכו ניסויים המשתמשים באיזוטופ רדיואקטיבי מסומן ב-  $^{14}\text{C}$  sodium acetate (Acetate, sodium salt ( $56 \mu\text{Ci/mmol}$ ), NEN, Boston, USA)  $[1-^{14}\text{C}]$ , כפרקורסור. בניסויי *in vitro* בבלוטות פרומון של שני המינים, נתקבלו תוצאות המראות רמות נמוכות מאוד של שילוב הסימון (אינקורפורציה) בין רכיבי המיצוי בהקסאן של פחמן מסומן בהיעדר PBAN (איור 2). נוכחות PBAN הגבירה את שילוב הסימון מ-  $^{14}\text{C}$  sodium acetate ב- 2184% ו- 399% ב- *H. armigera* ו *P. Interpunctella*. בהתאמה. לעומת זאת עם הוספת מעכב אנזים ה- ACCase, tralkoxydim בנכחות PBAN נראה עיכוב של 74% ו 77% בהתאמה בהשתלבות של פחמנים רדיואקטיביים לתרכובות הפרומון העיקריות.

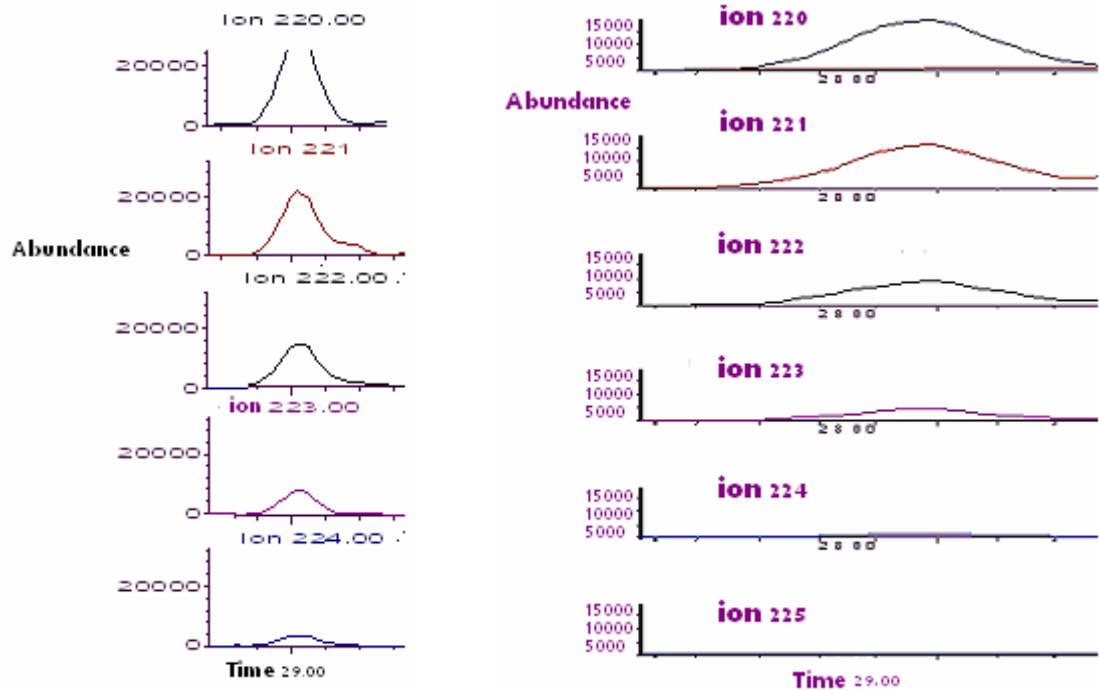


איור 2: השפעת PBAN ו tralkoxydim על אחוז האינקורפורציה של sodium acetate רדיואקטיבי (<sup>14</sup>C) לתרכובת הפרומון העיקרית של *H. armigera* (כחול) ו *P. interpunctella* (כתום). מספר חזרות: 5-8 לכל טיפול. אותיות שונות מסמלות הבדלים מובהקים סטטיסטית. סטטיסטיקה נעשתה בעזרת תוכנת StatView 5.0 ברמת מובהקות של 0.05 במבחני Fisher PLSD.

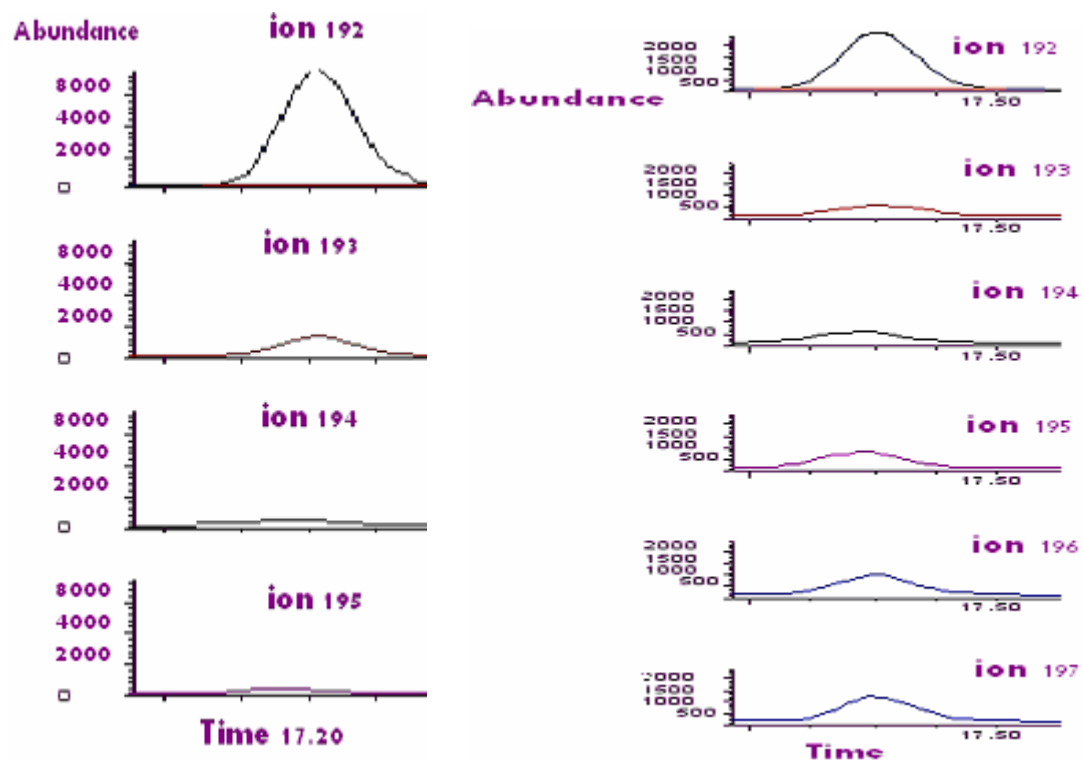
### 2.3.1.2 אינקורפורציה של <sup>13</sup>C sodium acetate

איור 3 מתאר פרופיל הפרדה חלקי של דוגמת מיצוי בלוטת הפרומון של *H. armigera* ב – GC/MS כאשר ניתן הפרקורסור sodium acetate המסומן ב-<sup>13</sup>C. כאשר משתמשים ב-sodium acetate ישנה אפשרות של הוספת פחמן אחד עד 16 פחמנים מסומנים לרכיב הפרומון העיקרי, בפועל זוהתה חדירה של עד 5 פחמנים מסומנים. רכיבי הפרומון העיקריים המסומנים ובלתי-מסומנים של Z11 hexadecenal ב-*H. armigera*, אותרו בעזרת mode SIM של ה-MS, המנטר מספר יונים אופייניים נבחרים ממולקולת הפרומון לא מסומנות (יון 220) ומסומנות (יונים 221-225) ב-<sup>13</sup>C.

בדומה איור 4 מתאר פרופיל הפרדה חלקי של דוגמת מיצוי בלוטת הפרומון של *P. interpunctella*. רכיבי הפרומון העיקריים המסומנים ובלתי מסומנים של ZETA אותרו בדומה לנ"ל מספר יונים אופייניים נבחרים ממולקולות הפרומון לא מסומנות (יון 192) ומסומנות (יונים 193-195) ב-<sup>13</sup>C.

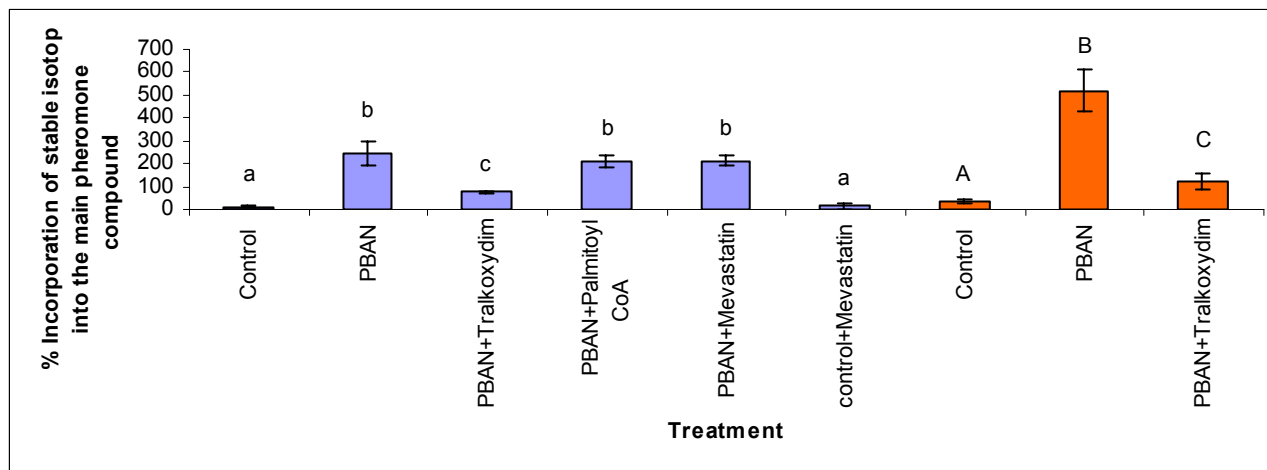


איור 3: פרופיל הפרדה חלקי של דוגמאות מיצוי בלוטת הפרומון של *H.armigera* ב-GC/MS כאשר ניתן הפרקורסר sodium acetate המסומן ב- $^{13}\text{C}$ . רכיב הפרומון העיקרי המסומן ובלתי-מסומן של Z11hexadecenal, אותר בזמן הפרדה (retention time) של 29.00 דקות בעזרת SIM. צד ימין: טיפול עם PBAN ו tralkoxydim ; צד שמאל: טיפול רק עם PBAN.



איור 4: פרופיל הפרדה חלקי של דוגמאות מיצוי בלוטת הפרומון של *P.interpunctella* ב-GC/MS כאשר ניתן הפרקורסר sodium acetate המסומן ב- $^{13}\text{C}$ . רכיב הפרומון העיקרי המסומן ובלתי-מסומן של Z9, E12 tetradecenyl, אותר בזמן הפרדה (retention time) של 17.20 דקות בעזרת SIM. צד ימין: טיפול עם PBAN ו tralkoxydim ; צד שמאל: טיפול רק עם PBAN.

השפעת PBAN על האינקורפורציה של  $^{13}\text{C}$  sodium acetate לרכיבי הפרומון העיקריים נבחנה בניסוי *in vitro* עם בלוטות פרומון של *H. armigera* ו-*P. interpunctella* ואנליזת GC/MS כמתואר בחלק הדין בשיטות וחומרים בסעיף 2.2.2.3 (איור 5). חישוב אחוז השילוב של סימון למרכיב הפרומון ביחס לפרומון בלתי מסומן נערך כפי שתואר בחלק הדין בשיטות וחומרים (סעיף 2.2.2.3). כפי שנצפה בניסויי  $^{14}\text{C}$  sodium acetate (איור 2), PBAN גורם לעידוד ייצור של פרומון המשלב  $^{13}\text{C}$  מסומן. בהיעדר PBAN איבחנו רק בעקבות של פרומון המסומן והבלתי מסומן. בנוסף, בנוכחות של PBAN ו-tralkoxydim נצפה עיכוב משמעותי בפרומון המסומן ב- $^{13}\text{C}$ . לעומת זאת, לא נצפתה השפעה של נוכחות palmitoyl coenzyme A ו-mevastatin יחד עם PBAN.



איור 5: השפעת PBAN, ומעכבים על אחוז האינקורפורציה של  $^{13}\text{C}$  sodium acetate לתרכובת הפרומון העיקרית של *H. armigera* (כחול) ו-*P. interpunctella* (כתום). מספר חזרות: 4-6 לכל טיפול. אותיות שונות מסמלות הבדלים מובהקים סטטיסטיים. סטטיסטיקה נעשתה בעזרת תוכנת StatView 5.0 ברמת מובהקות של 0.05 במבחני Fisher-PLSD.

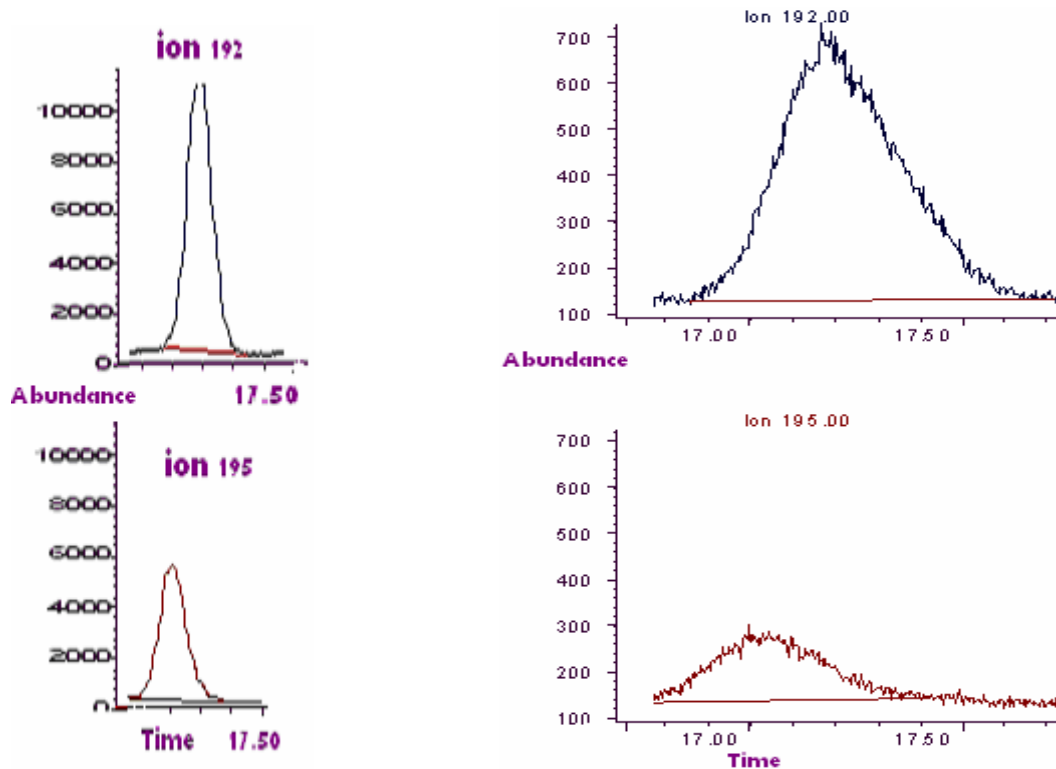
### 2.3.1.3 אינקורפורציה של חומצות שומן מסומנות ב-deuterium

אחוז האינקורפורציה של חומצות שומן מסומנות באיזוטופ היציב deuterium ( $\text{d}_3$ ): tetradecanoic 14, 14, 14- $\text{d}_3$  ו hexadecanoic 16, 16, 16- $\text{d}_3$  acid ( $\text{d}_3$ -16:COOH) ( $\text{d}_3$ -14:COOH) (CDN isotopes, Piont-claire, Quebec, Canada) בריכוז  $400\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , בתוך המרכיבים העיקריים של הפרומון בשני סוגי החרקים זוהה תוך שימוש ב-GC/MS כרשום בחלק המתייחס לשיטות וחומרים 2.2.2.3.

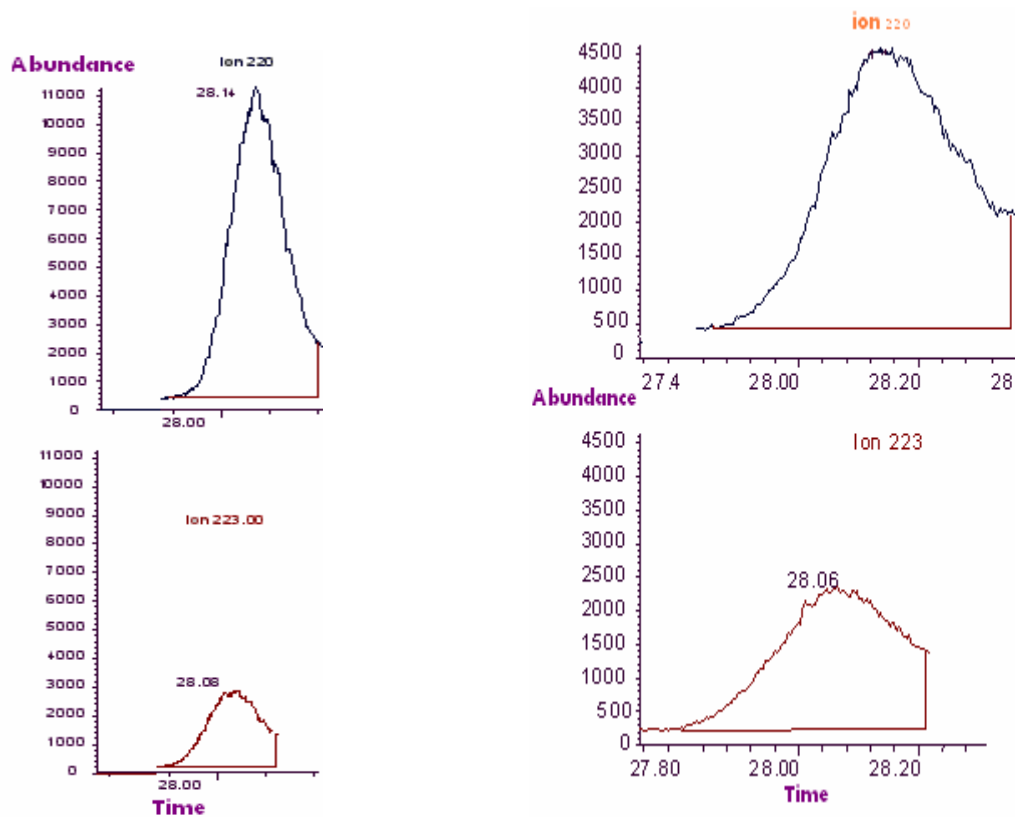


#### 2.3.1.4 אינקורפורציה של חומצת השומן d<sub>3</sub>-16:COOH

איור 6 הינו דוגמא לפרופיל הפרדה חלקי של דוגמת מיצוי בלוטת הפרומון של *P. interpunctella* ב-GC/MS, כשניתנה חומצת השומן d<sub>3</sub>-16:COOH כפרקורסור. כאשר אין השתלבות של פרקורסור מסומן לתוך רכיב הפרומון העיקרי, היון המנוטר ע"י MS בעזרת SIM יהיה Z9, E12 tetradecenyl acetate 192. השתלבות של פרקורסור מסומן ב-deuterium לתוך רכיב הפרומון העיקרי יגרמו לו להיות בעל יחידת מסה אטומית גדולה בשלוש עבור כל אטום מימן מסומן שחדר לרכיב הפרומון העיקרי ולכן היון המנוטר יהיה 195. בדומה איור 7 הינו דוגמא לפרופיל הפרדה חלקי של דוגמת מיצוי בלוטת הפרומון של *H. armigera* ב-GC/MS – כשניתנה חומצת השומן d<sub>3</sub>-16:COOH כפרקורסור. כאשר אין השתלבות של פרקורסור מסומן לתוך רכיב הפרומון העיקרי, היון המנוטר ע"י MS בעזרת SIM יהיה 220. השתלבות של פרקורסור מסומן ב-deuterium לתוך רכיב הפרומון העיקרי יגרמו לו להיות בעל יחידת מסה אטומית גדולה בשלוש עבור כל אטום מימן מסומן שחדר לרכיב הפרומון העיקרי ולכן היון המנוטר יהיה 223, GC/MS.

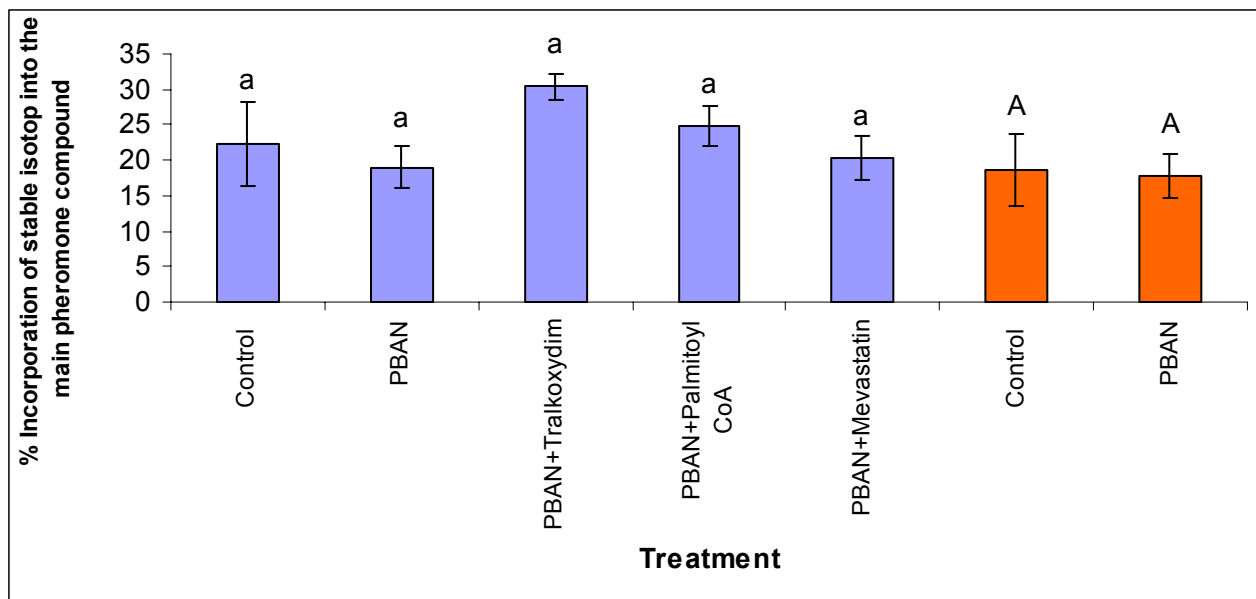


איור 6: פרופיל הפרדה חלקי של דוגמת מיצוי בלוטת הפרומון של *P. interpunctella* ב-GC/MS כאשר ניתן הפרקורסור המסומן בדיאטריום d<sub>3</sub>-16:COOH. רכיב הפרומון העיקרי המסומן ובלתי-מסומן של Z9, E12 tetradecenyl acetate, אומר בזמן הפרדה של 17.20 דקות בעזרת SIM. צד ימין: ללא PBAN; צד שמאל: עם PBAN.



איור 7: פרופיל הפרדה חלקי של דוגמאות מיצוי בלוטת הפרומון של *H. armigera* ב-GC/MS כאשר ניתן הפרקורסור המסומן בדיאטריום  $d_3$ -16:COOH. רכיב הפרומון העיקרי המסומן ובלתי-מסומן של Z11hexadecenal, אותר בזמן הפרדה (retention time) של 28.00 דקות בעזרת SIM. צד ימין: ללא PBAN; צד שמאל: טיפול עם PBAN.

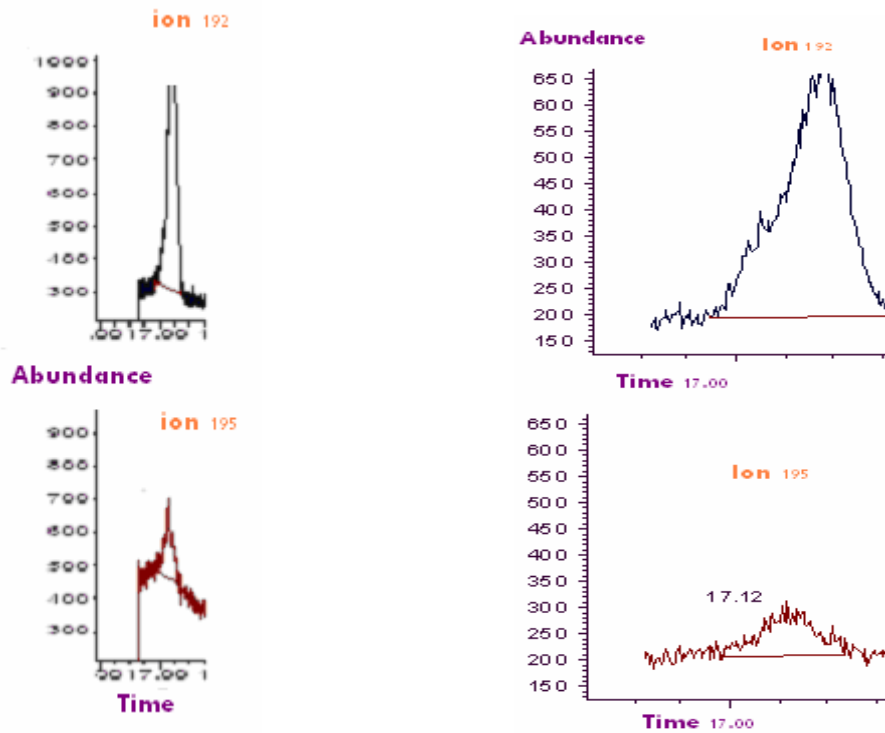
בשני המינים נצפתה אינקורפורציה של  $d_3$ -16:COOH לתוך תרכובת הפרומון העיקרית ברמות של כ-20-30%. ניתן לראות כי בשני המינים אין השפעה של תוספת PBAN על אחוז האינקורפורציה שהגיעו לרמות זהות לאלה שניכרו בהיעדרו (איור 8) למרות הירידה הכללית של פרומון בהעדר PBAN. בנוסף לכך רמות אחוז האינקורפורציה של  $d_3$ -16:COOH ל-Z- 11 hexadecenal של *H. armigera* נשארו ברמות דומות בטיפולים השונים.



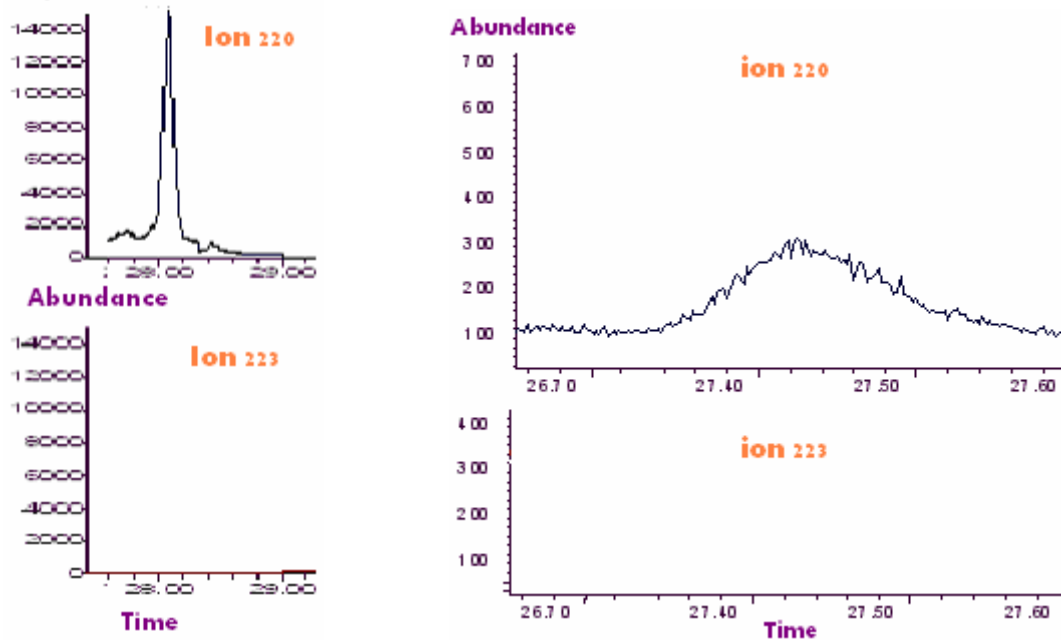
איור 8: אחוז האינקורפורציה של חומצות השומן המסומנת  $d_3$ -C:16 לתרכובת הפרומון העיקרית של Z11 *H.armigera* ושל hexadecenal (כחול) ושל *P.interpunctella* Z9, E12 tetradecenyl acetate (כתום). מספר חזרות: 5-6 לכל טיפול. אותיות שונות מסמלות הבדלים מובהקים סטטיסטית. סטטיסטיקה נעשתה בעזרת תוכנת StatView 5.0 ברמת מובהקות של 0.05 במבחני Fisher PLSD.

### 2.3.1.5 $d_3$ -14:COOH השומן חומצת השומן

היכולת של *H. armigera* ו-*P. interpunctella* להשתמש בחומצה tetradecanoic 14,  $d_3$ -14:COOH acid (14,  $d_3$ -14:COOH) בביוסינתיזה של תרכובת הפרומון העיקרית שלהם נבחנה תוך שימוש בחומצה מסומנת ב- $d_3$ -14:COOH deuterium כפריקורסור. איורים 9 ו 10, מתארים פרופיל הפרדה חלקי של דוגמת מיצוי בלוטת הפרומון של *P. interpunctella* ו-*H. armigera* ב-GC/MS, כשניתנה חומצת השומן  $d_3$ -14:COOH כפריקורסור. כאשר אין השתלבות של פחמנים מסומנים לתוך רכיב הפרומון העיקרי, היות המנוטר ע"י MS בעזרת SIM יהיה 192 עבור Z9, E12 tetradecenyl acetate של *P. interpunctella* ו-220 עבור Z11 hexadecenal של *H. armigera*. השתלבות של פרקורסרים מסומנים ב-deuterium לתוך רכיב הפרומון העיקרי יגרמו לו להיות בעל יחידת מסה אטומית גדולה באחת עבור כל אטום מסומן שחדר לרכיב הפרומון העיקרי ולכן היונים המנוטרים יהיו 195 (יש פיק) ו 223 (אין פיק) בהתאמה.



איור 9 : פרופיל הפרדה חלקי של דוגמת מיצוי בלוטת הפרומון של *P. interpunctella* ב-GC/MS כאשר ניתן הפרקורסור המסומן בדיאטריום  $d_3-14:COOH$ . רכיב הפרומון העיקרי המסומן ובלתי-מסומן של Z9, E12 tetradecenyl acetate, אומר בזמן הפרדה של 17.00 דקות בעזרת SIM. צד ימין: ללא PBAN; צד שמאל: עם PBAN



איור 10 : פרופיל הפרדה חלקי של דוגמת מיצוי בלוטת הפרומון של *H. armigera* ב-GC/MS כאשר ניתן הפרקורסור המסומן בדיאטריום  $d_3-14:COOH$ . רכיב הפרומון העיקרי המסומן ובלתי-מסומן של Z11 hexadecenal, אומר בזמן הפרדה של 28.00 דקות. צד ימין: ללא PBAN; צד שמאל: עם PBAN

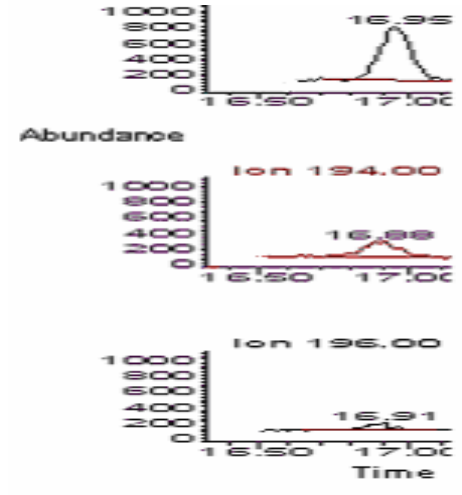
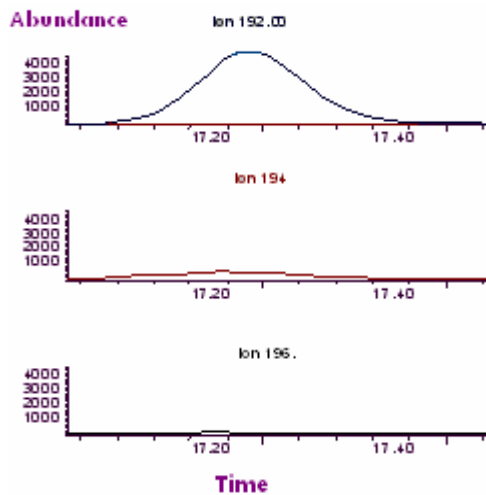
התוצאות (טבלה 1) הצביעו על כך ש- *P. interpunctella* מסוגלת להשתמש בחומצה d<sub>3</sub>-COOH לסינתזת הפרומון, בעוד המין *H. armigera* חסר את היכולת הזו.

**טבלה 1 :** אחוז האינקורפורציה של d<sub>3</sub>-14:COOH לתרכובת הפרומון העיקרית של *H.armigera* ו *P. interpunctella* בנכוחות PBAN ובהיעדרו.

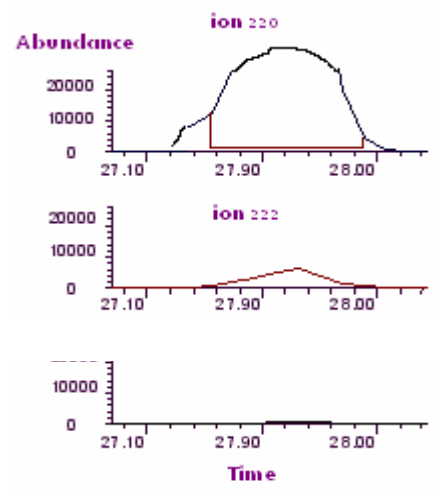
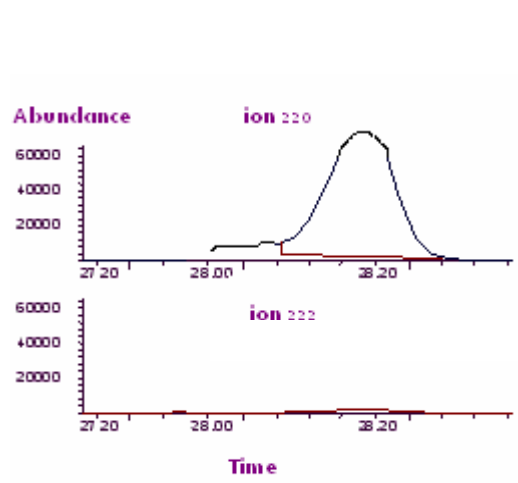
Species	Treatment	%Incorporation of d <sub>3</sub> -14:COOH into the main pheromone compound
<i>P. interpunctella</i>	Control	13.3 ± 5.7 (n=3)
	PBAN	10.5 ± 2.2 (n=5)
<i>H. armigera</i>	Control	0 (n=5)
	PBAN	0(n=5)

### 2.3.1.6 אינקורפורציה של <sup>13</sup>C malonyl coenzyme A

היות והוספת PBAN לא שינתה את אחוז האינקורפורציה באופן משמעותי של הפרקורסור חומצת השומן d<sub>3</sub>-16:COOH בשני סוגי החרקים (איור 8), השלב המגביל החזוי שבו PBAN משפיע חייב להתבצע בשלבים התחלתיים יותר במסלול הביוסינתיזה מאשר סינתזת חומצה פלמיטית. שלב זה עשוי להיות במעבר acetyl CoA ל- malonyl CoA בעזרת פלמיטית בעזרת קומפלקס ה- FAS (ראה איור 1 במבוא). הניסויים בסעיף זה תוכננו לבחון השערה זו תוך שימוש ב- <sup>13</sup>C malonyl CoA כפרקורסור. איורים 11 ו 12, מתארים פרופילי הפרדה חלקי של דוגמת מיצוי בלוטת הפרומון של *P. interpunctella* ו *H. armigera* – GC/MS – כאשר ניתן הפרקורסור של <sup>13</sup>C malonyl CoA. כאשר אין השתלבות של פחמנים מסומנים לתוך מרכיב הפרומון העיקרי, היון המנוטר ע"י MS בעזרת SIM יהיה 192 של *P. interpunctella* ויון 220 של *H.armigera*. השתלבות של פרקורסרים מסומנים ב- <sup>13</sup>C לתוך רכיב הפרומון העיקרי יגרמו לו להיות בעל יחידת מסה אטומית גדולה בשתיים עבור כל זוג אטומים מסומנים שחדרו לרכיב הפרומון העיקרי ולכן היונים המנוטרים יהיו יונים 194,196 (של *P. interpunctella*) ו 222 (של *H.armigera*).

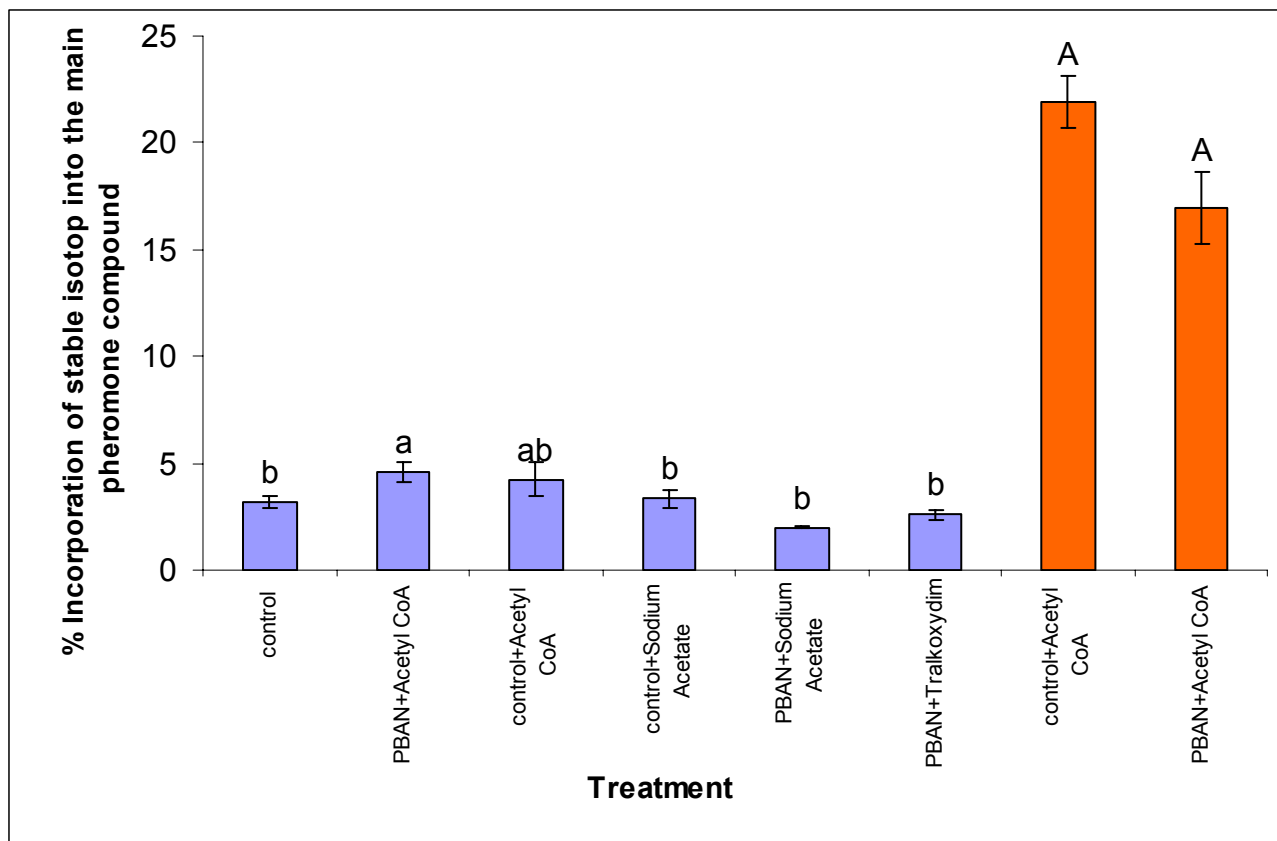


איור 11: פרופיל הפרדה חלקי של דוגמת מיצוי בלוטת הפרומון של *P. interpunctella* ב-GC/MS כאשר ניתן הפרקורסר Malonyl CoA המסומן ב- $^{13}\text{C}$ . רכיב הפרומון העיקרי המסומן ובלתי מסומן של Z9, E12 tetradecenyl acetate, אותר בזמן 17.00 בעזרת SIM. צד ימין: טיפול ללא PBAN עם acetyl CoA; צד שמאל: עם PBAN ו-acetyl CoA.



איור 12: פרופיל הפרדה חלקי של דוגמת מיצוי בלוטת הפרומון של *H. armigera* ב-GC/MS כאשר ניתן הפרקורסור Malonyl CoA המסומן ב- $^{13}\text{C}$ . רכיב הפרומון העיקרי המסומן ובלתי מסומן של Z11 hexadecenal, אותר בזמן הפרדה של 28.00 דקות. צד ימין: טיפול ללא PBAN עם acetyl CoA; צד שמאל: עם PBAN ו-acetyl CoA.

ניתן לראות שאחוז האינקורפורציה של  $^{13}\text{C}$  malonyl CoA ל-Z-11 hexadecenal הגיעו לשיעורים דומים בנוכחות ובהיעדרות PBAN כאשר סופק acetyl CoA למערכת. כאשר לא סופק acetyl CoA, יש הבדל באינקורפורציה של  $^{13}\text{C}$  malonyl CoA ל-Z-11 hexadecenal בין טיפול הביקורת לטיפול עם PBAN (איור 13).



איור 13: השפעת PBAN, acetyl CoA, sodium acetate ו tralkoxydim על אחוז האינקורפורציה של  $^{13}\text{C}$  malonyl CoA לתרכובת הפרומון העיקרית של *H. armigera* (כחול) ו *P. interpunctella* (כתום). מספר חזרות: 4-9 לכל טיפול. אותיות שונות מסמלות הבדלים מובהקים סטטיסטיים. סטטיסטיקה נעשתה בעזרת תוכנת StatView 5.0 ברמת מובהקות של 0.05 במבחני Fisher PLSD.

## 2.4 דיון ומסקנות

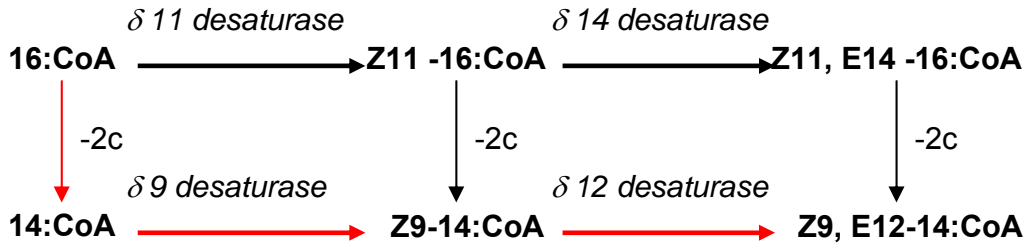
בשלב הראשונים של עבודה זו, נערכו ניסויים שמטרתם לבדוק את ההשערה כי PBAN הוא האחראי לשילוב של אצטט בייצור הפרומון בשני מיני העשים. לשם כך נערכו ניסויים המשתמשים באיזוטופ רדיואקטיבי מסומן ב- $^{14}\text{C}$  sodium acetate כפרקורסור. השערת המחקר קיבלה אישוש ע"י התוצאות שהראו השפעה חיובית על ייצור הפרומון בנוכחות PBAN ושליטת בהעדרו. השפעה שלילית נראתה גם בנוכחות PBAN וקוטל העשבים tralkoxydim, הידוע כמעכב אנזים ה-ACCase. על מנת להמשיך לחקור את שלבי המפתח במסלולי הבייסניתיזה תוך שימוש בטכניקות מעכב אחרי חדירת פרקורסור בעלי סימון לתרכובת הפרומון הסופית במכשיר GC/MS, היה צורך לבצע אופטימיזציה למערכת ולהתאימה לעבודה עם שני מיני העש. לשם כך בוצעו הניסויים עם sodium acetate כפרקורסור, הפעם מסומן ב- $^{13}\text{C}$ . התוצאות חזרו על עצמן כמו בניסויים עם sodium acetate הרדיואקטיבי. שוב ניתן היה לראות שבהעדר PBAN אחוז האינקורפורציה של sodium acetate מסומן, למרכיב הפרומון העיקרי, היה נמוך מאוד לעומת אחוז גבוה בנוכחות PBAN. התוצאות חזרו על עצמן גם לגבי ההשפעה השלילית על אחוז

האינקורפורציה שנראתה בנוכחות PBAN ו-tralkoxydim. ניסויים קודמים (Eliyahu *et al.*, 2003) הראו ש-palmitoyl coenzyme A, הנחשב כהיזון חוזר שלילי לאנזים ACCase בבעלי חוליות, במסלול יצירת חומצות שומן, אכן מעכב יצירת פרומון ב-*H. armigera*. ממצאים אלו מחזקים את ההשערות לגבי חשיבותו של ACCase המושפע מ-PBAN. לעומת זאת, בניסויים בעבודה זו, לא נרשמה השפעה של נוכחות palmitoyl coenzyme A, כנראה בשל כמויות לא מספיקות בכדי ליצור את אפקט ההיזון השלילי. כמו כן נבדקה גם ההשפעה של mevastatin, מעכב האנזים HMG-coenzyme A reductase במסלול יצירת כולסטרול (מסלול מבלונאט) בבעלי חוליות. עבודות קודמות הראו עיכוב האנזים fatty acyl reductase בייצור פרומון בעש *B. mori* ע"י mevastatin (Ozawa *et al.*, 1995). בעבודה הנוכחית, גם לטיפול שכלל mevastatin לא הייתה השפעה על ייצור הפרומון. ניתן להסיק מכך ש-PBAN אינו משפיע על פעילות ה-fatty acyl reductase ב-*H. armigera* הניסויים שנערכו עם חומצת השומן d<sub>3</sub>-16:COOH כפרקורסור, הראו כי בשני המינים אין השפעה של תוספת PBAN על אחוזי האינקורפורציה למרכיב העיקרי של הפרומון, שהגיעו לרמות זהות לאלה שנראו בהיעדרו (איור 8). בנוסף לכך רמת אחוזי האינקורפורציה של d<sub>3</sub>-16:COOH ל-Z-11 hexadecenal של *H. armigera*, נשאו ברמות דומות בטיפולים השונים לרבות הטיפול שכלל הוספה של tralkoxydim. תוצאות ניסויים אלו הוכיחו שגם ב-*P. interpunctella* וגם ב-*H. armigera* שלב המפתח במסלול הביוסינתזה המושפע על ידי PBAN, הוא השלב הקודם ליצירת חומצת שומן פלמיטית. כאמור שלב זה עשוי להיות במעבר acetyl CoA ל-malonyl CoA על ידי ACCase או במעבר של malonyl CoA לחומצה פלמיטית בעזרת קומפלקס FAS. בשלב הבא בכדי לבדוק באיזה משני השלבים הנ"ל PBAN משפיע על ייצור פרומון המין, נערכו ניסויים תוך שימוש ב-<sup>13</sup>C malonyl CoA כפרקורסור. התוצאות מראות שכל עוד יש acetyl CoA זמין, אין הבדל באינקורפורציה של <sup>13</sup>C malonyl CoA למרכיב העיקרי של הפרומון בין טיפול הביקורת לטיפול עם PBAN (איור 13). ידוע שקומפלקס FAS מרכיב חומצות שומן ע"י שימוש ב-malonyl CoA בריאקציה המורכבת משבעה שלבים. בשלבים הראשונים של ריאקציה זו, האנזים מחבר מולקולות של malonyl CoA עם acetyl CoA לקבלת מולקולה beta-ketobutyryl המחוברת ל-acyl carrier peptide ומשמשת שלד לבניית שרשרת הפחמנים שמוארכת בשני פחמנים בכל פעם (על ידי חיבור עוד מולקולות של malonyl CoA), עד לקבלת חומצת השומן באורך הרצוי (למשל חומצה פלמיטית בעלת ששה עשר פחמנים) (Smith, 1994). זו הסיבה שכל עוד יהיה acetyl CoA זמין, קומפלקס האנזימים FAS אינו מושפע על ידי PBAN. אם כך ניתן להגיע למסקנה ש-PBAN משפיע על אנזים ה-ACCase והוא השלב הקובע את קצב יצירת פרומון המין בשני מיני העשים.

השלב הבא בעבודה עסק בניסיון לפענח את שלבי הסיום במסלול הביוסינתזה בעש *P. interpunctella*. כאמור השלבים הראשונים במסלול הביוסינתזה של פרומון המין ב-*P.*



*interpunctella* הם של סינתזת חומצת שומן פלמיטית (16:CoA). בשלבים שלאחר מכן נקבעים אורך השרשרת הסופית, כמות הקשרים הכפולים ואופי הקבוצה הפונקציונאלית. כאמור תרכובת הפרומון העיקרית של *P. interpunctella*, Z9, E12 tetradecenyl acetate, היא שרשרת בת ארבע עשר פחמנים המכילה שני קשרים כפולים. זאת אומרת שלאחר יצירת חומצה פלמיטית, חל קיצור של זוג פחמנים והוספה של שני קשרים כפולים. לאופן שבו מתרחשים שלבים אלו, קיימות שלושה אפשרויות (איור 14):



איור 14 : האפשרויות הקיימות של שילוב קשרים כפולים ע"י אנזימי desaturase שונים וקיצור שרשרת הפחמנים במסלול הביوسیנתזה של פרומון המין של *P. interpunctella*.

אפשרות אחת היא שלאחר סנתזת חומצת השומן הפלמיטית תהיה הכנסה של קשר כפול ע"י  $\delta 11$ -desaturase לקבלת Z11-16:CoA אח"כ תתרחש הפחתה של שני פחמנים ליצירת Z9, E12-14:CoA ואז הוספה של קשר כפול ע"י  $\delta 12$ -desaturase לקבלת Z9, E12-14:CoA. אפשרות נוספת לסיום מסלול הביوسیנתזה ב-*P. interpunctella*, הוספה של קשר כפול לחומצה הפלמיטית ע"י  $\delta 11$ -desaturase לקבלת Z11-16:CoA שלאחריה יתווסף קשר כפול נוסף ע"י  $\delta 14$ -desaturase לקבלת Z11, E14-16:CoA ואחר כך תתרחש הפחתה של שני פחמנים ליצירת Z9, E12-14:CoA. אפשרות שלישית כוללת הפחתה של שני פחמנים מהחומצה הפלמיטית לקבלה של חומצת שומן בת 14 פחמנים (14:CoA) ולאחר מכן החדרת קשר כפול על ידי  $\delta 9$ -desaturase ליצירת Z9-14:CoA. שאחריה תהיה הוספה של קשר כפול ע"י  $\delta 12$ -desaturase לקבלת Z9, E12-14:CoA. בדומה למבחני הביوسیנתזה שנערכו עם חומצות השומן  $d_3$ -16:COOH, גם כאשר ניתן הפרקורסור המסומן  $d_3$ -14:COOH, נתקבל סימון בפרומון המין של *P. interpunctella*. המשמעות של תוצאות אלו היא של-*P. interpunctella* יש את היכולת לנצל פרקורסורים בני 14 ו 16 פחמנים (סעיפים 2.3.1.5 ו 2.3.1.4) במסלול ייצור פרומון המין. בניסויים שנערכו לצורך ביקורת, כצפוי לעש *H. armigera* לא הייתה את האפשרות להשתמש ב- $d_3$ -14:COOH. זאת מכיוון שפרומון המין של מין זה מורכב משרשרת של שש עשרה פחמנים.

העובדה ש-*P. interpunctella* מסוגלת לנצל גם  $d_3$ -16:COOH ו  $d_3$ -14:COOH, מוכיחה את השימוש באנזימי  $\delta 9$ -desaturase ו  $\delta 12$ -desaturase בבלוטת פרומון המין,

המאפשרים את ניצול הפרקורסרים הנ"ל לייצור תרכובת הפרומון העיקרית. יש לציין כי האנזים  $\delta^{12}$ -desaturase הינו ייחודי ואינו נפוץ במיני עשים רבים. בעבודה של Jurenka משנת 1997 תוארו לראשונה שני מיני עש, שבדומה ל-*P. interpunctella*, גם הם משתמשים ב-ZETA כמרכיב העיקרי בפרומון המין שלהם: *Cadra cautella* שהוא מין קרוב ל-*P. interpunctella* ו-*Spodoptera exigua*. שני מינים אלו משתמשים ב- $\delta^{12}$  desaturase ו- $\delta^{11}$  desaturase במסלול ייצור פרומון המין שלהם ובניגוד למיני עשים רבים,  $\delta^9$  desaturase אינו חשוב במסלול הביוסינתיזה שלהם (Jurenka, 1997). באותה עבודה, הועלתה ההשערה שכל מיני העש האחרים המשתמשים ב-ZETA כמרכיב העיקרי בפרומון המין שלהם, ישתמשו באותו מסלול ביוסינתיזה. באופן מעניין, בעבודה הנוכחית הוכח ש-*P. interpunctella*, מייצרת גם היא את ZETA אך דרך מסלול שונה. מקרה דומה תועד במיני העשים הקרובים *H. zea* ו-*H. assulta* המייצרים את אותה תרכובת פרומון, אך בשני מסלולים שונים (Choi et al., 2002).

חשוב לציין כי בעבודה זו לא נפסלו האפשרויות של השימוש ב- $\delta^{11}$ -desaturase ו- $\delta^{14}$  desaturase בסיום מסלול הביוסינתיזה של *P. interpunctella* (איור 14). בכדי לעשות כך יש צורך להשתמש ב-Z11, E14-16:CoA ו-Z11-16:CoA כפרקורסרים מסומנים בניסויי *in vitro* כפי שנעשה עם חומצות השומן. בפרק הבא מתוארת העבודה שמטרתה לנסות ולאפיין את הגנים המקודדים לאנזימי desaturase, במין העש *P. interpunctella*.

### 3. קביעת רמת הביטוי של גנים המקודדים ל- $\delta$ -desaturase בבלוטת הפרומון של

#### *Plodia interpunctella*

##### 3.1. מבוא

##### 3.1.1 אנזימי $\delta$ -desaturase

תרכובות פרומוני המין הנמצאות בשימוש ע"י נקבות עשים ממינים שונים, שונות אחר מרעותה באורך שרשרת הפחמנים, הקבוצה הפונקציונאלית, מספר ומיקום הקשרים הכפולים שהן מכילות. כאמור, המבנה הסופי של תרכובת פרומוני המין נקבעת ע"י מספר אנזימי מפתח שתפקידם: הארכה וקיצור שרשרת הפחמנים, חיזור, חמצון, אצילטציה והוספת קשרים כפולים. המגוון הרב של האנזימים ואופן פעולתם בכל מין באופן ספציפי מקנה מגוון עצום של תרכובות פרומוני מין.

אנזימי  $\delta$ -desaturase מוסיפים קשר כפול לשרשראות של חומצות שומן (Jurenka, 2003). לאנזימי  $\delta$ -desaturase יש חשיבות רבה ביצירת המגוון העצום של מבנה פרומוני המין בין מיני העשים השונים כיוון שיש להם השפעה לא רק על מספר או מיקום הקשרים הכפולים שיופיעו בתרכובת הפרומון הסופית, אלא גם על האופן הגיאומטרי שבו יכנס הקשר הכפול (*trans (E)* או *cis (Z)*) (Knipple et al., 2002).

לראשונה היה זה אנזים ה- $\delta$ 11 desaturase שבודד מבלוטת הפרומון של העש *Trichoplusia ni*. ניתוח ביוכימי של האנזים הראה הומולוגיה גבוהה לאנזימי ה- $\delta$  desaturase הממברנליים (הידועים גם בשם acyl-CoA desaturase) (Wolf & Roelofs, 1986). תפקידם של אנזימי ה- $\delta$  desaturase הממברנליים, הנפוצים בתאים אאוקריוטים, הוא לווסת את נזילות הממברנה כתגובה לעקת קור, על ידי הוספה של חומצות שומן בלתי רוויות (וויסות הומאוסטטי) (Tiku et al., 1996). ההומולוגיה של אנזימי ה- $\delta$  desaturase הממברנליים לאנזימי  $\delta$ -desaturase, אומתה בעקבות שיבוט ו-functional expression של cDNA המקודד לאנזימי  $\delta$ -desaturase, המשתתפים בתהליך ייצור הפרומון בעשים: *T. ni* (Knipple et al., 1998), *Helicoverpa zea* (Rosenfeild et al., 2001) ו-*Epiphyas postvittana* (Liu et al., 2002). מחקרים אלו הראו שמשפחת אנזימי ה- $\delta$  desaturase הממברנליים עברה תהליך של אבולוציה לפרפראיים, לא רק בתפקידם המקורי בשומני הממברנה, אלא גם לתפקוד חדש לצורכי ייצור סיגנלים כימיים המשומשים בתקשורת כימית ברמה הגבוהה ביותר (Knipple et al., 2002).

המעורבות של אנזימי  $\delta$ -desaturase בייצור פרומוני מין ידועה עד היום רק בחרקים. נכון להיום תואר מגוון גדול של אנזימי  $\delta$ -desaturase המעורבים בתהליכי ייצור פרומוני מין בעשים רבים שבחלקם קיימים יותר מאנזים  $\delta$ -desaturase אחד (Jurenka, 2003). הסוגים השונים של אנזימי  $\delta$ -desaturase נבדלים אחד מרעהו במיקום הקשר הכפול שהם

מוסיפים ומכאן גם הם מקבלים את שמם. לדוגמא אנזים שמוסיף קשר כפול לפחמן התשיעי  
בשרשרת, יקרא  $\delta$ -desaturase-9.

### 3.1.2 התבטאות גני $\delta$ -desaturase בעש *Plodia interpunctella*.

נכון להיום לא נערך מחקר על הבקרה של התבטאות הגנים המקודדים ל- $\delta$ -desaturase בעש *Plodia interpunctella*. עבודות קודמות שנעשו, הראו כי קיימים תשעה גנים פוטנציאליים המקודדים לאנזימי  $\delta$ -desaturase בבלוטת הפרומון של המין *P. interpunctella* עד היום בודד רק ה-*central region* (CR) מתוך ה-*open reading frame* של הגנים הנ"ל (Knipple et al., 2002). כדי לפענח אלו מתשעת הגנים החשודים כמקודדים לאנזימי  $\delta$ -desaturase המצויים בבלוטת פרומון המין של העש *P. interpunctella*, משתתפים בתהליך ייצור הפרומון, נבדקת רמת הביטוי של כל אחד מהם בבלוטות הפרומון בפרק ז'. הנחת העבודה היא שהגנים שמתבטאים ברמות הגבוהות ביותר, יהיו הגנים המקודדים לאנזימים הפעילים בתהליך ייצור הפרומון. במחקר עתידי יהיה צורך בבידוד ה-*coding region* במלואו וביצוע מבחני ביטוי של כל אחד מהם בשמרים או מערכת ביטוי מתאימה אחרת, כפי שנעשה בעבודות קודמות (Liu et al., 1999, Liu et al., 2004), על מנת לאמת את השתתפותם בייצור פרומון המין.

## 3.2 שיטות וחומרים

### 3.2.1 בידוד 9 גני $\delta$ -desaturase של *P. interpunctella* cDNA של בלוטות הפרומון

#### 3.2.1.1 הפקת RNA

בלוטות פרומון הוסרו בזהירות מנקבות עש בתולות בנות 2-3 ימים. הבלוטות נאספו לתוך מבחנות נטולות RNAase (Ambion), המכילות ריאגנט RNAlater (Qiagen), למניעת פירוק ה-RNA על ידי RNAase. הבלוטות אוסנו ב-80°C עד להפקת ה-RNA. Total RNA בודד ונוקה מבלוטות הפרומון בעזרת ערכת הפקה RNAeasy (Qiagen). ערכה זו מתבססת על הוספת guanidine-isothiocyanate, בופר פירוק ואתנול, לדוגמאות. ע"י כך נוצרים תנאים המעודדים היקשרות בררנית של RNA לממברנת הסיליקה ג'ל. הדוגמא עוברת קשירה לממברנה הסיליקה ג'ל, בקולונה (spin column). מזהמים שונים נשטפים החוצה, וה-RNA ממוצה במים, בהתאם לפרוטוקול המומלץ על ידי היצרן. כמות ואיכות ה-RNA הוערכה על ידי ספקטרופוטומטר (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA). בסיום הפקת ה-RNA בוצע טיפול DNAase כדי לבטל אפשרות זיהום ע"י DNA גנומי בעזרת קיט DNAase (Ambion).

### 3.2.1.2 בידוד ושיבוט של 9 הגנים המקודדים ל- $\delta$ -desaturase מ-cDNA של בלוטות

#### הפרומון

cDNA חד גדילי (ss-cDNA) התקבל מ-mRNA שהופק מבלוטות פרומון בעזרת קיט לריאקצית Reverse Transcriptase (ABgene) Reverse iT 1<sup>st</sup> Strand Kit (RT) בעזרת תחל Random Hexamer. ה-ss-cDNA שנתקבל שימש כתבנית לריאקציות ה-PCR על מנת לשלוף את האזור המרכזי של גני ה- $\delta$ -desaturase תוך שימוש בשתי זוגות תחלים דגנרטיביים (degenerate primers) PIN1,2 ו PIN3,4 (טבלה 2) שתוכננו על פי רצפי  $\delta$ -desaturase הידועים ממיני עשים שונים (ע"י פונקצית BLAST באתר של NCBI). תוצרי ה-PCR הורצו באלקטרופורזה על גבי ג'ל (agarose) 1% ונשלחו לריצוף.

**טבלה 2:** רצפי התחלים ששמשו לריאקציות PCR לבידוד ה-CR של תשעת גני ה- $\delta$ -desaturase.

Primer Name	Sequence	Gene accession number	PCR product size (bp)
PIN1	5'-GGGCACATMGRYTGTGGWSRCA-3'	Degenerate primer	~ 500
PIN2	5'-GRTGGWARTTGTGRWARCCYTC-3'		~ 500
PIN3	5'-ATYACHGCCGGKMYCAYMG-3'		~ 500
PIN4	5'-GGRAABDYGTGRTGGWAGTT-3'		~ 500
PIN22-1	5'-TGGTCACACAGGTCGTTTAAAGGCT-3'	AF482922	427
PIN22-2	5'-TGCTGTTGATCGAGCATGAGAGGT-3'		
PIN23-1	5'-TATCGCCTTTCAAGACACCGCTCT-3'	AF482923	420
PIN23-2	5'-TGAAGTGAAGCAAGGGTCCTGTCA-3'	AF482924	366
PIN24-1	5'-CAAAGCGAAACTGCCGTTGGAGAT-3'		
PIN24-2	5'-AAGTTGATGTGCCAGGCGGTAATG-3'		
PIN25-1	5'-CAGGGTTCACCACAA-3'	AF482925	360
PIN25-2	5'-CCGATGTGGGAGAA-3'		
PIN26-1	5'-CCACCACAAGTTCAG-3'	AF482926	354
PIN26-2	5'-TCAATGTCGCTCATG-3'		
PIN27-1	5'-GAGCCACGTCACATT-3'	AF482927	409
PIN27-2	5'-ATCTTGATGCCCTG-3'		
PIN28-1	5'-GTTTCGTCCTGTGTTT-3'	AF482928	452
PIN28-2	5'-CTACGTTGATGCCAA-3'		
PIN29-1	5'-CCTCTGGCTTGCTTC-3'	AF482929	480
PIN29-2	5'-ACGTACGAAATACGCGTTCC-3'		
PIN30-1	5'-CCGTTATGGTCCCACAAAGCC-3'	AF482930	493
PIN30-2	5'-CAGCGCCAGAGCTCCAATAAATG-3'		

### 3.2.1.3 חיפוש אחר 9 גני $\delta$ -desaturase של *P. interpunctella* כביקורת אצל זכרים

על מנת לבדוק האם 9 גני  $\delta$ -desaturase הם ספציפיים רק לנקבות נערכו ניסיונות לבודד את תשעת הגנים בזכרים. RNA הופק מקצה בטן של זכרים בוגרים (מיקום המולוגי למיקום בלוטת פרומון המין אצל הנקבות). מה-RNA שהופק הוכן cDNA באותו אופן שנעשה

במקרה של הנקבות (בדומה לסעיפים 2-3.2.1.1). ה- cDNA שימש כתבנית ל- PCR עם אותם זוגות תחלים (טבלה 2) ששימשו במקרה של הנקבות. תוצרי ה- PCR הורצו באלקטרופורזה על גבי ג'ל (agarose) 2% ונשלחו לריצוף.

### 3.2.2 אפיון רמת הביטוי של הגנים תוך שימוש ב-PCR כמותי (qRT-PCR)

#### 3.2.2.1 תכנון תחלים עבור ריאקציות qRT-PCR

הרצפים של כל אחד מ-9 גני ה-  $\delta$ -desaturase ב- *P. interpunctella*, נלקחו מאתר האינטרנט של NCBI. זוג תחלים ספציפיים לכל גן תוכננו לתגובת PCR כמותית המאפשרת לחשב את מספר העותקים של הגן איתו התחלנו את הריאקציה quantitative Real Time PCR (qRT-PCR). (גודל התוצרים הוא 150-250 bp), (טבלה 3) בעזרת התוכנה Primer 3. רמות המבנה השניוני, דימרים עצמיים והטרו-דימרים זוהו בעזרת תוכנת Oligo Analyzer 3.0 ([www.idtdna.com](http://www.idtdna.com)).

**טבלה 3** : רצפי התחלים ששמשו לריאקציות qRT-PCR.

Primer Name	Sequence	Gene accession number	PCR product size (bp)
DES22-1	5'-TGTGGTCACACAGGTCGTTT-3'	AF482922	151
DES22-2	5'-TTGTGTGGGTCAGCATCAGT-3'		
DES23-1	5'-GCCACTGCAAATCCTCCTAA-3'	AF482923	130
DES23-2	5'-TGTTGACCAGGAAAGTGACG-3'		
DES24-1	5'-TCAACTTGCTGCGATACGTT-3'	AF482924	151
DES24-2	5'-GGCAAGTTTTGGACTGAAGC-3'		
DES25-1	5'-CAGGGTTCACCACAAATTCA-3'	AF482925	136
DES25-2	5'-CCGATGTGGGAGAAGAAGAA -3'		
DES26-1	5'-TCTCACACATCGGCTGGCTAATGA-3'	AF482926	78
DES26-2	5'-TGCTAAGGCTGGTAGGCAGAATGT-3'		
DES27-1	5'-ATCTTGATGCCCTGACTTG -3'	AF482927	132
DES27-2	5'-GAGCCACGTCCTTGAGAA-3'		
DES28-1	5'-GTTTCGTCCTGTGTTTCGTGA-3'	AF482928	116
DES28-2	5'-CTACGTTGATGCCAATGGTG-3'		
DES29-1	5'- CCTCTGGCTTGCTTCATTCT -3'	AF482929	132
DES29-2	5'- ACGTACGAAATACGCGTTCC -3'		
DES30-1	5'-TCAATCTTGACATGGGTGGA-3'	AF482930	85
DES30-2	5'-AACCTTTCGTGCGATTATGG-3'		

#### 3.2.2.2 אימות הספציפיות של תוצרי ה-qRT-PCR באמצעות PCR

אימות הספציפיות של תוצרי qRT-PCR נעשה בעזרת PCR והרצה בג'ל אלקטרופורזה (agarose) כדי לוודא אורכים ורצפים של גנים מעוררי עניין באשר לגני ה-  $\delta$ -desaturase ב- *P. interpunctella*. ריאקציות סטנדרטיות של 30  $\mu$ l שימשו ל-PCR שהכילו 15  $\mu$ l של

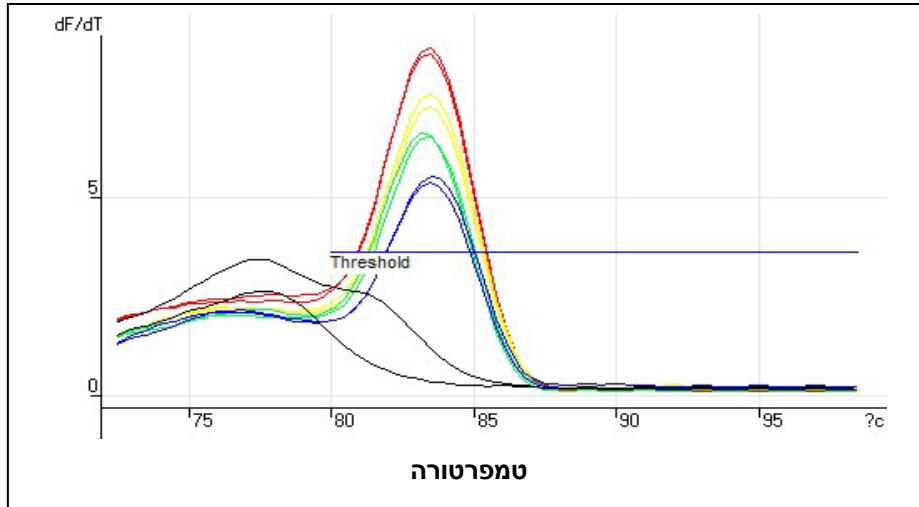
תערובת DNA polymerase (Qiagen), 0.2 mM dNTP, 1 µl של 10mM מכל תחל, 2 µl ss-cDNA ו 11 מים מזוקקים. ה-PCR בוצע תחת התנאים שלהלן: טמפרטורת דנטורציה של 94 °C, 5 דקות; 35 מחזורים של 94 °C, 40 שניות; 48 °C, 60 שניות; 72 °C, 2 דקות בתוספת של 5 דקות ב-72 °C בסיום. תוצרי ה-PCR לאחר ההרצה בג'ל מוצו מהג'ל, עברו ליגציה לפלסמיד ליניארי TOPO TA PCR 2.1 (Invitrogen) שהוחדר לתאים קומפנטטיים Top 10 (Invitrogen). Colony PCR שימש לסריקה של מושבות חיוביות בהן המחדר נכנס. ה-DNA הפלסמידי מהמושבות החיוביות מוצה ונשלח לריצוף (HyLabs, Rehovot, Israel). התוצרים שרוצפו הושוו בעזרת BLAST באתר NCBI עם ה-CR של הגנים המקוריים של *δ-desaturase* ב-*P. interpunctella*.

### 3.2.2.3 ריאקציות qRT-PCR

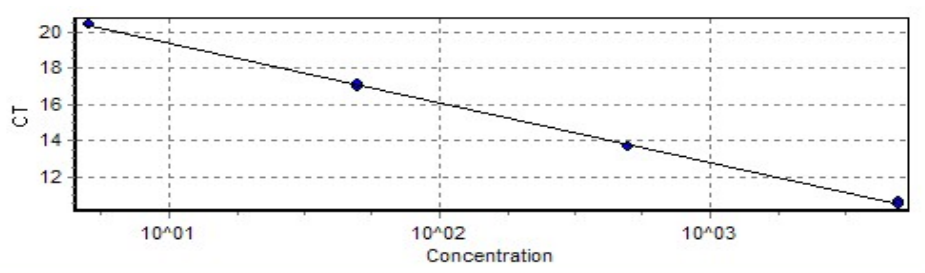
כדי לקבוע את רמת השעתוק של כל אחד מ-9 גני *δ-desaturase* ב-*P. interpunctella* נעשה שימוש ב-PCR כמותי (qRT-PCR) עם המכשיר (Corbett, Rotor-Gene Research, Sydney, Australia), להגברת תשעת הגנים מ-cDNA של בלוטות הפרומון. הריאקציות נערכו בנפח סופי של 20 µl למבחנה. כל ריאקציה הכילה 0.3 µM מכל תחל, תערובת המכילה: *Thermus brockianus* DNA polymerase Hot Start, SYBR Green, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP (שכללה dUTP ומים), 1 dye, בופר PCR, 16 סטנדרטים של cDNA (NTC, template DNA) (ללא בקרות שליליות) בכל הרצה, שתי בקרות שליליות (4 ריכוזים כפול 4 חזרות לכל ריכוז) נכללו. הפרוטוקול שלהלן שימש עבור qRT-PCR: הדגרה מקדימה של 15 דקות ב 95 °C מעלות, בעקבותיה 40 מחזורים של 5 שניות ב 95 °C 15 שניות ב 60 °C ו 20 שניות ב 72 °C. קו הסף נקבע על 30 יחידות פלואורסצנטיות על גבי ציר Y. אנליזה של עקומת ההתכה (Melting curve) (איור 15), בוצעו מיד לאחר PCR כדי לזהות תוצרי PCR ספציפיים ודימרים של תחלים, כשהטמפרטורה עלתה באיטיות מ-72 ל-99 °C.

מניסויים ראשוניים עלה כי הגן AF482924 התבטא ברמות גבוהות יותר, ולכן נבחר לחישוב מספר ההעתקים היחסי של גני *δ-desaturase*. בהרצות qRT-PCR לכל גן, נכללה תמיד עקומת הסטנדרט של AF482924 שבכל הרצה הייתה בעלת יעילות (efficiency) קרובה ל-1.0 (בטווח בין 0.95 ל-1.01) (איור 16). מכיוון שבניסויים הנ"ל נבדקה רמת הביטוי היחסית של כל אחד מתוך תשעת הגנים באותה רקמה (cDNA מבלוטות הפרומון של נקבות), לא היה צורך בשימוש בגן מדווח (house keeping gene) (Liu et al., 2004). מספר העתקים של גנים הנבחנו נקבעו בעזרת חישובי C<sub>t</sub> (מחזור סף הבסיס) (Rotor Gene Software, גרסה 6.0.34). רמות ביטוי יחסי של גנים חושבו מערכי C<sub>t</sub> ממוצעים של הגנים הנבחנו (6)

חזרות של שתי הרצות qRT-PCR (נפרדות) ביחס לערכי  $C_t$  שהתקבלו עבור AF482924  
 $(=\Delta C_t)$ . רמות ביטוי יחסיות הוגדרו כך:  $\text{inverse log}(-\text{mean } \Delta C_t)$ .



איור 15: דוגמא לעקומת ההתכה (Melting curve) של הגן AF482924 לצורך המחשת הספציפיות של תוצרי ריאקציה qRT-PCR בכל ארבעת מיהולי ה-cDNA השונים והביקורת השלילית (NTC). אדום- 1:5, צהוב- 1:50, ירוק- 1:500, כחול – 1:5000, שחור- NTC.



איור 16: דוגמא לעקומת סטנדרט של הגן AF482924. שיפוע הגרף שווה ל -3.3.

### 3.2.3 ניסיון להשתקת ביטוי הגנים AF482923 ו AF482924 באמצעות RNAi

התוצאות בסעיף העוסק באפיון רמת הביטוי של גני ה- $\delta$ -desaturase בבלוטת הפרומון תוך שימוש ב-PCR כמותי, הראו שהגנים AF482923 ו AF482924 מתבטאים ברמה הגבוהה ביותר ביחס לשאר שבעת גני ה- $\delta$ -desaturase (סעיף 3.3.2). על מנת לנסות ולאמת את חיוניותם של הגנים AF482923 ו AF482924 במסלול הביוסינתיזה של פרומון המין בנקבות *P. Interpunctella*, נערך ניסיון להשתיק את ביטוי הגנים הנ"ל עי ידי שימוש בטכניקה של RNAi. בטכניקת RNAi מחדירים מולקולות ds-RNA (דו גדילי) המותאמות לרצף הגן שאותו רוצים להשתיק לגוף נקבות בתולות בוגרות בנות יום (במקרה הנוכחי ע"י הזרקה). הנחת העבודה הייתה שאם הביטוי של שני גנים אלו ישותק, ייצור פרומון המין בנקבות שבהן יושתק, יפחת או ייעצר בהשוואה לנקבות שבהן לא יושתקו הגנים האלו, שבהן רמת ייצור הפרומון לא תושפע.



### 3.2.3.1 PCR להכנת תבנית DNA לסינתזה של ds-RNA

ה- DNA ששימש כתבנית לסינתזה של ds-RNA בריאקציה PCR הוכן ע"י שימוש בתחלים ספציפיים לכל גן (AF482923, AF482924). כל תחל הכיל בנוסף אתר היקשרות להתחברות האנזים T-7 polymerase (מסומן באדום בטבלה 4) שהופך את ה-ds-DNA ל-ds-RNA. עבור כל גן בוצעו שש ריאקציות PCR סטנדרטיות של 30µl ששימשו ל-PCR שהכילו 15µl של תערובת DNA polymerase (Qiagen), 0.2 mM dNTP, ו-1 µl של 10mM ss-cDNA ו-2 µl מים מזוקקים. ה-PCR בוצע תחת התנאים שלהלן: טמפרטורת דנטורציה של 94 °C, 5 דקות; 35 מחזורים של 94 °C, 40 שניות; 48 °C, 60 שניות; 72 °C, 2 דקות בתוספת של 5 דקות ב-72 °C בסיום. לאחר מכן תוצרי ה-PCR הורצו על גבי ג'ל באלקטרופורזה ונוקו בעזרת ערכת ניקוי לתוצרי PCR (QIAquick PCR purification kit- Qiagen). כל שש תוצרי ריאקציות ה-PCR של כל גן אוחדו בשלב הניקיון ע"ג קולונה אחת לצורך מקסום כמויות. התוצרים המנוקים שימשו כתבנית בתהליך הפיכת ה-DNA ל-dsRNA.

### 3.2.3.2 סינתזה, ניקוי וכימות ה- dsRNA

בעזרת קיט (AmpliScribe T7-Flash Transcription kit – Epicentre) בוצעה הסינתזה של dsRNA ע"י שימוש ב-7 µl dsDNA שהושג בסעיף 3.2.3.1. על פי הוראות היצרן. לאחר מכן הדוגמאות שהו באינקובציה של 37 °C למשך ארבע שעות. לאחר מכן ה- dsRNA עבר ניקוי באמצעות קיט (RNA cleanup RNAeasy kit – Qiagen) בהתאם להוראות היצרן. כמות ואיכות ה-RNA הוערכה על ידי ספקטרופוטומטר (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA).

### 3.2.3.3 ניסוי השתקת ביטוי הגנים *in vivo*

על מנת לבדוק את השפעת ה-RNAi על פעילות הגנים וייצור פרומון המין בנקבות המטופלות, נבדקה ההשפעה של הזרקת ה-dsRNA שסונתז בסעיף 3.2.3.2 לנקבות בוגרות בתולות בנות יום אחד. לאחר ההזרקה של dsRNA (טיפול הזרקה של מים ואי הזרקה כלל שימשו כביקורת), הבלוטות הוסרו והועברו למיצוי הפרומון בהקסאן (חמש בלוטות מוצו יחד לכל חזרה. בכל טיפול נערכו שתי חזרות), כפי שתואר בסעיף 2.2.2.1.1. המיצוי הוזרק למכשיר GC לקביעת כמות הפרומון שנוצר בכל טיפול.

Gene accession number	Primer Name	Primer Sequence	PCR product size (bp)
AF482923	DES23-R1	5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACGCCACTGCAAATCCTCCTAA-3'	156
	DES23-R2	5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCAGCCGACGTGTGAGTAGAA-3'	
AF482924	DES24-R1	5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCAC TCAACTTGCTGCGATACGTT-3'	151
	DES24-R2	5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACGGCAAGTTTTGGACTGAAGC-3'	

### 3.3 תוצאות

#### 3.3.1 בידוד 9 הגנים המקודדים ל $\delta$ -desaturase מ-cDNA של בלוטות הפרומון ב-

##### *P.interpunctella*

RT-PCR שימש להגברת האזור המרכזי של 9 גני  $\delta$ -desaturase מ-*P.interpunctella* (תמונה 2), (מספרי הגנים בבנק הגנים: AF482922, AF482923, AF482924, AF482925, AF482926, AF482927, AF482928, AF482929, AF482930) בעזרת 9 זוגות של תחלים מ-cDNA בלוטות הפרומון כפי שנעשה קודם לכן ע"י Knipple et al. 2002.

כפי שניתן לראות בתמונה 3 כל תשעת גני  $\delta$ -desaturase הם ספציפיים לנקבות כיוון שגם בזכרים בוגרים וגם בזכרים בשלב הגולם (לא מפורסם) לא התקבלו תוצרים בריאקצית PCR עם התחלים הספציפיים של כל תשעת הגנים.



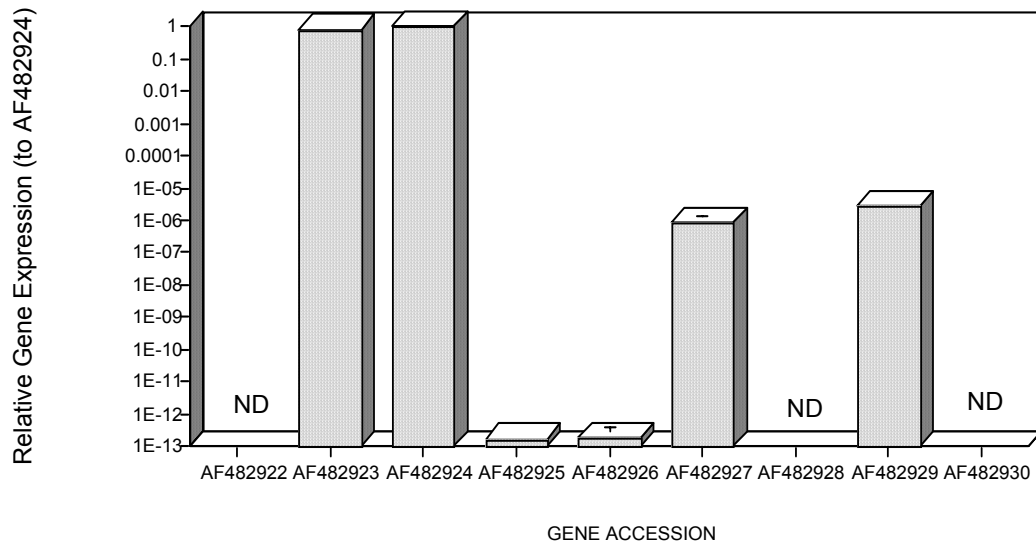
תמונה 2: תוצרי ריאקצית PCR עם התחלים הספציפיים לכל גן ועם cDNA מבלוטות הפרומון. ההרצה בוצעה ע"ג גל אגרוז 2% מקטעי ה-DNA נצפו תוך הארה באור U.V. 1- מרקר 2- AF482922, 3- AF482923, 4- AF482924, 5- AF482925, 6- AF482926, 7- AF482927, 8- AF482928, 9- AF482929, 10- AF482930, 11- ביקורת עם התחלים PIN3,4.



תמונה 3: תוצרי ריאקציה PCR עם התחלים הספציפיים לכל גן ועם cDNA מנקבות וזכרים בוגרים. ההרצה בוצעה ע"ג גל אגרוז 2%. מקטעי ה-DNA נצפו תוך הארה באור U.V. 1- מרקר -2, AF482922, -3, AF482923, -4, AF482924, -5, AF482925, -6, AF482926, -7, AF482927, -8, AF482928, -9, AF482929.

### 3.3.2 קביעת רמות ביטוי גנים בעזרת Real Time PCR (qRT-PCR)

qRT-PCR נעשה כדי לכמת את רמת הביטוי של כל 9 גני  $\delta$ -desaturase מספריות cDNA של בלוטת הפרומון של *P.interpunctella* שיוצרו מבלוטות פרומון של נקבות עש בנות 2-3 ימים. הנתונים (איור 17) מראים כי הגנים AF482923, AF482924 שכיחים לפחות פי 100000 פעמים בבלוטת הפרומון של הנקבות הבוגרות מאשר כל שאר גני  $\delta$ -desaturase. טבלה 5 מסכמת את משוואות הסטנדרט והיעילות (efficiency) עבור כל אחד מגני  $\delta$ -desaturase.



איור 17: רמת ביטוי של 9 גני  $\delta$ -desaturase מספריות cDNA של בלוטת הפרומון של *P.interpunctella*. ND = לא זוהה.

**טבלה 5:** ריכוז משוואות עקומת הכיול של גני  $\delta$ -desaturase בריאקצית qRT-PCR.

Gene name	Standard curve	Reaction efficiency $r^2$	homology to the original gene in BLAST
AF482922	CT= -3.261*log(con) +39.618	0.984	97%
AF482923	CT= -3.526*log(con) +27.172	0.996	100%
AF482924	CT= -3.382*log(con) +24.765	0.997	100%
AF482925	CT= -3.498*log(con) +35.394	0.993	99%
AF482926	CT= -3.331*log(con) +40.873	0.997	96%
AF482927	CT= -3.164*log(con) +29.100	0.998	97%
AF482928	CT= -3.369*log(con) +42.718	0.965	97%
AF482929	CT= -3.141*log(con) +30.051	0.995	98%
AF482930	CT= -3.569*log(con) +42.180	0.975	98%

### 3.3.3 ניסיון להשתקת ביטוי הגנים AF482923 ו AF482924 באמצעות RNAi

טבלה 6 מסכמת את תוצאות הניסוי הבודד שנערך על מנת לנסות להשתיק את הגנים AF482923 ו AF482924 באמצעות RNAi. התוצאות מראות עיכוב בייצור הפרומון בטיפול ההזרקה של dsRNA הומולוגי לגן AF482923, לעומת שאר הטיפולים. טיפול ההזרקה של dsRNA הומולוגי לגן AF482924 גרם ליצור פרומון ברמות דומות לטיפול ההזרקה של אן 4 של מים. כמו כן ניתן לראות כי קיימת השפעה של ההזרקה עצמה על ייצור הפרומון. טיפול הזרקה המים גרם לייצור מופחת של פרומון לעומת הטיפול ללא הזרקה.

**טבלה 6 :** ריכוז תוצאות מיצוי הפרומון במכשיר GC, בניסוי *in vivo* להזרקה RNAi בנקבות של *P. interpunctella*.

טיפול	כמות פרומון ממוצעת ב-(ng/female)	
	כמות dsRNA שהוזרק לכל נקבה (נפח ההזרקה בסוגריים)	(מס' החזרות בסוגריים)
ללא הזרקה	---	1.47 ± 0.65 (*)
מים	0 (2µl)	1.24 ± 0.014 (n=2)
מים	0 (4µl)	0.70 ± 0.070 (n=2)
RNAi 23	86.94ng (2µl)	0.12 ± 0.025 (n=2)
RNAi 23	173.88 ng (4µl)	0.37 ± 0.086 (n=2)
RNAi 24	87.2 ng (4µl)	0.77 ± 0.019 (n=2)

\* נתון מ- (Rafaeli & Gileadi (1999)

### **3.4 דיון ומסקנות**

בעבודה זו זוהו, כפי שנעשה בעבר (Knipple *et al.*, 2002), ה- central region של תשעת הגנים הפוטנציאליים המקודדים לאנזימי  $\delta$  desaturase בבלוטת פרומון המין של *P. interpunctella*. כמו כן הוכחה הספציפיות שלהם לנקבה בלבד, שכן הם לא נמצאו בזכרים (סעיף 3.3.1).

השערת המחקר בעבודה זו טוענת כי סיום המסלול המשוער של ייצור פרומון המין שמתרחש בעש *P. interpunctella*, כולל שימוש ב-  $\delta 9$ -desaturase והאנזים הייחודי  $\delta 12$ -desaturase, שאחראיים על הוספת הקשרים הכפולים בתרכובת הפרומון העיקרית Z9, E12 tetradecenyl acetate. על פי השערה זו נצפה למצוא שני גנים המקודדים לאנזימים הנ"ל. כדי לקבוע את רמת השעתוק של כל אחד מתשעת הגנים, נעשה שימוש ב- PCR כמותי (qRT-PCR). תוצאות הניסויים לקביעת רמת השעתוק עם qRT-PCR, העלו כי הגנים AF482923 ו AF482924 התבטאו ברמות גבוהות ביותר לעומת שאר שבעת הגנים שנבדקו שהראו רמות מזעריות של שעתוק או אפילו רמה כל כך מועטה עד שלא ניתן לזהות כל שעתוק ע"י qRT-PCR. ניתן להניח בזהירות אם כן, כי הגנים AF482924 ו AF482923, הם אלו המקודדים לאנזימים  $\delta 9$ -desaturase ו  $\delta 12$ -desaturase. חשוב לציין שבכדי להוכיח טענה זו ולהתאים לכל גן את האנזים לו הוא מקודד, יש צורך לבודד את הגן במלואו ולבצע אפיון ביוכימי לשני הגנים הנ"ל על ידי טרנספורמציה וביטוי בתאים שבאופן טבעי אינם מבטאים גנים אלו (functional assay).

עבודות קודמות שעסקו באפיון פעילות של גני  $\delta$  desaturase בבלוטת פרומון המין במיני עשים אחרים (הראו הימצאותם של גנים פוטנציאליים כגני  $\delta$  desaturase לפי רצף אך מבוטאים ברמות נמוכות או אינם מבוטאים כלל בתאי בלוטת הפרומון של נקבות העש (Roelofs & Rooney, 2003, Liu *et al.* 2004). תוצאות בחינת זיהוי פעילות desaturase ביוכימית *in vitro* של גנים אלו, על ידי בצע מבחני functional assay, הראו מאוחר יותר כי

הם היו חסרי פעילות  $\delta$  desaturase בתאי בלוטת פרומון המין. על פי תוצאות אלו ניתן להניח כפי הנראה, ששבעת הגנים הנוספים ב- *P. interpunctella* שרמת השעתוק שלהם הייתה נמוכה או בלתי ניתנת לזיהוי ב-qRT-PCR, חסרי פעילות  $\delta$  desaturase בתאי בלוטת פרומון המין. כמובן שגם את השערה זו יש לאמת על ידי ביצוע מבחני functional assay לכל אחד מהם.

בהרבה מיני עשים קיימות משפחות של גני desaturase (Knipple et al., 2002). כאמור חלק מהגנים הינם בעלי פעילות desaturase במסלול יצירת פרומון המין וחלק מהגנים חסרי כל פעילות ואינם עוברים שעתוק. עובדה זו מעלה את שאלת נחיצותם של הגנים הבלתי פעילים. אנזימי Acyl CoA desaturase חולקים דמיון מבני עם אנזימי omega-hydroxylase (Shanklin et al., 1997, Broadwater et al., 2002, Shanklin & Whittle, 2003), לכן קיימת ההשערה הפתוחה למחקר עתידי, כי אנזימי desaturase בלתי פעילים, בעצם בעלי פעילות של אנזימי omega-hydroxylase. תרחיש אחר היכול להסביר את נוכחותם של גני desaturase בלתי פעילים בבלוטת הפרומון של נקבות עשים, טוען כי הם מעין "מחסן מלאי לשעת חירום". גנים היכולים לעבור תהליך של אבולוציה כדי ליצור תרכובות פרומון חדשות שלא היו קיימות במין העש קודם לכן. תרחיש שכזה קרה בעש *Ostrinia furnacalis*, כאשר חוקרים הראו שגן desaturase שהיה לא פונקציונאלי עבר התפתחות אבולוציונית והפך לאנזים פעיל במסלול ייצור פרומון המין בעש זה (Roelofs et al., 2002). קרוב לוודאי שתהליך זה התרחש באופן דומה לאבולוציה שעברו אנזימי -  $\delta$  desaturase, מאנזימי acyl-CoA desaturase. יש לציין כי קיימים גם מקרים הפוכים בהם יש גני desaturase פעילים שעוברים שעתוק ומייצרים שרשראות של 14 ועד 26 פחמנים עם קשר כפול (למשל  $\delta$ 9-desaturase ב- *Choristoneura parallela*) (Liu et al., 2004), שלא בהכרח קשורות לתהליך ייצור הפרומון.

בכדי לאשש את ההשערה שאכן הגנים AF482923 ו AF482924 הם האחראיים על הוספת הקשרים הכפולים במסלול הבייוסינתיזה של *P. interpunctella*, מבלי לערוך functional assay, נעשה ניסיון בודד להשתיק את התבטאותם על ידי שימוש בטכניקת RNAi. מטרת השימוש בשיטה היא לבדוק את ההשפעה של השתקת הגנים על ייצור הפרומון אצל נקבות העש. תוצאות הניסויי הבודד שנערך, הראו שהזרקת dsRNA הומולוגי לגן AF482923 לנקבות, גרם לייצור מופחת של פרומון בבלוטות. לעומת זאת, טיפולי ההזרקה של dsRNA הומולוגי לגן AF482924, לא הראו אפקט בולט של השפעה על ייצור הפרומון לעומת טיפולי הזרקת המים. על מנת לקבל תמונה מדויקת לגבי השפעת השתקת הגנים באמצעות טכניקת RNAi, על ייצור פרומון המין, יש לחזור על הניסוי הנ"ל עם כמות חזרות גדולה יותר וכן יש לנסות להפיק dsRNA בריכוז גבוהה יותר על מנת לקבל אפקט השתקה חזק יותר.

#### 4. דיון מסכם

עבודה זו קידמה את הידע הקיים לגבי האופן שבו PBAN משפיע על קצב ייצור הפרומון במיני העשים- *P. interpunctella* ו- *H. armigera*. זאת על ידי זירוז פעילותו של האנזים ACCase בשלב יצירת חומצות השומן המשמשות כפרקורסרים ליצירת תרכובת הפרומון הסופית. כמו כן מבחני הביויסינטיזה שנערכו עם חומצות השומן המסומנות על העש- *P. interpunctella*, הביאו לפענוח שלבי הסיום של מסלול הביויסינטיזה של פרומון המין. באופן מפתיע בשונה ממין העש הקרוב *C. cautella*, במין העש- *P. interpunctella*, קודם מתרחשת הפחתה של זוג פחמנים ורק אח"כ הכנסת הקשרים כפולים באופן דומה המתרחש במין העש *Argyrotaenia velutinana* (Bjostad et al., 1984).

בחלק לקביעת רמת ביטוי הגנים המקודדים ל- $\delta$ -desaturase בבלוטת הפרומון של *Plodia interpunctella* בעבודה, נתקבלו תוצאות המראות שני גנים (מתוך תשעת הגנים הפוטנציאליים כמקודדים לאנזימי  $\delta$ -desaturase המצויים בבלוטת הפרומון של *P. interpunctella*), המתבטאים באופן גבוה בהרבה משאר הגנים. מצירוף התוצאות שנתקבלו ממבחני הביויסינטיזה והחלק לקביעת רמת הביטוי של גני ה- $\delta$ -desaturase, ניתן להגיע בזהירות למסקנה שבמסלול הביויסינטיזה של פרומון המין של *P. interpunctella*, האנזימים  $\delta$ 9-desaturase ו- $\delta$ 12-desaturase הם האחראיים על הוספת הקשרים הכפולים בתרכובת הפרומון העיקרית Z9, E12 tetradecenyl acetate והגנים המקודדים לשני אנזימים אלה הם AF482924 ו- AF482923. על מנת להוכיח מסקנה זו באופן מוחלט יהיה צורך בביצוע מבחני ביטוי לשני הגנים הנ"ל או השתקה מוצלחת של שני הגנים הנ"ל באמצעות טכניקת RNAi.

התוצאות של מחקר זה מוסיפות לידע הקיים לגבי מנגנוני הבקרה המולקולאריים וכן לגבי הבקרה של אנזימי המפתח במסלול הביויסינטיזה של פרומוני מין. ידע זה יתרום בעתיד לפיתוח שיטות הדברה ספציפיות המבוססות על שיבוש מסלול יצירת פרומוני המין ועל ידי כך להביא להפחתה של ההזדווגות ותהליך הריבוי של העשים המזיקים בחקלאות. אופיים המיוחד והספציפי של פעילותם של אנזימי ה- $\delta$ -desaturase, הופכים אותם למטרות מצוינות לפיתוח אמצעי הדברה ספציפיים שישבשו את פעילותם. שיטות הדברה ספציפיות שכאלו, יתרמו להפחתה בשימוש של חומרי ההדברה האוניברסאליים המצויים כיום בשימוש מסחרי. בכך יפחת פיתוח העמידות של חרקים לחומרי ריסוס בשדות חקלאיים וגם זיהום הקרקעות והיבולים יופחת.

- Arsequell G, G. Fabrias and F. Camps (1990) Sex pheromone biosynthesis in the processionary moth *Thaumetopoea pityocampa* by delta-13 desaturation. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 14: 47-56
- Bjostad L.B and W.L. Roelofs (1984) Biosynthesis of sex pheromone components and glycerolipid precursors from sodium [1-<sup>14</sup>C] acetate in redbanded leafroller moth. Journal of Chemical Ecology 10: 681-691
- Bjostad L.B, W.A. Wolf and W.L. Roelofs (1987) Pheromone biosynthesis in Lepidopterans: desaturation and chain shortening. In: Pheromone Biochemistry. Prestwich G.D., Blomquist G.J. (Eds.), Academic Press. Orlando: 77-120
- Broadwater J.A, E. Whittle and J. Shanklin (2002) Desaturation and hydroxylation. The Journal of Biological Chemistry 277: 15613-15620
- Choi M.Y, E.J. Fuerst, A. Rafaeli and R. Jurenka (2003) Identification of a G protein-coupled receptor for pheromone biosynthesis activating neuropeptide from pheromone glands of the moth *Helicoverpa zea*. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America 100: 9721-9726
- Choi M.Y, K.S Han, K.S Boo and R. Jurenka (2002) Pheromone biosynthesis pathway in *Helicoverpa assulta* and *Helicoverpa zea*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 32: 1353-1359
- Cussen M and J.N. McNeil (1989) Involvement of juvenile hormone in the regulation of pheromone release activities in a moth. Science 243: 210-212
- Cussen M, C.G. Yu, K. Carruthers, G.R. Wyatt, S.S. Tobe and J.N. McNeil (1994) Regulation of vitellogenin production in armyworm moths, *Pseudaletia unipuncta*. Journal of Insect Physiology 40: 129-136



- Davis N.T, U. Homberg, P.E.A. Teal, M. Altstein, H.J. Agricola and J.G. Hildebrand (1996) Neuroanatomy and immunocytochemistry of the median neuroendocrine cells of the subesophageal ganglion of the tobacco hawkmoth, *Manduca sexta*: immunoreactivities to PBAN and other neuropeptides. *Microscopy Research and Technique* 35: 201-229
- Eliyahu D, S.W. Applebaum and A. Rafaeli (2003) Moth sex-pheromone biosynthesis is inhibited by the herbicide diclofop. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 77: 75-81
- Eltahlawy H, J.S. Buckner and S.P. Foster (2007) Evidence for two-step regulation of pheromone biosynthesis by the pheromone biosynthesis-activating neuropeptide in the moth *Heliothis virescens*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 64: 120-130
- Endo A, M. Kuroda and K. Tanzawa (1976) Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-36A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Letters* 72: 323-326
- Fabrias G, M.P. Marco and F. Camps (1994) Effect of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide on sex pheromone biosynthesis in *Spodoptera littoralis* isolated glands. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 27: 77-87
- Fan Y, A. Rafaeli, C. Gileadi, E. Kubli and S.W. Applebaum (1999) *Drosophila melanogaster* sex peptide stimulates juvenile hormone synthesis and depresses sex pheromone production in *Helicoverpa armigera*. *Journal of Insect Physiology* 45: 127-133
- Fonagy A, N. Yokoyama, R. Ozawa, K. Okano, S. Tatsuki, S. Maeda and S. Matsumoto (1999) Involvement of calcineurin in the signal transduction of PBAN in the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera). *Comparative Biochemistry and Physiology* 124: 51-60

- Fonagy A, S. Matsumoto, K. Uchiumi and T. Mitsui (1992) Role of calcium ion and cyclic nucleotides in pheromone production *in Bombyx mori*. Journal of Pesticide Science 17: 115-121
- Foster S.P (1993) Neural inactivation of sex pheromone production in mated light brown apple moths, *Epiphyas postvittana* (Walker). Journal of Insect Physiology 39: 267-273
- Gadenne C, M. Renou and L. Sreng (1993) Hormonal control of pheromone responsiveness in the male black cutworm, *Agrotis ipsilon*. Experientia 49: 721-724
- Germain J.F (2003) Diagnostic protocols for regulated pests *Helicoverpa armigera*. European and Mediterranean Plant Protection Organization Bulletin 33: 289-295
- Golubeva E, T.G. Kingan, M.B. Blackburn, E.P. Masler and A.K. Raina (1997) The distribution of PBAN-like immunoreactivity in the nervous system of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 34: 391-408
- Gosalbo L, G. Fabrias and F. Camps (1994) Inhibitory effect of 10,11-methylenetetradec-10-enoic acid on a Z9-desaturase in the sex pheromone biosynthesis of *Spodoptera littoralis*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 26: 279-286
- Hansell M (1985) Ethology. In: Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology. Kerkut G.A., Gilbert L.I. (Eds.) Pergamon Press. New York 9: 1-93
- Hirashima A, T. Eiraku, Y. Watanabe, E. Kuwano, E. Taniguchi and M. Eto (2001) Identification of novel inhibitors of calling and *in vitro* [<sup>14</sup>C] acetate incorporation by pheromone glands of *Plodia interpunctella*. Pest Management Science 57: 713-720

- Jurenka R.A (1997) Biosynthetic pathway for producing the sex pheromone component (Z,E)-9, 12-tetradecadienyl acetate in moths involves a  $\Delta^{12}$  desaturase. *Cellular and Molecular Life Sciences* 53: 501-505
- Jurenka R.A (2003) Biochemistry of female moth sex pheromones. In: *Insect Pheromone Biochemistry and Molecular biology*. Blomquist G. and R. Vogt (Eds.) Elsevier Academic Press. London 3: 53-80
- Jurenka R.A (2004) Insect pheromone biosynthesis. *Topics in Current Chemistry* 239: 97-112
- Jurenka R.A and W.L. Roelofs (1993) Biosynthesis and endocrine regulation of fatty acid derived pheromones in moth. In: *Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry and Biology*. Stanley-Samuels, D.W. and D.R. Nelson (Eds.) University of Nebraska Press. Lincoln, Nebraska: 353-388
- Jurenka R.A, E. Jaquin and W.L. Roelofs (1991) Control of the pheromone biosynthetic pathway in *Helicoverpa zea* by the pheromone biosynthesis activating neuropeptide. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 17
- Kingan G.K, M.B. Blackburn and A.K. Raina (1992) The distribution of pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN) immunoreactivity in the central nervous system of the corn earworm moth, *Helicoverpa zea*. *Cell and Tissue Research* 270: 229-240
- Kingan G.K, W.M. Bodanar, A.K. Raina, J. Shabanowitz and D.F. Hunt (1995) The loss of female sex pheromone after mating in the corn earworm moth *Helicoverpa zea*: identification of a male pheromonostatic peptide. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 5082-5086
- Knipple D.C, C.L. Rosenfield, S.J. Miller, W. Liu and J. Tang (1998) Cloning and functional expression of a cDNA encoding a pheromone gland-specific acyl-CoA  $\Delta^{11}$ -desaturase of the cabbage looper moth,

*Trichoplusia ni*. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America 95: 15287-15292

Knipple D.C, C.L. Rosenfield, R. Nielsen, K.M. You and S.E. Jeong (2002) Evolution of the integral membrane desaturase gene family in moths and flies. Genetics 162: 1737-1752

Liu W, A.P. Rooney, B. Xue and W.L. Roelofs (2004) Desaturases from the spotted fireworm moth (*Choristoneura parallela*) shed light on the evolutionary origins of novel moth sex pheromone desaturases. Gene 342: 303-311

Liu W, H. Jiao, N.C. Murray, M. O'Connor, W.L. Roelofs (2002) Gene characterized for membrane desaturase that produces (E)-11 isomers of mono- and diunsaturated fatty acids. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America 99: 620-624

Liu W, P.W.K. Ma, P. Marsella-Herrick, C.L. Rosenfield, D.C. Knipple, W.L. Roelofs (1999) Cloning and functional expression of a cDNA encoding a metabolic acyl-CoA  $\Delta^9$ -desaturase of the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 29: 435-443

Ma P.W.K. and W.L. Roelofs (1995) Calcium involvement in the stimulation of sex pheromone production by PBAN in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera:Pyralidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology 25: 467-473

Martinez T, G. Fabrias and F. Camps (1990) Sex pheromone biosynthetic pathway in *Spodoptera littoralis* and its activation by a neurohormone. The Journal of Biological Chemistry 265: 1381-1387

Matsumoto S, R. Ozawa, T. Ngamine, G.H. Kim, K. Uchiumi, T. Shono and T. Mitsui (1995) Intracellular transduction in the regulation of pheromone biosynthesis of the silkworm, *Bombyx mori*: suggested involvement of calmodulin and phosphoprotein phosphatase. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 59: 560-562

- Monger D, W. A. Lim, F. J. Ke'zdy and J.H. Law (1982) Compactin inhibits insect HMG-CoA reductase and juvenile hormone biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 105: 1374-1380
- Nachman R.J, G.M. Holman and W.F. Haddon (1992) Leads for insect neuropeptide mimetic development. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 22: 181-197
- Nagalakshmi V.K, S.W. Applebaum, E. Kubli, Y. Choffat and A. Rafaeli (2004) The presence of *Drosophila melanogaster* sex peptide-like immunoreactivity in the accessory glands of male *Helicoverpa armigera*. *Journal of Insect Physiology* 50: 241-248
- Ozawa R.M.S., G.H. Kim, K. Uchiumi, M. Kurihara, T. Shono and T. Mitsui (1995) Intracellular signal transduction of PBAN in lepidopteran insects: inhibition of sex pheromone production by compactin, an HMG CoA reductase inhibitor. *Regulatory Peptides* 57: 19-327
- Perez R. and W.H. Long (1964) Sex attractant and mating behavior in sugarcane borer. *Journal of Economic Entomology* 57: 688
- Picimbon J.F, J.M. Becard, L. Sreng, J.L. Clement and C. Gadenne (1995) Juvenile hormone stimulates pheromonotropic brain factor release in the female black cutworm, *Agrotis ipsilon*. *Journal of Insect Physiology* 41: 377-382
- Rafaeli A (2002) Neuroendocrine control of pheromone biosynthesis in moth. *International Review of Cytology* 213: 49-91
- Rafaeli A and C. Gileadi (1995a) Modulation of the PBAN-stimulated pheromonotropic activity in *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25: 827-834

- Rafaeli A and C. Gileadi (1995b) Factors affecting pheromone production in the stored product moth, *Plodia interpunctella*: A Preliminary Study. *Journal of Stored Products Research* 31: 243-247
- Rafaeli A and C. Gileadi (1999) Inhibition of pheromone biosynthesis and mating in the stored product moth, *Plodia interpunctella*. *Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Working Conference on Stored Product Protection*. Beijing, China 2: 1269-1274
- Rafaeli A and R.A. Jurenka (2003) PBAN regulation of pheromone biosynthesis in female moths. In: *Insect Neurochemistry and Neurophysiology*. Borkovec A. and M.J. Loeb (Eds.) CRC Press, Boca Raton 5: 107-136
- Rafaeli A and V. Soroker (1989a) Cyclic AMP mediation of the hormonal stimulation of <sup>14</sup>C-acetate incorporation by *Heliothis armigera* pheromone glands *in vitro*. *Molecular and Cellular Endocrinology* 65: 43-48
- Rafaeli A and V. Soroker (1989b) Influence of the diel rhythm and brain hormone on pheromone production in two lepidopteran species. *Journal of Chemical Ecology* 15: 447-455
- Rafaeli A and V. Soroker (1994) Second messenger interactions in response to PBAN stimulation of pheromone gland cultures. In: *Insect Neurochemistry and Neurophysiology*. Borkovec A. and M.J. Loeb (Eds.) CRC Press. Boca Raton: 223-226
- Rafaeli A, C. Gileadi and A. Hirashima (1999) Identification of novel synthetic octopamine receptor agonists which inhibit moth sex pheromone production. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 65: 194-204
- Rafaeli A, C. Gileadi, Y. Fan and M. Cao (1997) Physiological mechanism of pheromonostatic responses: effects of adrenergic agonists and antagonists on moth (*Helicoverpa armigera*) pheromone biosynthesis. *Journal of Insect Physiology* 43: 261-269

- Rafaeli A, T. Zakharova, Z. Lapsker and R.A. Jurenka (2003) The identification of an age- and female-specific putative PBAN membrane-receptor protein in pheromone glands of *Helicoverpa armigera*: possible up-regulation by Juvenile hormone. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33: 371-380
- Rafaeli A (2005) Mechanisms involved in the control of pheromone production in moths: recent developments. *Entomologia experimentalis et applicata* 115: 7-15.
- Raina A.K (1989) Male-induced termination of sex pheromone production and receptivity in mated females of *Heliothis zea*. *Journal of Insect Physiology* 35: 821-826
- Raina A.K (1993) Neuroendocrine control of sex pheromone biosynthesis in Lepidoptera. *Annual Review of Entomology* 38: 329-349
- Raina A.K and J.J. Menn (1987) Endocrine regulation of pheromone production in Lepidoptera. In: *Pheromone Biochemistry*. Prestwich G.D., Blomquist G.J. (Eds.) Academic Press. Orlando: 159-174
- Raina A.K, H. Jaffe, T.G. Kempe, P. Keim, R.W. Blacher, H.M. Fales, C.T. Rilley, J.A. Klun, R.L. Ridgway and D.K. Hayes (1989) Identification of a neuropeptide hormone that regulates sex pheromone production in female moth. *Science* 244: 796-798
- Raina A.K and T.G. Kempe (1990) A pentapeptide of the C-terminal sequence of PBAN with pheromonotropic activity. *Insect Biochemistry* 20: 849-851
- Raina A.K. and T.G. Kempe (1992) Structure activity studies of PBAN of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: noctuidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 22: 221-225
- Raina A.K., T.G. Kingan and J.M. Giebultowicz (1994) Mating-induced loss of sex pheromone and sexual receptivity in insects with emphasis on

*Helicoverpa zea* and *Lymantria dispar*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 25: 317-327

Ramaswamy S.B, R.A. Jurenka, C.E. Linn and W.L. Roelofs (1995) Evidence for the presence of a pheromonotropic factor in hemolymph and regulation of sex pheromone production in *Helicoverpa zea*. Journal of Insect Physiology 41: 501-508

Ramaswamy S.B, Y. Qiu and Y.I. Park (1996) Neural control of post-coital pheromone production in the moth *Heliothis virescens*. Journal of Experimental Zoology 274: 255-263

Ramaswamy S.R, S. Shu, Y.I. Park, F. Zeng (1997) Dynamics of juvenile hormone-mediated gonadotropism in the Lepidoptera. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 35: 539-558

Roelofs W.L, W. Liu, G. Hao, H. Jiao, A.P. Rooney and C.E. Linn (2002) Evolution of moth sex pheromones via ancestral genes. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America 99: 13621–13626

Roelofs W.L and A.P. Rooney (2003) Molecular genetics and evolution of pheromone biosynthesis in Lepidoptera. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America 100: 9179-9184

Rosenfield C.L, K.M You, P. Marsella-Herrick, W.L. Roelofs, D.C. Knipple, R. Nielsen, K.M. You and S.E. Jeong (2001) Structural and functional conservation and divergence among acyl-CoA desaturases of two noctuid species, the corn earworm, *Helicoverpa zea*, and the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 31: 949-964

Smith S (1994) The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. The FASEB Journal 8: 1248-1259



- Shanklin J, J. Achim, , H. Schmidt, B.G. Fox and E. Munck (1997) Mossbauer studies of alkane  $\omega$ -hydroxylase: evidence for a diiron cluster in an integral-membrane enzyme. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 2981–2986
- Shanklin J, Whittle, E., (2003) Evidence linking the *Pseudomonas oleovorans* alkane  $\omega$ -hydroxylase, an integral membrane diiron enzyme and the fatty acid desaturase family. *FEBS Letters* 545: 188-192
- Soroker V. and Rafaeli, A. (1989) *In vitro* hormonal stimulation of [<sup>14</sup>C]-acetate incorporation by *Heliothis armigera* pheromone glands. *Insect Biochemistry* 19: 1-5.
- Tiku P.E, A.Y. Gracey, A.I. Macartney, R.J. Beyton, A.R. Crossins (1996) Cold-induced expression of  $\Delta 9$ -desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms. *Science* 271: 815-818
- Tillman J.A, S.J. Seybold, R.A. Jurenka and G.J. Blomquist (1999) Insect pheromones - an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29: 481-514
- Tumlinson J.H and P.E.A. Teal (1987) Relationship of structure and function to biochemistry in insect pheromone systems. In: *Pheromone Biochemistry*. Prestwich G.D., Blomquist G.J. (Eds.) Academic Press. Orlando: 3-26
- Wolf W.A and W.L. Roelofs (1986) Properties of the  $\Delta 11$ -desaturase enzyme used in cabbage looper moth sex pheromone biosynthesis. *Insect Biochemistry Physiology* 3: 45-52
- Wolfner M.F (1997) Tokens of love: functions and regulation of *Drosophila* male accessory gland product. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27: 179-192

Zhu J, J. Millar and C. Lofstedt (1995) Hormonal regulation of sex pheromone biosynthesis in the turnip moth, *Agrotis segetum*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 30: 41-59

The production of fatty acid analogs is followed with the double bond positioning as a result of the action of unique  $\delta$ -desaturases to make mono- and di-unsaturated fatty acids. Subsequent chain shortening through specific chain-shortening enzymes make the right chain length fatty acid and, depending on the functional group of the pheromone, a fatty-acyl reductase, an acetyltransferase or an alcohol oxidase will produce the final pheromone blend. The main sex-pheromone component of *P. interpunctella* is (Z, E)-9, 12-tetradecadienyl acetate. In this study labeled tetradecanoic acid was shown to be utilized by *P. interpunctella*. This demonstrates that the biosynthesis of the main sex pheromone component, occurring through chain shortening of hexadecanoic acid (palmitate) to produce tetradecenoic acid (14:CoA), followed by  $\Delta 9$  desaturation and  $\Delta 12$  desaturation to produce (Z, E)-9, 12-tetradecadienyl acetate.

The purpose of the next stage of this work was to examine the regulation of gene expression underlying desaturase function in the *P. interpunctella*. First, as done before (Knipple *et al.*, 2002), the central region (CR) from each of the nine candidate desaturases genes in *P. interpunctella* pheromone gland, were isolated and their exclusivity to females was shown. Then in order to determine the transcription levels for each of the nine *P. interpunctella* desaturase genes, experiments utilizing quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) were conducted. The results showed that genes AF482923 and AF482924 were by far most abundant. From these results it can be carefully inferred that genes AF482923 and AF482924, are the genes that encode for  $\Delta 9$  desaturase and  $\Delta 12$  desaturase enzymes that are utilized in the *P. interpunctella* sex-pheromone biosynthetic pathway. In order to prove this conclusion in future research, first, a full length of each gene needs to be isolated. The functional assays for each gene, in cells that naturally do not express these genes need to be done. Another way to show the responsibility of these genes to form the double bonds in the *P. interpunctella* main sex pheromone component is to knock down the expression of these genes using RNAi technique and monitor the effect on pheromone production in females. Such a preliminary experiment was performed in the present study.

## **Abstract**

Moths constitute one of the major groups of pest insects in agriculture. In recent years the number of pesticides has declined as health, safety and environmental concerns have led to research efforts for the development of safe alternatives that may be used for controlling pest insects. Reproductive behavior in moths is dependent on chemical communication. In many Lepidopteran species the females emit volatile sex-pheromones for attracting their mates. Elucidation of the molecular regulation of the key enzymes involved in the production of sex-pheromones, will provide innovative and specific methodologies in the search at disrupting sex-pheromone production for the purpose of specifically targeting the reproductive behavior of pest moths.

A major class of sex pheromones produced by female moths is the C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub> unsaturated, acyclic, aliphatic compounds that contain an oxygenated functional group such as aldehyde, alcohol or acetate ester. These pheromone components are synthesized *de novo* in the pheromone gland, from acetyl-CoA (involving acetyl-CoA carboxylase (ACCase) to fatty acid synthesis as a response to the neurohormonal signal transmitted by pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN) (Rafaeli, 2002, Rafaeli & Jurenka, 2003). The effect of PBAN on the different steps in the biosynthetic pathway has been investigated in several Lepidopteran species but a particular enzyme within the pheromone biosynthetic pathway that is regulated by PBAN has not yet been conclusively identified and there appears to be no particular pattern as to which enzyme within the pheromone biosynthetic pathway will be regulated by PBAN.

In order to decipher the biosynthetic pathway and the rate-limiting step that is regulated by PBAN in two representative species, producing di-unsaturated (*P. interpunctella*) and mono-unsaturated (*H. armigera*) components the present study combines the use of labeled precursors with specific enzyme inhibitors and the identification of labeled pheromone components by GC/MS. From the results of these experiments it appears that the rate-limiting step for PBAN, in both species is the step in which ACCase transfers acetyl CoA to malonyl CoA.

**The research was performed under supervision of**

**Prof. Ada Rafaeli**

Institute for Technology and Storage of Agricultural Products,  
The Volcani Center  
ARO, Bet Dagan

**Pheromone Biosynthesis and PBAN Regulation**  
**in two Lepidopteran species, *Plodia***  
***interpunctella* (Pyralidae) and *Helicoverpa***  
***armigera* (Noctuidae) :**

**Rate-limiting Steps in the Biosynthetic Pathway**

M.Sc. Thesis Submitted to the Faculty of Agriculture, Food and  
Environmental Quality Sciences of the Hebrew University of  
Jerusalem for the Degree of 'Master in Agricultural Sciences'

By  
**Oren Tzfadia**

Rehovot, Israel

May, 2007