

768

2003-2005

תקופת המחקר:

252-0220-05

קוד מחקר:

**Subject:** IMPROVEMENT OF TOMATO FRUIT SETTING UNDER HIGH TEMPERATURE CONDITIONS BY MANIPULATION OF CARBOHYDRATE METABOLISM IN ANther AND POLLEN

**Principal investigator:** DAVID GRANOT

**Cooperative investigator:** BENJAMIN ALONY, EITAN PRESSMAN, LEAH KARNI, DVORA SWARTZBERG

**Institute:** Agricultural Research Organization (A.R.O)

**שם המחקר:** שיפור חנטה בטמפרטורות גבוהות בעגבניה ופלפל

**חוקר ראשי:** דוד גרנות

**חוקרים שותפים:** בנימין אלוני, איתן פרסמן, לאה קרני, דבורה שורצברג

**מוסד:** מנהל המחקר החקלאי, ת.ד. 6 בית דגן 50250

## תקציר

חשיפה של צמחי עגבנייה לטמפרטורות גבוהות גורמת לפגיעה משמעותית ביבול. הסיבה העיקרית לפגיעה ביבול הינה רגישות גרגרי האבקה לתנאי טמפרטורה קיצוניים. הראנו שקיים קשר חיובי בין זירחון מוגבר של סוכרים באבקנים ובגרגרי האבקה ובין התפתחות ונביטת גרגרי האבקה בחום. כדי לבטא גנים באופן בלעדי במאבקים בודדנו את הפרומוטור באורך 1.5 kb של הגן פרוקטוקינאז מעגבנייה (*LeFRK4*) שמתבטא אך ורק במאבקים ובאבקה. הפרומוטור של *LeFRK4* שימש לביטוי מוגבר של הקסוקינאז *AtHXX1*. התקבלו 25 צמחים בלתי תלויים המבטאים את *Promoter<sub>LeFRK4</sub>::AtHXX1*. רוב הצמחים המותמרים הראו יכולת נביטה טובה יותר של גרגרי אבקה בחום. אותרו צמחים הומוזיגוטים מכל הטרנסגנים הבלתי תלויים. צמחים אלה יבחנו ליכולתם לחנוט בתנאי חום. בנוסף יצרנו צמחים שמבטאים פרוקטוקינאז (*LeFRK1*) תחת הפרומוטור הספציפי וגם צמחים אלה יבחנו ליכולתם לחנוט בחום. חשיפה של צמחי עגבנייה לטמפרטורות גבוהות גורמת לפגיעה משמעותית ביבול. הסיבה העיקרית לפגיעה ביבול הינה רגישות גרגרי האבקה לתנאי טמפרטורה קיצוניים. קיים קשר בין מטבוליזם מוגבר של סוכרים באבקנים ובין התפתחות ונביטת גרגרי האבקה בחום. גידול צמחי עגבנייה בחום גרם להפחתה בכמות העמילן באבקה המתפתחת, לירידה ברמת הסוכרים המסיסים באבקה הבשלה ולפגיעה בכושר הנביטה של גרגרי האבקה. בהתבסס על ממצאים אלה, הצענו להאיץ את פירוק הסוכרוז וזירחון החד-סוכרים באופן בלעדי באבקנים, ולהעלות את כמות העמילן באבקן ובאבקה. כדי לבטא גנים באופן בלעדי במאבקים התמרנו צמחי עגבנייה עם הפרומוטור של האנזים אינברטאז מטבק (*Nin88*) המחובר לגן מדווח והראנו שהגן מתבטא באופן ספציפי באבקן ובגרגרי אבקה מתפתחים ובשלים. בנוסף, בודדנו את הפרומוטור באורך 1.5 kb של הגן פרוקטוקינאז מעגבנייה (*LeFRK4*) שמתבטא אך ורק במאבקים ובאבקה. הפרומוטור של *Nin88* משמש לביטוי של סוכרוז סינטז ו-ADP glucose pyrophosphorylase (AGPase) בעוד שהפרומוטור של *LeFRK4* שימש לביטוי מוגבר של הקסוקינאז *AtHXX1*. התקבלו 25 צמחים בלתי תלויים המבטאים את *Promoter<sub>LeFRK4</sub>::AtHXX1*. רוב הצמחים המותמרים הראו יכולת נביטה טובה יותר של גרגרי אבקה בחום. אותרו צמחים הומוזיגוטים מכל הטרנסגנים הבלתי תלויים. צמחים אלה יבחנו

ליכלתם לחנוט בתנאי חום. בנוסף יצרנו צמחים שמבטאים פרוקטוקינאז (*LeFRK1*) תחת הפרומוטור הספציפי וגם צמחים אלה יבחנו ליכולתם לחנוט בחום.

**רשימת פרסומים:**

Pressman, E., Harel, D., Zamski E., Shaked R., Althan L., Rosenfeld K, Firon N.  
The effect of high temperatures on the expression and activity of sucrose cleaving  
enzymes during tomato (*Lycopersicon esculentum*) anther development (2006).

J. Hort. Sci. Biotechnol. Accepted for publication.

שיפור תצטת פירות עגבניה בתנאי זרם על ידי שינוי מטבוליזם של סוכר במאבק ובגרגרי האבקה

Improvement of tomato fruit setting under high temperature conditions by manipulation of carbohydrate metabolism in anther and pollen

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות - ביוטכנולוגיה

ע"י

המחלקה לגנטיקה של צמחים, גז"ש, מינהל המחקר החקלאי	דוד גרנות
המחלקה לגנטיקה של צמחים, גז"ש, מינהל המחקר החקלאי	נורית פירון
המחלקה לירקות, גז"ש, מינהל המחקר החקלאי	איתן פרסמן
המחלקה לירקות, גז"ש, מינהל המחקר החקלאי	בנימין אלוני
המחלקה לגנטיקה של צמחים, גז"ש, מינהל המחקר החקלאי	לביאה אלטמן
המחלקה לגנטיקה של צמחים, גז"ש, מינהל המחקר החקלאי	דבורה שורצברג
המחלקה לירקות, גז"ש, מינהל המחקר החקלאי	רחל שקד

David Granot Dept. Plant Genetics and Vegetable Crops, Inst. Field & Garden Crops, The Volcani Center, ARO, P. O Box 6 Bet Dagan, 50250.  
E-Mail: [granot@agri.gov.il](mailto:granot@agri.gov.il)

Nurit Firon Dept. Plant Genetics and Vegetable Crops, Inst. Field & Garden Crops, The Volcani Center, ARO, P. O Box 6 Bet Dagan, 50250.  
E-Mail: [vcfiron@int.gov.il](mailto:vcfiron@int.gov.il)

Etan Pressman Dept. Plant Genetics and Vegetable Crops, Inst. Field & Garden Crops, The Volcani Center, ARO, P. O Box 6 Bet Dagan, 50250.  
E-Mail: [pressman@agri.gov.il](mailto:pressman@agri.gov.il)

Beny Aloni Dept. Plant Genetics and Vegetable Crops, Inst. Field & Garden Crops, The Volcani Center, ARO, P. O Box 6 Bet Dagan, 50250.  
E-Mail: [vcaloni@agri.gov.il](mailto:vcaloni@agri.gov.il)

אפריל 2006

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ביניים.  
הביטויים מהורים המלצות לחקלאים: לא

חתימת החוקר 313 ג'י נ

רשימת פרסומים:

Pressman, E., Harel, D., Zamski E., Shaked R., Althan L., Rosenfeld K., Firon N.

The effect of high temperatures on the expression and activity of sucrose cleaving enzymes during tomato (*Lycopersicon esculentum*) anther development (2006).

J. Hort. Sci. Biotechnol. Accepted for publication.

## 1. תקציר

חשיפה של צמחי עגבנייה לטמפרטורות גבוהות גורמת לפגיעה משמעותית ביבול. הסיבה העיקרית לפגיעה ביבול הינה רגישות גרגרי האבקה לתנאי טמפרטורה קיצוניים. הראנו שקיים קשר חיובי בין זירחון מוגבר של סוכרים באבקנים ובגרגרי האבקה ובין התפתחות ונביטת גרגרי האבקה בחום. כדי לבטא גנים באופן בלעדי במאבקים סודדנו את הפרומוטור באורך 1.5 kb של הגן פרוקטוקינאז מעגבנייה (*LeFRK4*) שמתבטא אך ורק במאבקים ובאבקה. הפרומוטור של *LeFRK4* שימש לביטוי מוגבר של הקסוקינאז *AtHXXI*. התקבלו 25 צמחים בלתי תלויים המבטאים את *Promoter<sub>LeFRK4</sub>::AtHXXI*. רוב הצמחים המותמרים הראו יכולת נביטה טובה יותר של גרגרי אבקה בחום. אותרו צמחים הומוזיגוטים מכל הטרנסגנים הבלתי תלויים. צמחים אלה יבחנו ליכולתם לחנוט בתנאי חום. בנוסף יצרנו צמחים שמבטאים פרוקטוקינאז (*LeFRK1*) תחת הפרומוטור הספציפי וגם צמחים אלה יבחנו ליכולתם לחנוט בחום.

חשיפה של צמחי עגבנייה לטמפרטורות גבוהות גורמת לפגיעה משמעותית ביבול. הסיבה העיקרית לפגיעה ביבול הינה רגישות גרגרי האבקה לתנאי טמפרטורה קיצוניים. קיים קשר בין מטבוליזם מוגבר של סוכרים באבקנים ובין התפתחות ונביטת גרגרי האבקה בחום. גידול צמחי עגבנייה בחום גרם להפחתה בכמות העמילן באבקה המתפתחת, לירידה ברמת הסוכרים המסיסים באבקה הבשלה ולפגיעה בכישר הנביטה של גרגרי האבקה. בהתבסס על ממצאים אלה, הצענו להאיץ את פירוק הסוכרוז וזירחון החז-סוכרים באופן בלעדי באבקנים, ולהעלות את כמות העמילן באבקן ובאבקה. כדי לבטא גנים באופן בלעדי במאבקים התמרגנו צמחי עגבנייה עם הפרומוטור של האנזים אינברטאז מסבק (*Nin88*) המחובר לגן מדווח והראנו שהגן מתבטא באופן ספציפי באבקן ובגרגרי אבקה מתפתחים ובשלים. בנוסף, בודדנו את הפרומוטור באורך 1.5 kb של הגן פרוקטוקינאז מעגבנייה (*LeFRK4*) שמתבטא אך ורק במאבקים ובאבקה. הפרומוטור של *Nin88* משמש לביטוי של סוכרוז סינטז ו-ADP glucose pyrophosphorylase (AGPase) בעוד שהפרומוטור של *LeFRK4* שימש לביטוי מוגבר של הקסוקינאז *AtHXXI*. התקבלו 25 צמחים בלתי תלויים המבטאים את *Promoter<sub>LeFRK4</sub>::AtHXXI*. רוב הצמחים המותמרים הראו יכולת נביטה טובה יותר של גרגרי אבקה בחום. אותרו צמחים הומוזיגוטים מכל הטרנסגנים הבלתי תלויים. צמחים אלה יבחנו ליכולתם לחנוט בתנאי חום. בנוסף יצרנו צמחים שמבטאים פרוקטוקינאז (*LeFRK1*) תחת הפרומוטור הספציפי וגם צמחים אלה יבחנו ליכולתם לחנוט בחום.

## 2. מברא

### 2.1 רקע מדעי

חשיפה של צמחי עגבנייה לטמפרטורות גבוהות גורמת לפגיעה משמעותית ביבול. בעיה זו חריפה במיוחד עם ההעברה של אחוז גבוה יותר של ייצור העגבניות לבתי צמיחה (בשל החשש מהדבקות בווירוס צהבון האמיר), שם עלולה הטמפרטורה לעלות הרבה מעבר ל-29°C גם בעונות הגידול הנוחות יותר, כמו האביב והסתיו. הסיבה העיקרית לפגיעה ביבול היא רגישות גרגרי האבקה לתנאי טמפרטורה קיצוניים. תוצאות דומות, המעידות על כך שהאבר הרפרודוקטיבי הזכרי הוא הרגיש ביותר לתנאי טמפרטורה גבוהה, התקבלו גם

בגידולים אחרים, כמו פלפל ותירס. הפגיעה באבקה מתבטאת בירידה במספר גרגרי האבקה לפרח ובפגיעה בחיוניות האבקה.

ההתפתחות התקינה של גרגרי האבקה תלויה במטבוליזם הסוכרים באבקן ובגרגרי האבקה המתפתחים. מטבוליזם הסוכרים מתחיל בפירוק הסוכרוז לחד-סוכרים על ידי האנזימים סוכרוז סינטאז (SuSy) ואינברטאז, ובזרחון החד-סוכרים על ידי האנזימים הקסוקינאז (HXK) ופרוקטוקינאז (FRK). במגוון מערכות צמחיות הראו שחשיפה של הצמחים לחום גורמת לפגיעה במטבוליזם הסוכרים באבקנים ובאבקה. לאחרונה הראנו שגידול צמחי עגבנייה בחום גרם לירידה בכמות העמילן הנאגרת בגרגרי האבקה המתפתחים 3 ימים לפני פתיחת הפרח ולירידה מקבילה ברמת הסוכרים המסיסים באבקה הבשלה. זני עגבנייה שהראו סבילות לתנאי חום מבחינת התנסה והיבול (זנים 3042 ו-3018 לדוגמא) הראו גם סבילות לחום מבחינת כמות גרגרי האבקה החיים וטישר הנביטה שלהם, במקביל לרמות עמילן גבוהות בגרגרים המתפתחים ורמת סוכרים מסיסים גבוהה יחסית בגרגרים הבשלים (התוצאות מוצגות בדו"ח סיכום השנה הראשונה). בנוסף מצאנו שביטוי מוגבר של האנזים הקסוקינאז, המזרחן חד-סוכרים, תחת בקרה של הפרומוטור 35S גרמה לעלייה משמעותית בטישר הנביטה של גרגרי אבקה שהונבטו ב-32°C. על רקע ממצאים אלה הנחנו שהאצת המטבוליזם של הסוכר במאבקים ובגרגרי האבקה עשויים לפתור את בעיית התנסה בחום. האצת המטבוליזם של הסוכר עשויה להתרחש בעקבות הגברת מאגר העמילן במאבקים על ידי האנזים ADP glucose pyrophosphorylase (AGPase: אנזים מפתח בביוסינתזה של עמילן), על ידי פרוק מוגבר של סוכרוז על ידי סוכרוז סינטאז לסוכרים זמינים, או בהאצת המטבוליזם של הסוכרים הזמינים, גלוקוז ופרוקטוז בעקבות זרחונם על ידי אנזימים מזרחני סוכרים כמו הקסוקינאז או פרוקטוקינאז.

## 2.2 מטרות המחקר

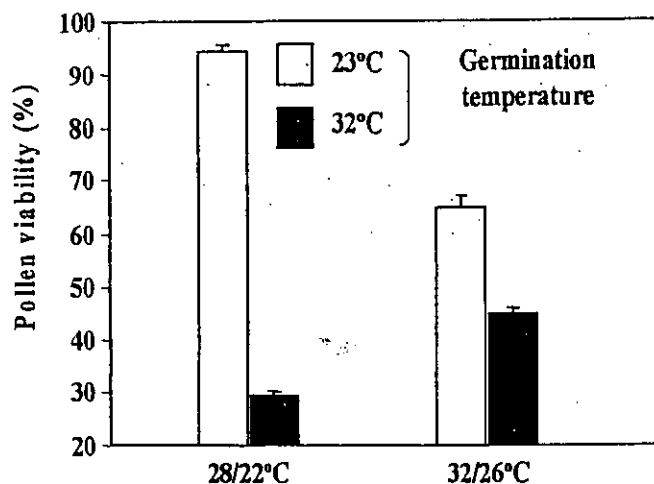
1. אנליזה השלב בו עקת חום פוגעת בגרגרי אבקה (דוד גרנות)
2. בדיקת השפעת הקסוקינאז על חיוניות גרגרי אבקה וחנשה בחום (דוד גרנות)
3. יצירת צמחים המבטאים הקסוקינאז באופן בלעדי במאבקים ובגרגרי האבקה (דוד גרנות)
4. יצירת צמחים טרנסגנים המבטאים AGPase ו-סוכרוז סינטאז תחת *Nin88* (נורית פירון)
5. בחינת הקשר בין אנזימים המעורבים בביוסינתזה של עמילן ובין חיוניות גרגרי אבקה בחום (נורית פירון)

6.

## 3. תוצאות

### 3.1 אנליזה השלב בו עקת חום פוגעת בגרגרי אבקה (דוד גרנות).

השפעת טמפרטורות גבוהות על הפגיעה בחנשת פירות בצמחי עגבנייה נחקרה כבר בשנות ה-50 של המאה הקודמת. מאז ועד היום פורסמו מחקרים רבים, אשר בחנו את השפעת עקת החום על חנשת פירות, אולם השאלה האם החום מפריע לחנשה בגלל פגיעה במהלך ההתפתחות של גרגרי האבקה או במהלך הנביטה שלהם נשארה פתוחה. כדי לענות על שאלה זו נאספו גרגרי אבקה מצמחי עגבנייה אשר גודלו בתנאים סטנדרטיים ומצמחים שגודלו בתנאי עקת חום. גרגרי האבקה הונבטו בטמפרטורות שונות וחיוניותם נקבעה

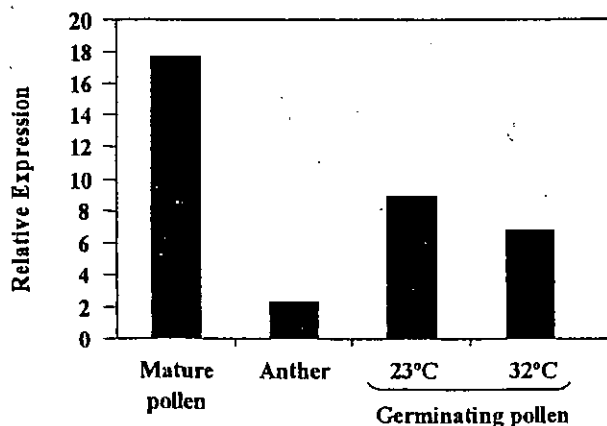


תמונה 1: השפעת תנאי עקת חום על התפתחות ובריית גרגרי אבקה. אבקה של צמחי עגבנייה אשר גודלו במשך מספר שבועות בתנאים נורמאליים (יום/ לילה 28/22°C) או בתנאים של עקת חום (יום/ לילה 32/26°C) נאספה והונבטה בטמפרטורה נמוכה (23°C) או בטמפרטורה גבוהה (32°C). חיוניות גרגרי האבקה נבדקה תחת מיקרוסקופ לאחר צביעת האבקה בריאגנט אלכסנדר.

זה עולה שהטמפרטורות הגבוהות פוגעות גם בשלב התפתחות גרגרי האבקה וגם בשלב הנביטה.

### 3.2 בדיקת השפעת הקסוקינאז על חיוניות גרגרי אבקה ונבטה בחום (דד גרעית).

עדויות לקשר בין מטבוליזם של סוכרים לחיוניות גרגרי אבקה העלו את הרצון לבחון את חיוניות האבקה בצמחי עגבנייה טרנסגנים, אשר מבטאים את הגן *AtHXK1* תחת הפרומוטור הקונסטיטוטיבי CaMV 35S. אולם, תחילה היה צורך לבדוק האם הפרומוטור CaMV 35S מתבטא במאבקים ובגרגרי האבקה של צמחים



תמונה 2: ביטוי של *AtHXK1*: 35S במאבק ובגרגרי אבקה. רמת הביטוי של הקסוקינאז מארבידופסיס (*AtHXK1*) בצמחי עגבנייה נבדקו בגרגרי אבקה בשלים, ברקמת מאבק (ללא גרגרי אבקה) ובגרגרי אבקה מונבטים. רמת הביטוי נקבעה באמצעות real time PCR עם תחלים ספציפיים לגן *AtHXK1* ועברה נרמול לפי רמת הביטוי של *Cyclophilin* (house keeping gene).

באמצעות צביעה על ידי ריאגנט אלכסנדר.

גידול הצמחים בתנאי גידול סטנדרטיים והנבטה

גרגרי האבקה בטמפרטורה גבוהה (32°C)

גרמה לירידה של מעל 60% בחיוניות גרגרי

האבקה ביחס לאבקה שהונבטה בטמפרטורה

אופטימאלית (23°C). לעומת זאת, כאשר גודלו

הצמחים בתנאים של עקת חום נצפתה ירידה

בחיוניות גרגרי האבקה שהונבטו בטמפרטורה

גבוהה לעומת זו של גרגרי האבקה שהונבטו

בטמפרטורה אופטימאלית (תמונה 1). בנוסף,

גרגרי אבקה שהתפתחו בתנאים של עקת חום

והונבטו בטמפרטורה אופטימאלית הציגו ירידה

בחיוניות לעומת גרגרי אבקה אשר התפתחו

והונבטו בתנאים סטנדרטיים. (איור 1). מניסוי

אלו. לשם כך נבדק הביטוי של *AtHXK1*

בגרגרי אבקה בשלים וברקמת המאבק, כמו גם

באבקה נובטת של צמחים המבטאים *AtHXK1*

(צמחי HK4, תמונה 2). נמצא שבצמחי HK4

הגן *AtHXK1* מתבטא גם בגרגרי אבקה בשלים

וגם במאבקים. יחד עם זאת, ביטוי הגן באבקה

גבוה יותר מאשר במאבקים (איור 2). בנוסף,

ניתן להבחין שגם באבקה נובטת של צמחי HK4

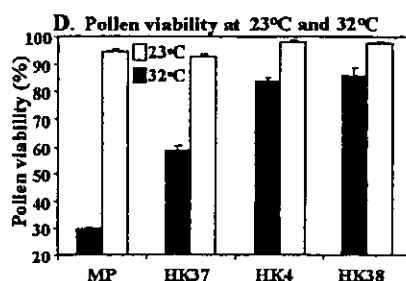
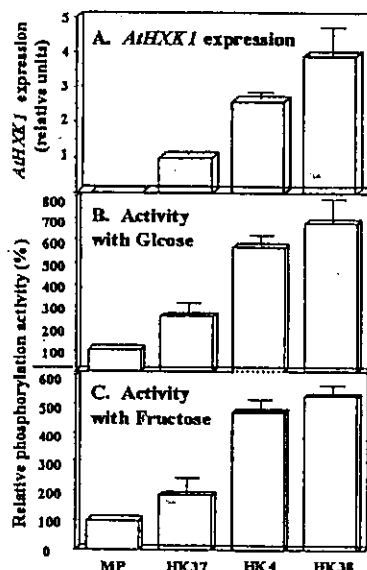
קיים ביטוי של *AtHXK1* (איור 2). תוצאות אלו

מעידות על כך שהפרומוטור CaMV 35S בוגד

למקובל, כן מתבטא בגרגרי אבקה בשלים

וברקמת המאבק של צמחי עגבנייה.

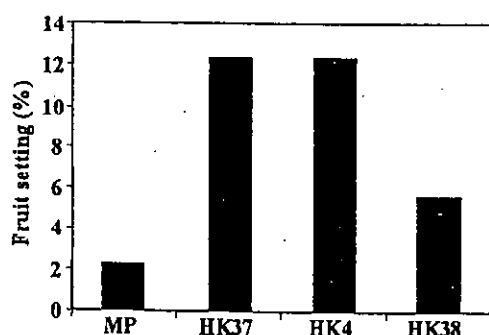
כדי לבדוק האם הקסוקינאז אכן משפיע בשלב ההתפתחות של גרגרי האבקה גידלנו צמחים בעלי רמות ביטוי שונות הקסוקינאז מארבידופסיס תחת הפרומוטור ובדקנו את השפעת הקסוקינאז על נביטת גרגרי האבקה במפרטורה רגילה ובחום. מצאנו שהקסוקינאז משפר משמעותית את הנביטה והחיוניות של גרגרי האבקה (תמונה 3). ביטוי מוגבר של הקסוקינאז תחת הפרומוטור 35S העלה את כושר הנביטה של גרגרי אבקה



תמונה 3: ביטוי ופעילות של *AtHXK1* בקנים טרנסגניים בלתי תלויים, HK37, HK4, HK38. (A, B, C) חיותיות גרגרי אבקה של הקנים השונים בהנבטה במפרטורות שונות. D.

בחום. שיפור הנביטה בחום היה בהתאמה מלאה לרמת הביטוי של הקסוקינאז באברים שונים בצמח (תמונה 3). מאחר והפרומוטור 35S מתבטא בגרגרי אבקה הבשלים והגובשים, ההשפעה החיובית של הקסוקינאז עשויה לבוע גם מביטוי במאבק וגם מביטוי בגרגר האבקה.

לאחר שראינו שעליה בביטוי של הקסוקינאז משפרת את החיוניות של גרגרי האבקה גם בצמחים שגדלו בחום קיצוני, בדקנו האם יש שיפור בכושר הנבטה של פירות בתנאים אלה. ואכן, כפי שאפשר לראות בתמונה 4,

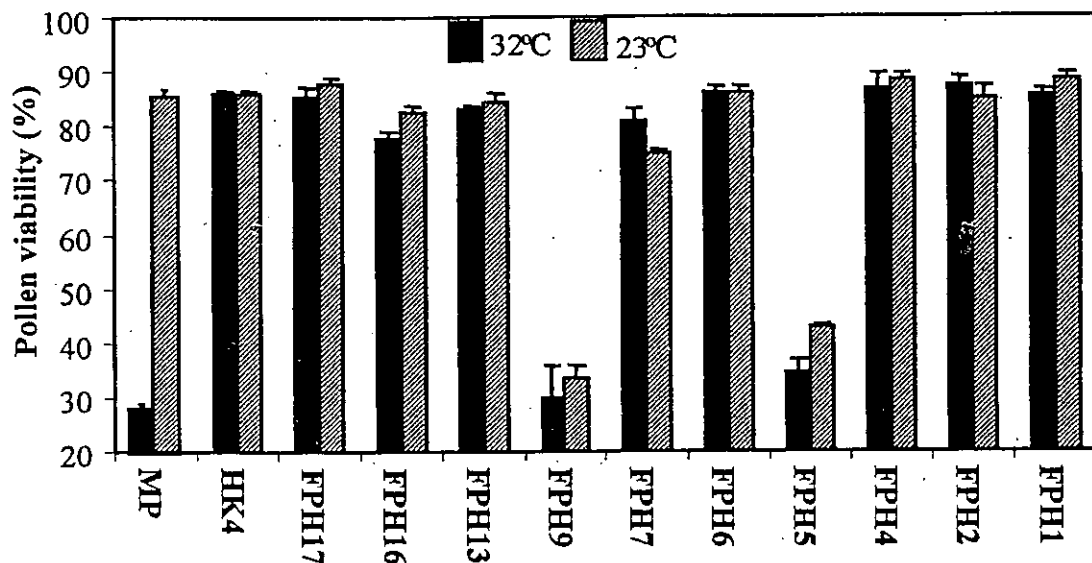


תמונה 4: השפעת ביטוי *AtHXK1* על חבטת פירות בצמחי ענביה בתנאי חום (32/26°C)

צמחים שמבטאים *AtHXK1* חננו טוב יותר מצמחי הבקורת. תוצאה זו מעודדת במיוחד מפני צמחים המבטאים *AtHXK1* סובלים מרמה נמוכה של פוטוסינטזה וסוכרים ומהאצת הזדקנות כפונקציה ישירה של מידת הביטוי של *AtHXK1*. הקו HK38 בולט במיוחד ברמה נמוכה מאוד של פוטוסינטזה וזו להערכתנו הסיבה מדוע קו זה חנט פחות טוב משני הקנים הטרנסגניים האחרים. תוצאות אלה מצביעות על ההשפעה החיובית שיש לעליה בזרחון סוכרים במאבקים ובגרגרי האבקה על חבטת פירות בחום.

**3.3 יצירת צמחים המבטאים הקסוקינאז באופן בלעדי במאבקים ובגררי האבקה (חד גרנית)**  
 אחת ממטרות המחקר העיקריות היתה ליצור צמחים המבטאים *AtHXKI* במאבקים ובגררי האבקה בלבד, כדי למנוע את ההשפעה השלילית על הפוטוסינטזה שיש לביטוי של *AtHXKI* בעלים. לשם כך בודדנו את הפרומוטור של הגן *LeFRK4* שמתבטא אך ורק במאבקים ובגררי אבקה וחיברנו לו את הגן *AtHXKI* עד כה יצרנו 25 צמחים טרנסגניים עם הקונסטרקט הזה (*Promoter<sub>LeFRK4</sub>::AtHXKI*). על אף שהצמחים שבידינו הם צמחי דור ראשון, כלומר הטרוזיגוטים לטרנסגן, בדקנו חיוניות גררי אבקה בהנבטה בחום. רוב הקנים הראו חיוניות טובה יותר של נביטת גררים בחום (בתמונה 5 מדגיגים חלק מהקנים). בנוסף לכך, כל הקנים נראים בעלי פריטים נורמלי לחלוטין ואף קו לא הראה פריטים שליליים מסוג אלה שנצפו

#### בקנים המבטאים *AtHXKI* תחת 35S



תמונה 5: חיוניות גררי אבקה מצמחים טרנסגניים בלתי חלויים (FPH1-17) המבטאים הקסוקינאז תחת הפרומוטור של *LeFRK4*. *LeFRK4::AtHXKI* (Promoter<sub>LeFRK4</sub>) - צמח הבקורת.

#### **3.4 יצירת צמחים טרנסגניים המבטאים AGPase ו-סוכרוז סינטאז תחת *Nin88* (נרית פירון)**

##### AGPase

בשנת המחקר הראשונה התמרצו צמחי ענבייה MP-1 בעזרת הפרומוטור *Nin88* (בודד מהגן לאינברטאז אפופלאסטי בטבק) המחובר לגן המדווח GUS, והראו שהצמחים המותמרים מבטאים GUS באופן ספציפי בתאי דופן האבקן כמו גם בגררי האבקה המתפתחים, החל מכ- 6 ימים לפני מעד פתיחת הפרח. הראנו גם פעילות של הפרומוטור באבקנים ובאבקה של פרחי ענבייה שנחשפו לטמפרטורה גבוהה. על מנת לבטא ביתר את הגן AGPase נעשה שימוש בגן החיידקי, המראה פעילות מוגברת יחסית לאנזים הצמחי. בשל אי-התאמות באתרי החיתוך הצפויים, רוצפו הגן החיידקי AGPase והרצף המכונן לעמילופלסט (FNR) והוגברו ב-PCR ליצור בניית הקונסטרקט: Promoter<sub>Nin88</sub>::FNR::AGPase בוקטור pBI101.

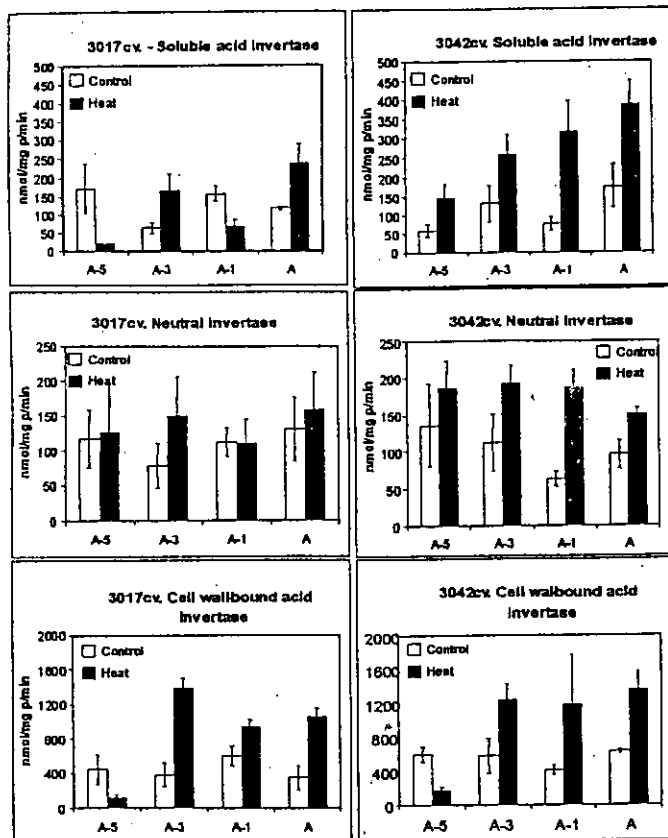
בעקבות בעיות חזרות בליגציה, מועבר הפרומוטור לוקטור pBINPLUS. במהלך ריצוף הפרומוטור הסתבר גם שבקצה ה-3' שלו יש שני רצפי ATG, דבר העלול לפגוע ביעילות הביטוי. ממצא זה חיזק את הצורך בבנייה הקונסטרוקט החדש.

### Sucrose Synthase

על מנת לבטא ביתר את האנזים סוכרוז סינתאז באבקנים ובאבקה מתפתחת של עגבנייה השתמשנו בגן סוכרוז סינתאז (SuSy) שבודד מ-*Chenopodium rubrum* והתקבל ממעבדתו של תומס רויטש בגרמניה (ראה דו"ח שנה ראשונה). לאור קיום ATG נוסף בקצה הפרומוטור Nin88, נבנה קונסטרוקט חדש כמתואר למעלה לגבי FNR-AGPase.

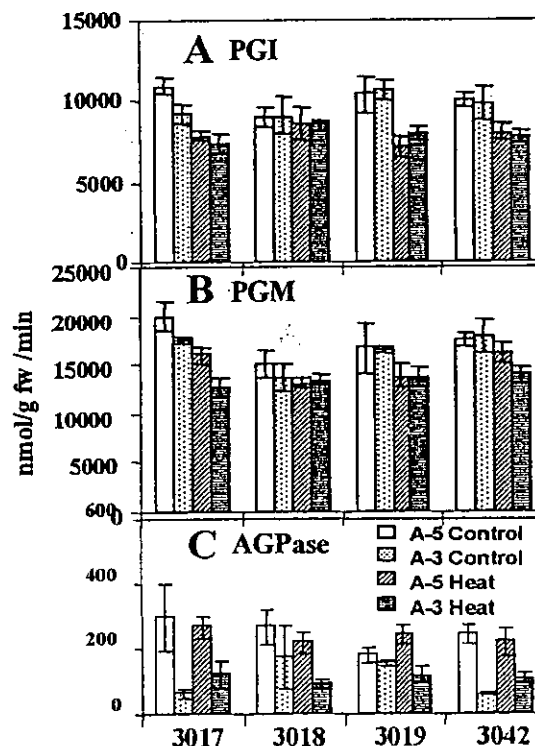
### 3.5 בחינת הקשר בין אנזימים המשרבים בביוסינתזה של עמילן ובין חיוניות גרגרי אבקה בחום (טריית פירוז)

הסוכרוז המגיע לתוך רקמות האבקן דרך מערכת ההובלה ומשם לגרגרי האבקה המתפתחים דרך הנזול הלוקולרי עובר הידרוליזה על ידי שני סוגי אנזימים: אינברטאז וסוכרוז סינתאז. בחינת ההשפעה של עקת-חום על פעילות האנזימים המפרקים סוכרוז בגרגרי אבקה מבודדים של זוג עגבנייה נוספים, רגשים ועמידים לחום, מראה הבדלים בהשפעת עקת-חום על פעילות אינברטאז חומצי מסיס בגרגרי אבקה שבודדו מפרחים בדרגת התפתחות של 5 ימים לפני פתיחת הפרח (A-5) – זהו השלב בו מתרחשת ביוסינתזה מוגברת של עמילן באבקה. חשיפה של הצמחים לחום גרמה לירידה בפעילות האינברטאז החומצי הוקואולרי באבקה של הזן 3017 הרגיש לחום בעוד שבזן העמיד יותר לחום, זן 3042 (שטופח לחנטה וייצור פרי בחום ע"י רוני אקר מחברת הזרע-גנטיקס), נצפתה עלייה בפעילות אנזים זה (ראה תמונה 6). תוצאה זו מעניינת לאור הממצאים של Dorion et al. (1966) המראים שעקת-יובש הגורמת לעקרות זכרית פוגעת בפעילות אינברטאז חומצי מסיס באבקה המתפתחת ובמקביל גם בהצטברות עמילן. תוצאה זו תומכת באפשרות שהידרוליזה של סוכרוז להקסוזות מהווה גורם מגביל וחשוב בקביעת איכות האבקה. מעניין לציין שבשני הזנים רואים גם ירידה בפעילות אינברטאז אפופלסטי באבקה 5 ימים לפני פתיחת הפרח בעקבות עקת-חום, בעוד שפעילות אנזים זה עוברת אידוקציה בחום בשלבי ההתפתחות המאוחרים יותר.



תמונה 6. השפעה של גידול צמחי עגבנייה מזנים 3017 ו-3042 בתנאי טמפרטורה גבוהה (32°C day/ 26°C night) על פעילות האנזימית של אינברטאזות במהלך התפתחות גרגרי אבקה. תוצאות הפעילות האנזימית מבוטאות ב- nmol reducing sugar/mg protein/min. התוצאות הן ממוצע של לפחות 3 חזרות  $\pm$  SE.

תמונה 7: השפעה של גידול צמחי עגבנייה מזנים 3017 (זן רגיש לחום) ו-3019 3042 (זנים עמידים יחסית) בתנאי טמפרטורה גבוהה (32°C day/ 26°C night) על פעילות האנזימים (Phosphoglucose isomerase (PGI), Phosphoglucose mutase (PGM), ADP Glucose pyrophosphorylase (AGPase) במהלך התפתחות אבקנים. תוצאות הפעילות האנזימית מבוטאות ב- nmol reducing sugar/mg protein/min. התוצאות הן ממוצע של לפחות 3 חזרות  $\pm$  SE.



#### 4. דיון

מתוצאות המחקר עד כה עולה בברור שהגברת הזרחון של סוכרים במאבקים ובגרגרי האבקה משפרים את חיוניות האבקה ומאפשרים חגטה בחום קיצוני. תוצאות אלה הן בעלות פוטנציאל ישומי בסווח קצר יחסית ועל כן המשך המחקר יתמקד בצמצום המבטאים הקסוקינאז במאבקים ובגרגרי האבקה בלבד. הפרומוטור שבו נעשה שימוש מבטא במקור פרוקטוקינאז, אנזים המזרחן פרוקטוז, שמתבטא באופן בלעדי במאבקים ובגרגרי האבקה. אולם לאנזים הספציפי, *LeFrk4*, יש תכונה המכונה 'עיכוב על ידי הסובסטרט' (substrate inhibition), כלומר האנזים מעוכב על ידי רמות עולות של פרוקטוז. מאחר שאנו מעוניינים להגביר את זירחון הסוכרים נחליף אנזים זה בפרוקטוקינאז אחר. אותו בודדנו שאינו מעוכב על ידי פרוקטוז. לאנזים פרוקטוקינאז יש אפיגניות לפרוקטוז הגבוהה פי 300 מזו של הקסוקינאז ועל כן הוא עשוי להגביר אף יותר את זירחון הסוכרים במאבקים ובגרגרי האבקה. צמצום המבטאים פרוקטוקינאז תחת הפרומוטור של *LeFRK4* כבר פותחו ונמצאים בשלבים מתקדמים של בדיקה.

#### ביבליוגרפיה.

1. Dorion S, S Lalonde, HS Saini (1996) Induction of male sterility in wheat by meiotic stage water deficit is preceded by a decline in invertase activity and changes in carbohydrate metabolism in anthers. *Plant Physiol* 111: 137-145.

# סיכום עם שאלות מצודת

מס' מחקר: 252-0220-05

מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתיכנית העבודה.
1. אנליזה השלב בו עקת חום פוגעת בגרגרי אבקה (דוד גרנות)
2. בדיקת השפעת הקסוקינאז על חיוניות גרגרי האבקה וחנטה בחום (דוד גרנות)
3. יצירת צמחים המבטאים הקסוקינאז באופן בלעדי במאבקים ובגרגרי האבקה (דוד גרנות)
4. יצירת צמחים טרנסגנים המבטאים AGPase ו-סוכרוז סינטאז תחת <i>Nin88</i> (גורית פירון)
5. בחינת הקשר בין אנזימים המעורבים בביוסינתזה של עמילן ובין חיוניות גרגרי אבקה בחום (גורית פירון)
עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח
1. הוכח שעליה בפעילות של הקסוקינאז במאבקים ובגרגרי האבקה מאפשרת חנטה בחום.
2. יוצרו צמחים המבטאים בעודף הקסוקינאז תחת הפרומטר יחודי למאבקים וגרגרי אבקה.
3. נבחן הקשר בין עמילן ומטבוליזם של סוכרוז לחיוניות גרגרי אבקה.
המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשפט. האם הושגו מטרת המחקר בתקופת הדו"ח.
1. ניתן לשפר חנטה בחום על ידי זירחון מוגבר של סוכרים. תוצאות אלה ניתנות ליישום ויש לבחון אותן גם עם קוים מסחריים של עגבניה.
הבעיות שהתרחשו לפתרון ואם השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיטתיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרת המחקר בתקופה שמתרה לביצוע תוכנית המחקר.
בנוסף לביטוי ספציפי של הקסוקינאז במאבקים וגרגרי אבקה צריך לבחון גם את השפעת הביטוי של פרוקטוקינאז (אנזים נוסף המזרחן פרוקטוז) על חיוניות האבקה והחנטה בחום.
האם נחלל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - יש לפרט: פרסומים - כמקובל בביולוגיה, פטנטים - יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך.
הפרומוטור של <i>LeFRK4</i> היחודי למאבקים וגרגרי אבקה והגן <i>AtHXK1</i> בודדו על ידינו ועל כן ניתנים לרישום פטנט ללא חבות כלפי צד שלישי. הוגש פטנט על השימוש בפרומוטור לביטוי גנים שונים כולל אנזימים מזרחני סוכרים במטרה להגביר חנטה בתנאי עקה, ולמטרות נוספות.
פרסום על תוצאות השפעת הקסוקינאז על חנטה בחום, שעובד עד עתה לצורך רישום הפטנט, ישלח בקרוב לפרסום.
פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)
חסוי - לא לפרסם