

2002-2004

תקופת המחקר:

204-0342-04

קוד מחקר:

Subject: BUD DORMANCY RELEASE BY HYDROGEN CYANAMIDE: CHARACTERIZATION OF BIOCHEMICAL MARKERS AND UNDERSTANDING THE BIOCHEMICAL MECHANISM FOR DORMANCY RELEASE

Principal investigator: ETTI OR

Cooperative investigator: YAIR MENI, SHIMON LAVI, GIL NIR, ALIZA OGRODOVICH

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

שם המחקר: שבירת תרדמת פקעים בגפן: איתור סמנים ביוכימיים לשחרור מתרדמה ולימוד מנגנון הפעולה של ציאנמיד חומצי לשם שיפור טכנולוגית הישום ופתוח שוברי תרדמה

חוקר ראשי: אסתר אור

חוקרים שותפים: יאיר מני, שמעון לביא, גיל ניר, עליזה אוגרודוביץ

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

תקציר

המחקר הנוכחי עוסק בזיהוי ואפיון שינויים ביוכימיים החלים בפקעי גפן בהשפעת הטיפול בציאנמיד.

מטרת המחקר - לאפיין אתרים עליהם פועל החומר ולהביא להבנת מנגנון הפעילות, שימש כאמצעי לשיפור מתוכנן ומושכל של טכנולוגיות הישום של שוברי תרדמה ולפיתוח של שוברי תרדמה אלטרנטיביים שעלותם פחותה והסיכון בשימוש בהם נמוך יותר.

מהלך המחקר

בשנה הראשונה עסקנו באיסוף חומר צמחי מטיפולי ציאנמיד (HC), עקת קור, עקת חום (HS) ובקורת. הכנו ספריית cDNA מטיפול HC וטיפול ביקורת, התחלנו בסלקציה של קלונים להדפסה ושלחנו 200 קלונים ראשוניים לקביעת רצף. כמו כן ערכנו בחינת ביטוי מפורטת לגנים קטאלאז (CAT), אלקוהול דהידרוגנאז (ADH) ופירובט דה קרבוקסילאז (PDC) בעקבות טיפול ציאנמיד וטיפול חום. גם טיפול חום וגם טיפול בציאנמיד חומצי הובילו לירידה זמנית (של 24-48 שעות) בביטוי קטאלאז ועלייה מקבילה בביטוי הגנים ADH ו-PDC הקשורים בנשימה אנארובית. השינויים הופיעו בטיפול החום לפני שהופיעו בטיפול הציאנמיד ונמצאו בקורלציה עם התעוררות מוקדמת יותר בהשפעת טיפול חום. התוצאות הוכיחו את תקפות האסטרטגיה של איתור שינויים ביוכימיים משותפים מטיפולי שבירת תרדמה שונים ככלי לזיהוי מרכיבים במנגנון שבירת התרדמה.

בשנה השנייה חזרנו על איסוף חומר צמחי מטיפולי ציאנמיד, עקת קור ועקת חום על מנת לאפשר חזרות ביולוגיות מעונות שונות. שלחנו 4300 קלונים נוספים מספריית שהוכנו מטיפול HC וטיפול ביקורת לקביעת רצף ו-6300 גלאי PCR מכלל הקלונים נשלחו להדפסה. נערכה בחינת ביטוי מפורטת לגנים אסקורבט פראוקסידאז (APX), וגלוטטיון רדוקטאז (GR) שהראתה אינדוקציה בולטת בעקבות טיפול ציאנמיד וטיפול חום. לקראת סוף השנה התחלנו

בבחינת האפשרות כי שינויים דומים לאלו החלים בהשפעת ציאנמיד חומצי וחוס חלים גם בהשפעת טיפול קור.

בשנה השלישית נערכו אנליזות של נתוני הרצפים. תהליך של redundancy analysis שהתבסס על השוואת מידת הייצוג של קלון מסוים בספריות הטיפול והביקורת אפשר ללמוד על מידת השפעת הטיפול על דגם ביטויים של גנים מסוימים. דגם זה אושר עבור גנים נבחרים באמצעות Northern analysis. מלבד היותם אישור נוסף לקיומה של עקה חמצונית זמנית, הממצאים מצביעים על מעורבות גורמים שונים בבקרת התהליך ובהוצאתו לפועל. בין הגורמים ניתן למנות שינויים בשלד התאי, מעורבות סידן בהעברת אותות, שינויים במשק האנרגטי ומעורבות של תהליך פירוק חלבונים מבוקר. לקראת אמצע השנה השלישית נערכו היברידיזציות לציפים ייחודיים לפקעי גפן שהודפסו בשלהי השנה השניה ובתחילת השנה השלישית. היברידיזציות אלו הניבו מידע מקיף על דגם ביטויים של כ 5000 גנים שונים בתגובה לטיפול

בציאנמיד חומצי. גם כאן אושר דגם הביטוי שהתקבל מהציף באמצעות אנליזת Northern.

סכום תוצאות ניסיונות ההיברידיזציה נמצאים עדיין בשלבי ניתוח שבסיומו נוכל לזהות שינוי בביטויים של צברי גנים, ואנו מקווים שנוכל לאתר מסלולים ביוכימיים המעורבים בתהליך וגורמים השולטים בבקרתו. במקביל לעבודה זו נבחנה השפעת טיפולי הקור על דגם הביטוי של מספר גנים שעברו שינוי בולט בהשפעת טיפולים בציאנמיד ובחוס ומן התוצאות עולה האפשרות שטיפול קור עשוי להוביל לשינויים דומים לאלו שחלים בעקבות שימוש בשוברי תרדמה אחרים.

דו"ח מסכם לתכנית מחקר 204-0342 (לשנים 2002/3/4)

שבירת תרדמת פקעים בגפן: לימוד מנגנון הפעולה של ציאנמיד חומצי כאמצעי לשיפור טכנולוגיית היישום, פיתוח של שוברי תרדמה אלטרנטיביים ואיתור סמנים לשחרור מתרדמה

שמות החוקרים: אתי אור, עליזה אוגרדוביץ, שמעון לביא, יאיר מני. המכון למטעים, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן, ת.ד. 50250. דואר אלקטרוני: vhattior@agri.gov.il

Induction of bud break by hydrogen cyanamide: understanding the biochemical mechanism as a mean to develop alternative agents and markers for dormancy release.

Etti Or, Aliza Ogredovitch, Shimon Lavee and Yair Mani, Institute of Horticulture, Volcani Center, Bet Dagan, P.O.B. 50250. Email: vhattior@agri.gov.il

צפצ

חתימת החוקר: אתי אור

2. הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

3. תקציר הניסיונות שבוצעו בתקופת המחקר

המחקר הנוכחי עוסק בדיהוי ואפיון שינויים ביוכימיים החלים בפקעי גפן בהשפעת הטיפול בציאנמיד. מטרתו לאפיין אתרים עליהם פועל החומר ולהביא להבנת מנגנון הפעילות, שימש כאמצעי לשיפור מתוכנן ומושל של טכנולוגיות היישום של שוברי תרדמה ולפיתוח של שוברי תרדמה אלטרנטיביים שעלותם פחותה והסיכון בשימוש בהם נמוך יותר.

בשנה הראשונה עסקנו באיסוף חומר צמחי מטיפולי ציאנמיד (HC), עקת קור, עקת חום (HS) ובקורת. הכנו ספריית cDNA מטיפול HC וטיפול ביקורת, התחלנו בסלקציה של קלונים להדפסה ושלחנו 200 קלונים ראשונים לקביעת רצף. כמו כן ערכנו בחינת ביטוי מפורטת לגנים קטאלאז (CAT), אלקוהול דהידרוגנאז (ADH) ופירובט דה קרבוקסילאז (PDC) בעקבות טיפול ציאנמיד וטיפול חום. גם טיפול חום וגם טיפול בציאנמיד חומצי הובילו לירידה זמנית (של 24-48 שעות) בביטוי קטאלאז ועלייה מקבילה בביטוי הגנים ADH ו-PDC הקשורים בנשימה אנארובית. השינויים הופיעו בטיפול החום לפני שהופיעו בטיפול הציאנמיד ונמצאו בקורלציה עם התעוררות מוקדמת יותר בהשפעת טיפול חום. התוצאות הוכיחו את תקפות האסטרטגיה של איתור שינויים ביוכימיים משותפים מטיפולי שבירת תרדמה שונים ככלי לזיהוי מרכיבים במנגנון שבירת התרדמה.

בשנה השנייה חזרנו על איסוף חומר צמחי מטיפולי ציאנמיד, עקת קור ועקת חום על מנת לאפשר חזרות ביולוגיות מעונות שונות. שלחנו 4300 קלונים נוספים מספריות שהוכנו מטיפול HC וטיפול ביקורת לקביעת רצף ו-6300 גלאי PCR מכלל הקלונים נשלחו להדפסה. גערכה בחינת ביטוי מפורטת לגנים אסקורבט פראוקסידאז (APX), וגלוטטיון רדוקטאז (GR) שהראתה אינדוקציה בולטת בעקבות טיפול ציאנמיד וטיפול חום. לקראת סוף השנה התחלנו בבחינת האפשרות כי שינויים דומים לאלו החלים בהשפעת ציאנמיד חומצי וחום חלים גם בהשפעת טיפול קור.

בשנה השלישית נערכו אנליזות של נתוני הרצפים. תהליך של redundancy analysis שהתבסס על השוואת מידת הייצוג של קלון מסויים בספריות הטיפול והביקורת אפשר ללמוד על מידת השפעת הטיפול על דגם ביטויים של גנים מסויים. דגם זה אושר עבור גנים נבחרים באמצעות Northern analysis. מלבד היותם אישור נוסף לקיומה של עקה חמצנית זמנית, הממצאים מצביעים על מעורבות גורמים שונים בבקרת התהליך ובהוצאתו לפועל. בין הגורמים ניתן למנות שינויים בשלד התאי, מעורבות סידן בהעברת אותות, שינויים במשק האנרגטי ומעורבות של תהליך פירוק חלבונים מבוקר. לקראת אמצע השנה השלישית נערכו היברידיזציות לצ'יפים ייחודיים לפקעי גפן שהודפסו בשלהי השנה השניה ובתחילת השנה השלישית. היברידיזציות אלו הניבו מידע מקיף על דגם ביטויים של כ 5000 גנים שונים בתגובה לטיפול בציאנמיד חומצי. גם כאן אושר דגם הביטוי שהתקבל מהצ'יפ באמצעות אנליזת Northern. תוצאות נסיונות ההיברידיזציה נמצאים עדיין בשלבי ניתוח שבסיומו נוכל לזהות שינוי בביטויים של צברי גנים, ואנו מקווים שנוכל לאתר מסלולים ביוכימיים המעורבים בתהליך וגורמים השולטים בבקרתו. במקביל לעבודה זו נבחנה השפעת טיפולי הקור על דגם הביטוי של מספר גנים שעברו שינוי בולט בהשפעת טיפולים בציאנמיד ובחום ומן התוצאות עולה האפשרות שטיפול קור עשוי להוביל לשינויים דומים לאלו שחלים בעקבות שימוש בשוברי תרדמה אחרים.

4. פרסומים: עדיין אין.

מבוא ותיאור הבעיה

היתרון הכלכלי העיקרי הגלום בגידול ענבי מאכל באזורים חמים הינו הבכרה מקסימלית ואכן החלק הארי של ענבי המאכל המיוצאים מישראל מקורו בכרמים באזורים חמים דוגמת בקעת הירדן והערבה. יכולת ההבכרה באזורים אלו מוגבלת על ידי מיעוט מנות קור בחורף. אמנם בהשוואה למינים נשירים אחרים הגפן ידועה כבעלת דרישות קור מועטות יחסית אולם גם דרישות אלו לא תמיד מתמלאות באזורים חמים ועל כן גידול גפן באזורים אלו כרוך בהתעוררות פקעים לקויה מתרדמה. התעוררות לקויה, המתבטאת באיחור בהתעוררות, באחוזי התעוררות נמוכים ובחוסר אחידות במועד פתיחת הפקעים, מקשה על קבלת יבול גבוה ואחיד של פרי מבכיר מאיכות הנדרשת לייצוא ומובילה להתנוונות מהירה של הגפנים.

הפתרון האגרוטכני המקובל לשבירת התרדמה בכרם באזורים חמים הינו ריסוס בציאנמיד חומצי שנמצא כשובר התרדמה הכימי היעיל ביותר לשבירת תרדמה בגפן. מנגנון הפעולה של ציאנמיד חומצי אינו ברור, אולם ידוע כי יעילות פעולתו משתנה ותלויה בעוצמת התרדמה של הפקע המשתנה במהלך עונת התרדמה. ידוע גם כי עמידות הפקעים לטיפול בציאנמיד חומצי יורדת במהירות עם היציאה מן התרדמה ועל כן מקובל להימנע מריסוס מאוחר כדי למנוע נזק לפקעים. כמו כן דווח כי ליישום מוקדם מדי של ציאנמיד חומצי, כאשר הפקעים בשלב תרדמה עמוקה, אין השפעה שוברת תרדמה או שלחילופין הוא עשוי לגרום להתעוררות חלקית ולא אחידה של פקעים, שעלולה להוביל לפגיעה ברמת היבול ובאיכותו. השימוש היעיל בציאנמיד חומצי מוגבל על כן לחלון צר יחסית במהלך התפתחותו של הפקע וכרוך בהתאמה של הריכוז ומועד הריסוס האופטימליים, המשתנים בתלות בשלב התרדמה בו נמצאת הגפן.

לרוע המזל, השינויים בעצמת התרדמה של הפקע במהלך עונת התרדמה אינם מלווים בשינויים חזותיים בהתפתחות הפקע ועל כן הם בלתי ניתנים לחיזוי. לפיכך, קביעת עיתוי הטיפול וריכוז החומר הנדרש מתבססת, עד היום, על שימוש בנתונים אמפיריים מטיפולים שהוכחו כמוצלחים בזנים, שנים ו/או אזורים אחרים. מאחר ועומק התרדמה משתנה במהלך העונה ומשתנה בין זנים, שנים ואזורי גידול, הריסוס בציאנמיד מלווה לא אחת במזקים כלכליים כבדים.

בשנים האחרונות נחשפנו, במסגרת טיפולים לשבירת תרדמה באמצעות ציאנמיד חומצי, לתופעות חדשות ובלתי צפויות שאינן ניתנות לחיזוי ושליטה בהעדר ידע על מנגנון פעילותו של החומר ועל התהליכים האנדוגניים המעורבים בשחרור פקעים מתרדמה. בין הממצאים נזקים חריפים לפקעים מתעוררים שנמצאו בחממות אותם ייחסנו לאפליקציה של ציאנמיד ולאינטראקציה עם טמפרטורת הסביבה בזמן היישום, אינדיקציות ראשוניות המצביעות על יתרון בקצב ההתעוררות לפקעים שנשטפו זמן קצר לאחר מתן ציאנמיד חומצי, אחוזי התעוררות נמוכים שהתקבלו באזורים מסויימים ללא תלות במועד הטיפול וממצאים לפיהם טיפול סתווי בציאנמיד שהיה צפוי לגרום נזק לפקעים שיפר התעוררותם וצימוחם עם העלייה בריכוז החומר. דגם פעילות לא צפוי זה, הנובע מהעדר הבנה של מנגנון הפעילות של החומר, הוא מסוכן ומגביל את היכולת לשיפור מתוכנן ומושכל של טכנולוגיות היישום.

לסיכום, ציאנמיד חומצי הינו שובר התרדמה היעיל ביותר בגפן ואין לו כיום תחליף, למרות עלותו הגבוהה ופוטנציאל הנזק שלו. צמצום הסיכונים הכרוכים בשימוש בו ושיפור מתוכנן ומושכל של טכנולוגיות היישום שלו תלויים בהבנת מנגנון פעילותו ובהבנת הקשר בין מנגנון זה לבין מצבו הפיזיולוגי של הפקע. הבנה זו הינה גם הבסיס ההכרחי לפיתוח של שוברי תרדמה אלטרנטיביים, שעלותם פחותה והסיכון בשימוש בהם נמוך יותר, ולזיהויים של שינויים ביוכימיים שיוכלו לשמש כסמנים לתהליכי שחרור מתרדמה, ויאפשרו אופטימיזציה של הטיפולים לשבירת התרדמה.

מטרות המחקר וחשיבותו

המחקר הנוכחי עוסק בזיהוי ואפיון שינויים ביוכימיים החלים בפקעי גפן בהשפעת הטיפול בציאנמיד. מטרתו לאפיין אתרים עליהם פועל החומר ולהביא להבנת מנגנון הפעילות, שימש כאמצעי לשיפור מתוכנן ומושכל של טכנולוגיות היישום של שוברי תרדמה ולפיתוח של שוברי תרדמה אלטרנטיביים שעלותם פחותה והסיכון בשימוש בהם נמוך יותר. זיהויים ואפיונם של השינויים הביוכימיים האמורים הינו גם הבסיס לפיתוחם של סמים אנדוגניים שיאפשרו הערכת עומק התרדמה של הפקעים ואופטימיזציה של הטיפולים לשבירת התרדמה, על בסיס הבנת הקשר בין מנגנון הפעילות של החומר ומצבו הפיזיולוגי של הפקע. מחקר מסוג זה, המניח בסיס לשליטה מושכלת בתהליך השחרור מתרדמה, הוא בעל משמעות כלכלית מרחיקת לכת בגידול גפן ועצי פרי נשירים אחרים באזורים חמים.

למרות מחקר רב שנים בנושא תרדמת פקעים לא ברורים המנגנונים באמצעותם משרים גורמי הסביבה תרדמה והתעוררות, לא ברורה זהותם של הגורמים בצמח האחראים על בקרת התהליך והפעלתו ולא ברור מנגנון פעולתם. הבנת מנגנון העברת הסיגנלים המובילים להתעוררות פקעים בעקבות טיפול בציאנמיד חומצי ואפיון האתרים התאיים עליהם הוא פועל, עשויים לסייע בהבנת תופעת השחרור מתרדמה בכלל ובהבנת מנגנון פעילותו של החומר בפרט. זיהוי גנים המתבטאים בפקע באופן דיפרנציאלי בהשפעת הטיפול בציאנמיד חומצי עשוי להניח את הבסיס לאנליזה מתקדמת של מנגנון הפעילות ולהבנת הקשר בינו לבין מצבו הפיזיולוגי של הפקע.

פירוט הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו לתקופת הדו"ח

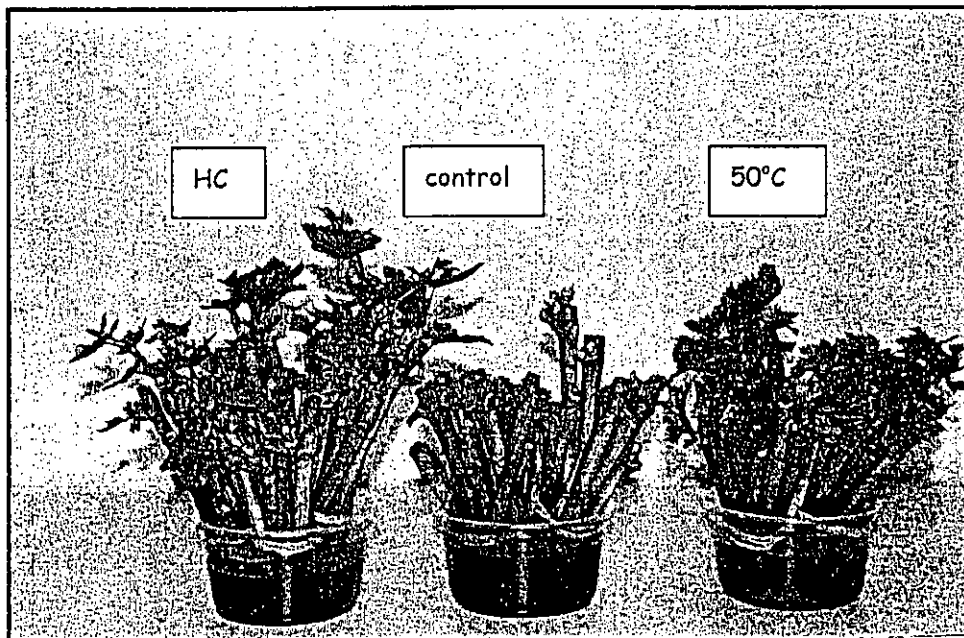
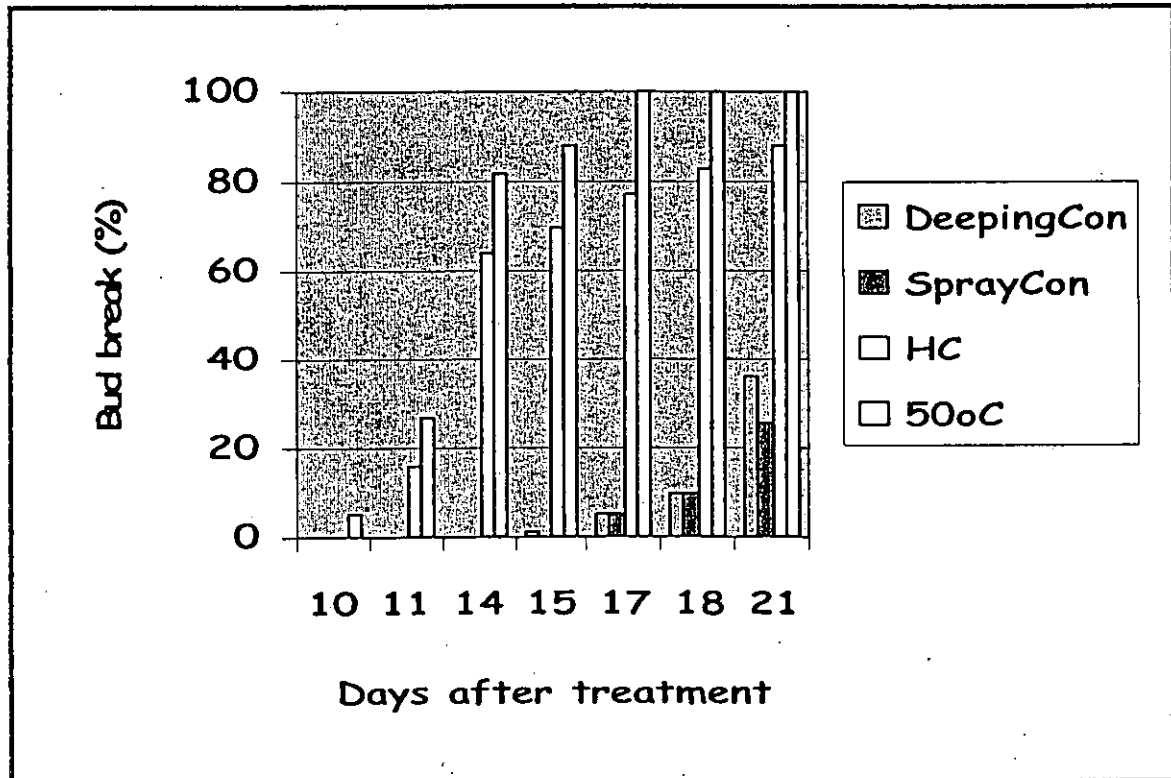
א. השוואת דגם הביטוי בעקבות השראת שחרור מתרדמה על ידי ציאנמיד חומצי וטיפול עקה אחרים

נסינות ראשוניים שנעשו לשבירת תרדמה על ידי אמצעים חליפיים ליצירת עקה חמצונית הראו מגמה של עלייה באחוז ההתעוררות בהשוואה לבקורת. גם עקת חום וגם עקת קור הביאו לשבירת תרדמה במערכת הנסינית המשמשת אותנו כפי שכבר דווח על ידינו בדו"ח קודם. מתעוררת השאלה אם הטיפולים השונים מביאים לאותה סדרת שינויים ועל מנת לענות עליה נערכנו להשוואה של שינויים בתבנית הביטוי החלים בעקבות טיפול בציאנמיד וטיפול בעקת חום ככלי לאיתור שינויים ביוכימיים משותפים. על פי הבנתנו אסטרטגיה זו עשויה לשפר את יכולתנו לזהות מרכיבים הכרחיים הנחוצים להתקדמות תהליך השחרור מתרדמה, ללא תלות בסיגנל המשרה את תחילתו של מפל האירועים, ולהפרידם משינויים אחרים שעשויים להיות קשורים לעקה ספציפית זו או אחרת ואינם קשורים בהכרח לשבירת התרדמה.

א.1. אינדוקציה של שבירת תרדמה באמצעות ציאנמיד חומצי נערכה בשתי שנות המחקר הראשונות על פי המתואר בדוחו"ת קודמים: מועד הטיפול נקבע על פי סטטוס התרדמה של הפקעים כמתואר בדוחו"ת קודמים. עשר קבוצות בנות עשרה ייחורים מקבוצת הטיפול, ומספר זהה מקבוצת הביקורת, הומצו למשך 21 יום לקביעת אחוזי ההתעוררות והערכת השפעת הטיפול על קצב ורמת השחרור מתרדמה כפי שתואר בדוחו"ת קודמים. יתר הייחורים שימשו כמקור לפקעים שנדגמו לאחר פרקי זמן שונים מתום הטפול (3h, 6h, 12h, 1d, 2d, 4d, 6d) והוקפאו ב-80°C.

א.2. אינדוקציה של שבירת תרדמה באמצעות חום. שבירת תרדמה של פקעי פרלט הושרתה בשתי שנות המחקר ע"י טבילה לשעה ב 50°C שנמצאה בראשית המחקר כמשרה יעיל במערכת הניסוי המוצעת.

תמונה 1: השוואת קצב ורמת התעוררות פקעים על ייחורים חד פרקיים שטופלו בציאנמיד חומצי, טבילה במים חמים (50 מ"צ למשך שעה) ובקורות של ריסוס במים וטבילה במים בטמפרטורת החדר למשך שעה. בתמונה התחתונה מוצגים ייחורים חד פרקיים מטיפולי ציאנמיד חומצי, חום ובקורת של טבילה במים בטמפרטורת החדר לאחר 17 יום בתנאי המרצה בחדר גידול.



מלבד הייחורים ששימשו להערכת יעילות הטיפול על פי א.1 שימשו יתר הייחורים לדגימת פקעים לאחר פרקי זמן שונים מתום הטיפול (6h, 14h, 24h, 2d, 4d) והוקפאו ב-80°C. האינדוקציה המתוארת הביאה להתעוררות מוקדמת יותר ובאחוזים גבוהים יותר בהשפעת עקת החום בהשוואה לטיפול בציאנמיד חומצי והפקע המתעורר נראה בריא יותר, בעל עלים גדולים יותר וללא צריבות שוליים ואטיולציה שנמצאו בפקעים שטופלו בציאנמיד חומצית (תמונות 1 ו-2).

א.3. אנליזת ביטוי מפורטת של גנים, שהראו שינוי בביטוי בעקבות טיפול בציאנמיד, לאחר פרקי זמן שונים מטיפול HC וטיפול חום

אנליזת Northern נערכה במקביל עם דגימות RNA מנקודות הזמן השונות מטיפול חום וציאנמיד ומהבקורות המתאימות. בשנת המחקר הראשונה השתמשנו לאנליזות אלו בגלאים משלושה גנים ששיבטנו ושדגם הביטוי שלהם בעקבות טיפול בציאנמיד חומצי אופייני: קטאלאז, אלכוהול דהידרוגנאז ופירובט דקרבוקסילאז (ראה דווח קודם). אנליזה זו נעשתה מתוך כוונה ללמוד אם טיפולים שוברי תרדמה שונים מובילים לאותו סט של שינויים. אנליזה זו גם אפשרה לברר באופן מפורט יותר אם מדובר בהפעלת עקה קבועה או עקה זמנית. התוצאות שהתקבלו מאנליזת ביטוי מפורטת של גנים לאחר פרקי זמן שונים מטיפול HC וטיפול חום (תמונה 2) הראו באופן חד וברור כי:

א. שני טיפולים שונים לשבירת תרדמה מובילים לאותו סט של שינויים ביוכימיים.
ב. יש הבדל במועד הופעת השינויים הביוכימיים כאשר טיפול חום הביא לשינויים אלו לפני טיפול בציאנמיד חומצי.

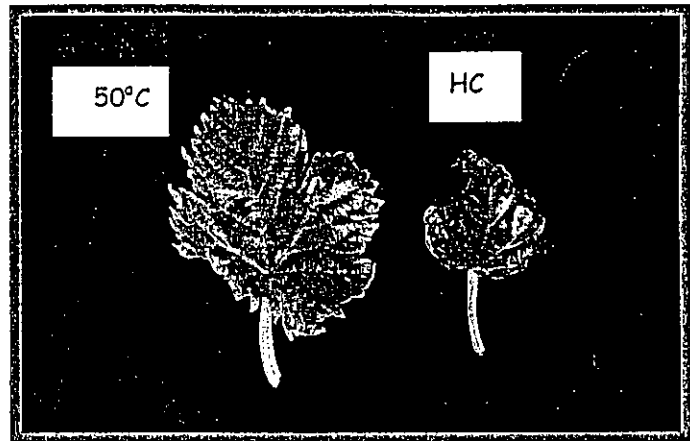
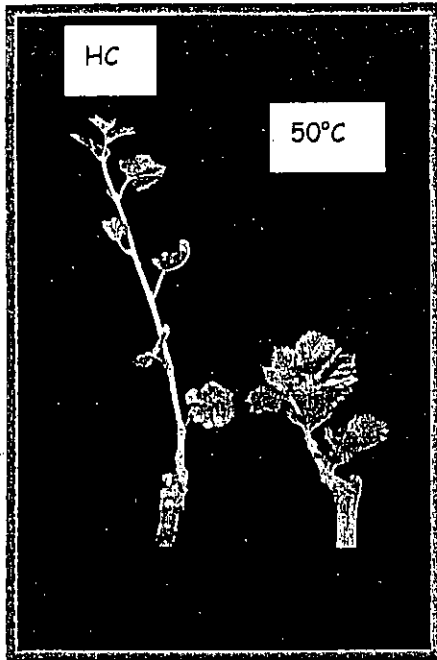
ג. יש קורלציה בין מועד ההתעוררות למועד הופעת השינויים הביוכימיים שתועדו כך שטיפול חום הביא להתעוררות מוקדמת מזו שהתקבלה בהשפעת ציאנמיד חומצי. קורלציה זו מציעה קשר ענייני בין השינויים הביוכימיים המתוארים למנגנון שבירת התרדמה.

התוצאות מוכיחות באופן חותך כי שני הטיפולים מובילים ליצירת עקה זמנית המתבטאת בירידה בביטוי של קטאלאז המעורב בפרוק פראוקסידים ובעלייה מקבילה בביטויים של גנים הקשורים בנשימה אנארובית למשך 24-48 שעות שלאחריהם חלה עלייה בביטוי הקטאלאז וירידה מקבילה בביטוי גנים הקשורים בנשימה אנארובית.

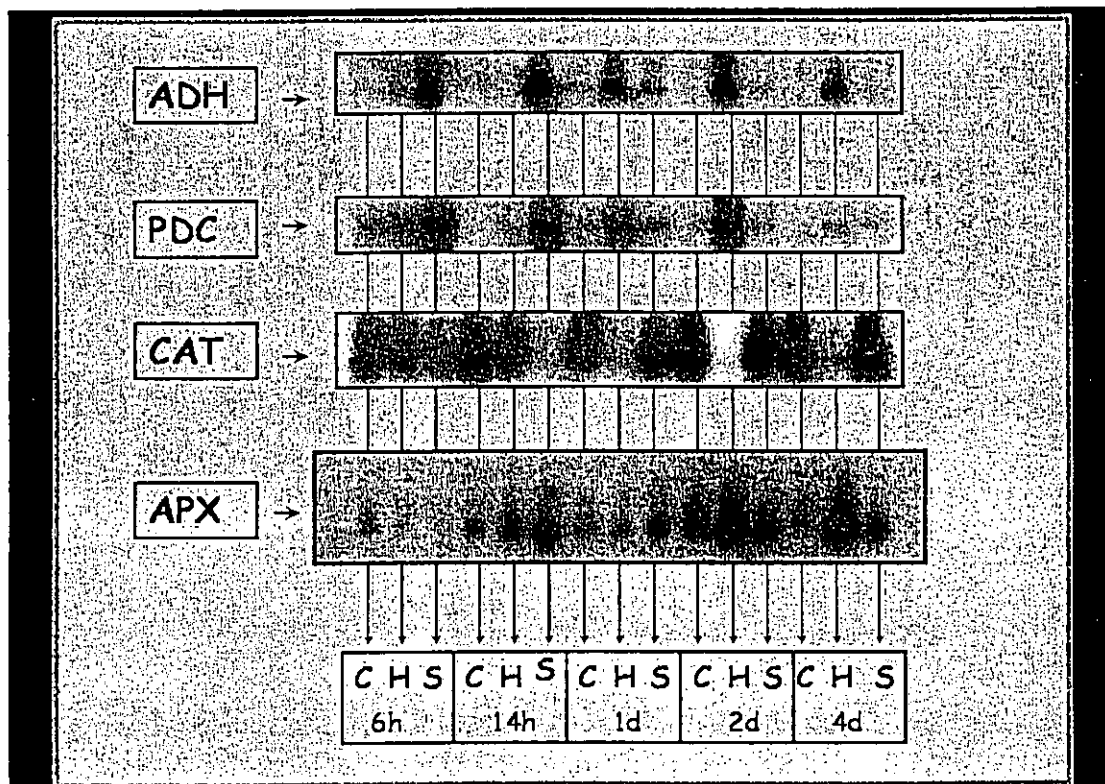
חשיפה לעקות ביוטיות ואביוטיות דוגמת התקפת פתוגנים, יובש, מליחות, קור, חום ועוד גורמות להפרה של ההומאוסטזיס בתאים וליצור מוגבר של רדיקלים חופשיים, ביניהם H_2O_2 , במסלולים ביוכימיים שפעילותם מוגברת בעקבות חשיפה לעקה. ייצור מוגבר של רדיקלים חופשיים בזמן עקה מסכן את התא אך בו זמנית משמש כסיגנל להפעלת מנגנוני תגובה. הרדיקל H_2O_2 נחשב לרדיקל יציב היכול לעבור מאתרי הייצור לאתרים אחרים בתא הצמח. לפיכך הונח כי בריכוז המתאים H_2O_2 משמש כשליח משני להעברת סיגנלים שונים. על בסיס הממצאים הקיימים בידינו הועלתה ההשערה כי העקה הזמנית הנוצרת בעקבות הטיפולים השונים היא עקת חמצון וכי היא עשויה להיות בעלת תפקיד בהעברת הסיגנל המוביל לשבירת תרדמה (פרוט וביסוס ההיפותזה נמצא בדוחות קודמים). על מנת לחזק הנחה זו בחרנו לבחון את מעורבותם של מספר אנזימים המשמשים להתגוננות מפני עקת חמצון.

מאחר ורדיקלים חופשיים משמשים להעברת סיגנלים מחד, והינם טוקסיים מאידך, קיימות שתי מערכות לוויסות ריכוזם: מערכת רגישה המאפשרת שינויים בריכוזים נמוכים למטרות בקרה, ומערכת שניה המאפשרת דטוקסיפיקציה במקרה של ריכוזי רדיקלים גבוהים במיוחד במהלך עקה. השחקנים המרכזיים במערכת האנזימית שתפקידה ללכוד את הרדיקלים החמצניים הינם superoxidase dismutase (SOD) ההופך רדיקלים של סופראוקסיד לפראוקסידים, ascorbate peroxidase (APX) וקטאלאז. תפקידם של שני האחרונים לחזר את הפראוקסידים למים. השוני באפיניות של האנזימים APX (μM) וקטאלאז (mM) לפראוקסידים מרמז על כך שהקטאלאז הוא האחראי על סילוק של תרכובות חמצן בזמן עקה. יחד עם זאת, במצב בו פעילות הקטאלאז מושבתת סביר להניח כי תושרה הגברה של פעילות APX.

תמונה 2: שריגים ועלים מייחורים חד פרקיים שהתפתחו לאחר טיפול חום וטיפול בציאנימיד חומצי.



תמונה 3: השוואת תבנית הביטוי של PDC, ADH, קטאלאז ו-APX. אנליזת Northern נערכה לדגימות RNA מנקודות הזמן השונות מטיפול חום (S), ציאנימיד (H) ובקורת (C) המתאימות. השתמשנו בגלאים מארבעה גנים: קטאלאז (CAT), אסקורבט פראוקסידאז (APX), אלכוהול דהידרוגנאז (ADH) ופירובט דקרבוקסילאז (PDC).



בעוד שקטלאז אינו דורש כוח מחזר לצורך תפקודו, פראוקסידאזות זקוקות לנוכחות גלוטטיון במצב מחוזר לצורך תפקודן בזמן עקה חמצונית. על מנת לשמור על יחס גבוה בין המצב המחוזר למצב המחומצן של הגלוטטיון בזמן עקה ולאפשר פעילות מוגברת של APX נדרשת פעולתו של גלוטטיון רדוקטאז (GR). על בסיס האמור לעיל בחרנו לערוך אנליזה ביטוי מפורטת של הגנים המקדדים ל- APX ו-GR. בתמונה 4 ניתן לראות אנליזה של ביטוי הגן אסקורבט פראוקסידאז (APX) במועדים שונים (6, 14, 24, 48 ו-96 שעות) לאחר מתן הטיפולים לשבירת תרדמה. אנליזה זו נעשתה באמצעות השימוש ב- Real Time PCR. מן הנתונים ניתן להסיק כי גם במקרה של APX, בדומה לתוצאות שהוצגו לגבי הגנים הקודמים שנבחנו, שני טיפולים שונים לשבירת תרדמה מובילים לאינדוקציה זמנית של ביטוי מאותו גן וגם כאן יש הבדל במועד הופעת השינויים הביוכימיים כאשר טיפול חם הביא לשינויים אלו לפני טיפול בציאנמיד חומצי. הצבה של דגם השתנות הביטוי של APX מול השינויים שנמצאו בדגם בביטוי של הגנים הקודמים (תמונה 3) מוכיחה מעבר לכל ספק את הקשר בין השתנות הביטוי של APX להשתנות בביטוי הגנים האחרים. בהשפעת הטיפול בציאנמיד ניתן אף לראות רצף ארועים על פיו העלייה ברמת ביטוי של APX חלה לאחר תחילת הירידה ברמת הקטלאז ולפני העלייה ברמת ADH ו- PDC ומגיעה לשיאה במקביל לשיא הזמני שלהם. בטיפול החום לא ניתן לראות את הדרוג האמור בנקודות הזמן הנבחנו משום ששיא הפעילות של כל הגנים הוא בשתי נקודות הזמן הראשונות. ככלל, ההנחה המתבקשת למראה התוצאות הינה כי עלייה זו ברמת APX היא כורח נדרש בתגובה לעקה חמצונית משמעותית שנוצרה בעקבות השינויים המוזכרים. בחינת דגם ההשתנות בביטוי התעתיק לגלוטטיון רדוקטאז (תמונה 5) מצביעה על מסקנות דומות ומבססת את ההנחה כי קיימת התאמה בין בקרת הביטוי משני הגנים המאפשרת הגנה מפני עקת החמצון הנוצרת קודם לכן בתגובה לטיפול שביירת התרדמה. בבדיקה ראשונית של פרופיל ההשתנות של רמת הפראוקסידים בפקעים מטופלים בציאנמיד ופקעי בקורת ניתן למצוא עלייה זמנית בעקבות הטיפול בציאנמיד התומכת תמיכה נוספת בעובדת היווצרותה של עקה חמצונית זמנית (נתונים לא הובאו מחוסר מקום).

א. 4. נסיון לשבירת תרדמה בכרם באמצעות טיפול חום

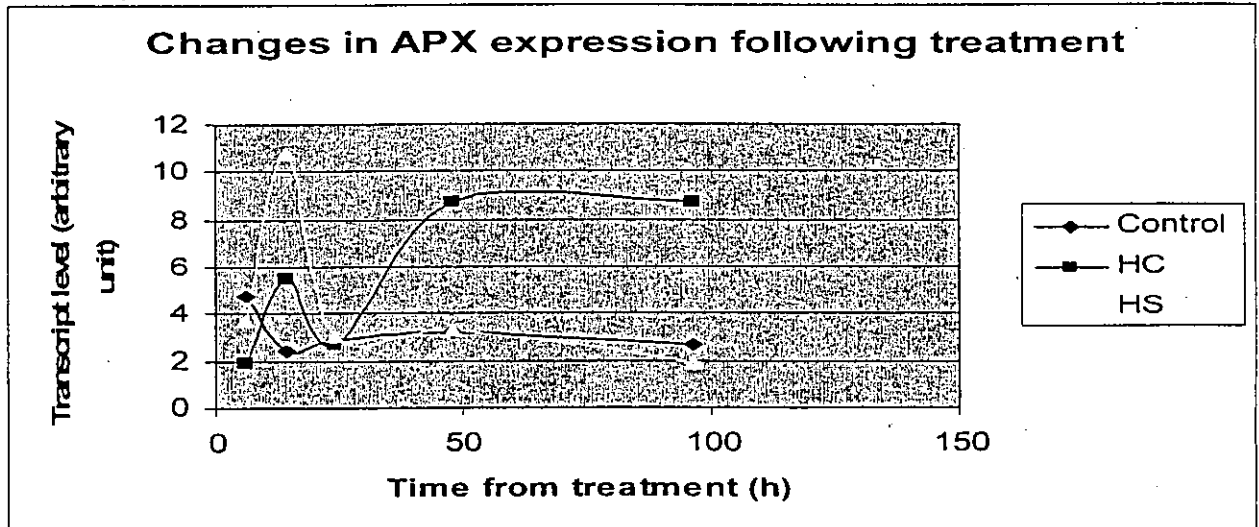
על בסיס הממצאים המעבדתיים שקבלנו החלטנו לבחון אם ריסוס קיטור יוכל להעיר גפנים מתרדמה. במהלך השנה השנייה נערכה בדיקה פרלימिनרית של ריסוס גפנים במים חמים בלחץ גבוה. אילוצים שונים הובילו לביצוע מאוחר יחסית של הנסיון בכרם סופיריור בבקעת כנרת (לקראת סוף פברואר). החשש במקרה כזה הוא לקבלת התעוררות טובה של הבקורות ללא טיפול שובר תרדמה עקב השלמת מנת הקור הנדרשת. במקרה כזה קשה יותר לתעד הבדל בין טיפול שביירת תרדמה לבקורת. למרות האמור לעיל התרשמנו כי נמצאה התעוררות טובה יותר ומוקדמת יותר של פקעים בעקבות הטיפול. בנוסף חשוב היה לנו לוודא כי הטיפול אינו גורם לנזק ואכן לא נמצא כל נזק בעקבות הטיפול. בכוונתנו לבצע מחקר מקיף שמטרתו לבחון את האפשרות של שימוש מעשי בשוק חום לשבירת תרדמה.

ב. שבירת תרדמה באמצעות טיפול קור מבוקר

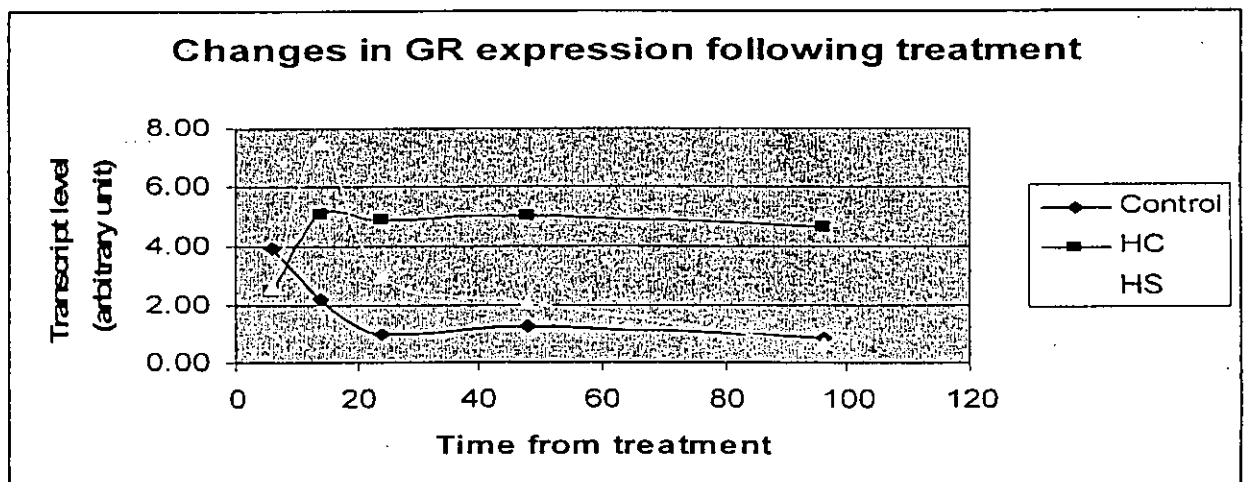
ב.1. אינדוקציה של שבירת תרדמה באמצעות טיפול קור מבוקר.

שבירת תרדמת פקעי פרלט הושרתה גם באמצעות טיפול קור מבוקר. כרם במושב משואה בבקעת הירדן נזמר בראשית נובמבר עם הכניסה לתרדמה עליה למדנו באמצעות עקומת תרדמה (תמונה 6). הזמורות נאספו וחולקו לשמונה קבוצות שנעטפו ביריעה כהה והוכנסו לקרור ב 6 מ"צ. ל 100, 200, 400, 600, 700 ו-800 שעות. קבוצות בקורת נשמרו לתקופות דומות ב 20/12 מ"צ למשך 18/6 שעות ביממה. לאחר ההוצאה

תמונה 4: אנליזת Real Time PCR לדגימות RNA מנקודות הזמן השונות (6, 14, 24, 48 ו-96 שעות) מטיפול חום (HS), ציאניד (HC) ובקורת (C). האנליזה נעשתה תוך שימוש בפריימרים מתוך אזור שמור ברצף הגן אסקורבט פראוקסידאז (APX) ששובט מגפן ופריימרים מאזור שמור ברצף גן המקדד ל-18s ribosomal RNA ששובט אף הוא מגפן.



תמונה 5: אנליזת Real Time PCR לדגימות RNA מנקודות הזמן השונות (6, 14, 24, 48 ו-96 שעות) מטיפול חום (HS), ציאניד (HC) ובקורת (C). האנליזה נעשתה תוך שימוש בפריימרים מתוך אזור שמור ברצף הגן גלוטטיון רדוקטאז (GR) ששובט מגפן ופריימרים מאזור שמור ברצף גן המקדד ל-18s ribosomal RNA ששובט אף הוא מגפן.

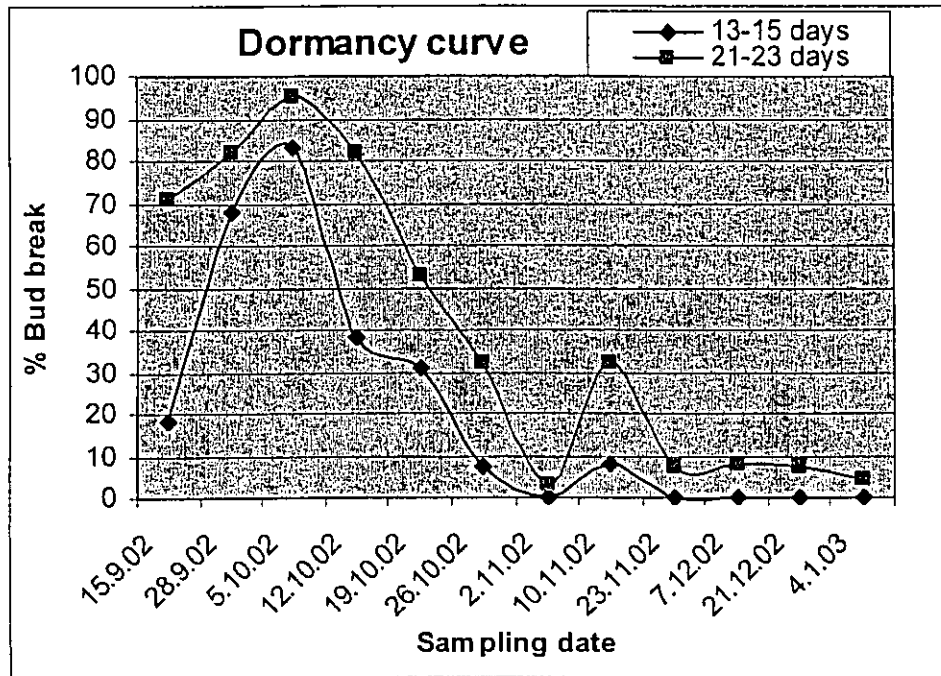


מהאחסון הוכנו מכל קבוצה עשר קבוצות של עשרה ייחורים לבדיקת קצב התעוררות ובתמונה 7 ניתן לראות את השפעת הקרור על קצב ההתעוררות. יתר הפקעים נדגמו הוקפאו מייד לאחר הוצאה מהאחסון ושימשו לבחינת ביטוי מפורטת של הגנים שנלמדו בטיפול החום והציאנמיד. נסיון דומה נערך בשנת המחקר השנייה.

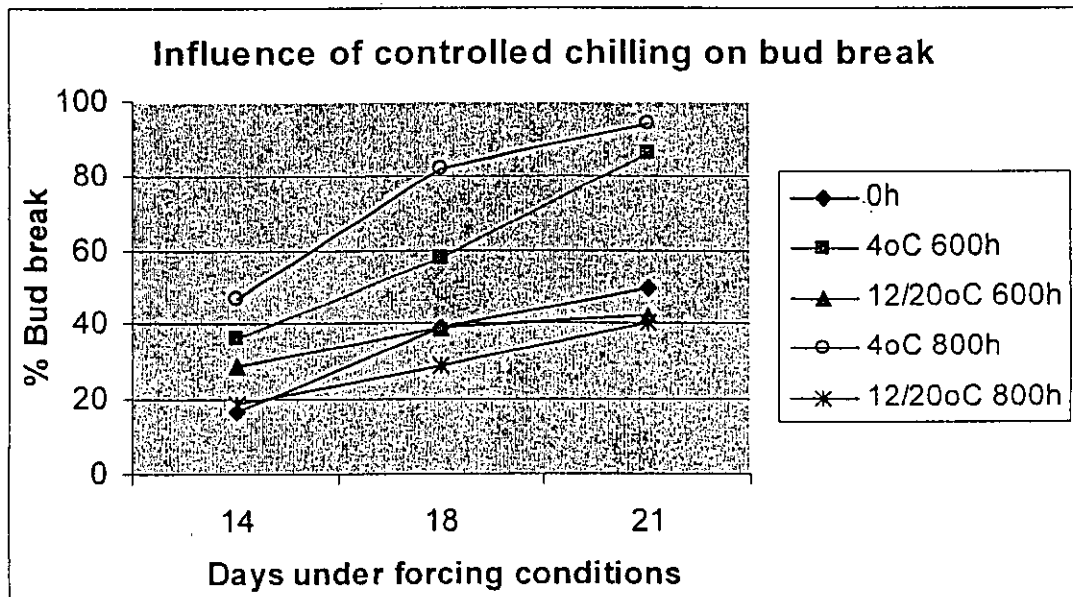
ב. בחינת דגם ביטוי של גנים נבחרים בעקבות שבירת תרדמה באמצעות טיפול קור מבוקר
במסגרת הכוונה ללמוד אם טיפולים שוברי תרדמה שונים מובילים לאותו סט של שינויים עלתה השאלה אם שובר התרדמה הטבעי - קור - משפיע באופן דומה לטיפולים בשוברי תרדמה מלאכותיים. בנסיון ראשון לענות על שאלה זו בקשנו לעקוב אחר השפעת טיפולי קור מבוקרים על שינויים אפשריים על ביטוי של גנים שלגביהם נמצאה השתנות בולטת בדגם הביטוי בהשפעת טיפולי החום והציאנמיד. אנליזה של דגם הביטוי נערכה תוך שימוש ב Real Time PCR ובדגימות RNA מטיפולי הקור השונים. השתמשנו בארבעה גללים שדגם הביטוי שלהם בעקבות טיפול בציאנמיד חומצי אופייני: קטאלאז, אסקורבט פראוקסידאז, אלוהול דהידרוגנאז ופירובט דקרבוקסילאז. התוצאות שהתקבלו מאנליזת ביטוי מפורטת של גנים לאחר פרקי זמן שונים של שהייה ב 4 מ"צ מוצגות בתמונה 8 ותמונה 9. מן התוצאות נראה כי גם בעקבות טיפול קור חלים שינויים בביטוי הגנים האמורים. בתמונה 8 נראה כי חלה עלייה בולטת וזמנית בביטוי ADH ו PDC לאחר צבירה של 500-600 שעות קור. מעקומת ההתעוררות נראה כי בנקודת זמן זו חל מפנה ביכולת ההתעוררות של הפקעים והיא עשויה לייצג את מועד ההשפעה הקריטי של תהליך צבירת הקור. קשה מאד להקביל בין טיפול הקור לשוברי התרדמה האחרים משום שמדובר בכל הנראה בעצמת סיגנל שונה ובסדר גודל שונה מבחינת זמן תגובה. בעוד שבטיפולים המלאכותיים קל לעקוב אחר השינוי במרווחי זמן קצרים לאחר מתן של סיגנל קריטי במועד ידוע, קשה לבצע דבר דומה בטיפול מתון וארוך כמו טיפול הקור. מכאן עולה החשש כי אופן הדגימה (מדי 100 שעות) גורם להחמצה של חלק ניכר מתהליך שבירת התרדמה שחל בעקבות צבירה של X שעות קור. למרות זאת ניתן להניח על בסיס התוצאות כי התגובה העקרונית לשוברי התרדמה שונים דומה מבחינה מהותית ושונה כנראה מבחינה כמותית. בנוסף נראה כי בעתיד כדאי לחדד את התוצאות על ידי אנליזה מפורטת יותר בין 400-600 שעות קור. בתמונה 9 ניתן לראות כי בנקודת המפנה ביכולת ההתעוררות רמת הביטוי מהגן APX נמצאת בשיאה והיא עולה בשלבים מוקדמים יותר. גם נתונים אלו דומים לנתונים שהתקבלו לגבי השפעת הציאנמיד לפיהם אינדוקציה של APX קודמת לאינדוקציה של ADH ו PDC ויחד עם נתונים לגבי מועד העלייה ברמת הפראוקסידים עשויה לרמז כי התפתחות עקה חמצונית קודמת לזו של העקה הנשימתית. השפעת הקור על ביטוי מהגן לקטאלאז שונה מזו שהובחנה עבור שוברי תרדמה אחרים. בעבר כבר פרסמנו נתונים לפיהם עולה כי צבירת קור טבעית אינה מובילה לירידה בביטוי קטאלאז. יחד עם זאת הוכח בעבר כי פעילות האנזים יורדת בתגובה לקור. אפשרות אחת היא כי נקודות הדגימה המרווחות אינן מאפשרות לגלות את הירידה הזמנית בביטוי מהגן המקדד לקטאלאז. אפשרות אחרת היא כי קור אכן מוביל לשינוי ברמת הפעילות במנגנון שאינו כולל בקרת ביטוי מהגן. בעתיד נצטרך לשפר את מערכת המחקר על מנת להביא סימוכין נוספים שיתמכו בהנחה כי גם קור מוביל ליצירת עקה חמצונית זמנית.

ג. איתור שינויים בביטוי גנים בהשפעת טיפול בציאנמיד באמצעות טכנולוגיות גנומיות
הטכנולוגיה בה השתמשנו בשנים קודמות הגבילה את היקף האנליזה שביכולתנו לבצע. ההזדמנות יוצאת הדופן שנפתחה בפנינו להשתמש בטכנולוגיות גנומיות עתירות טכנולוגיה וממון שהתפתחו לאחרונה תאפשר לנו להעלות את היקפי האנליזה במספר סדרי גודל, לזהות שינוי בביטויים של צברי גנים, ולאתר מסלולים ביוכימיים המעורבים בתהליך וגורמים השולטים בבקרתו. בדיווח זה ניתן דו"ח ראשוני לעבודה שהיקפה חורג מן הפרוייקט הנוכחי בתקצובה והיקפה והיא תדווח בפרוטרוט עם השלמת ניתוח התוצאות במסגרת פרוייקט BARD.

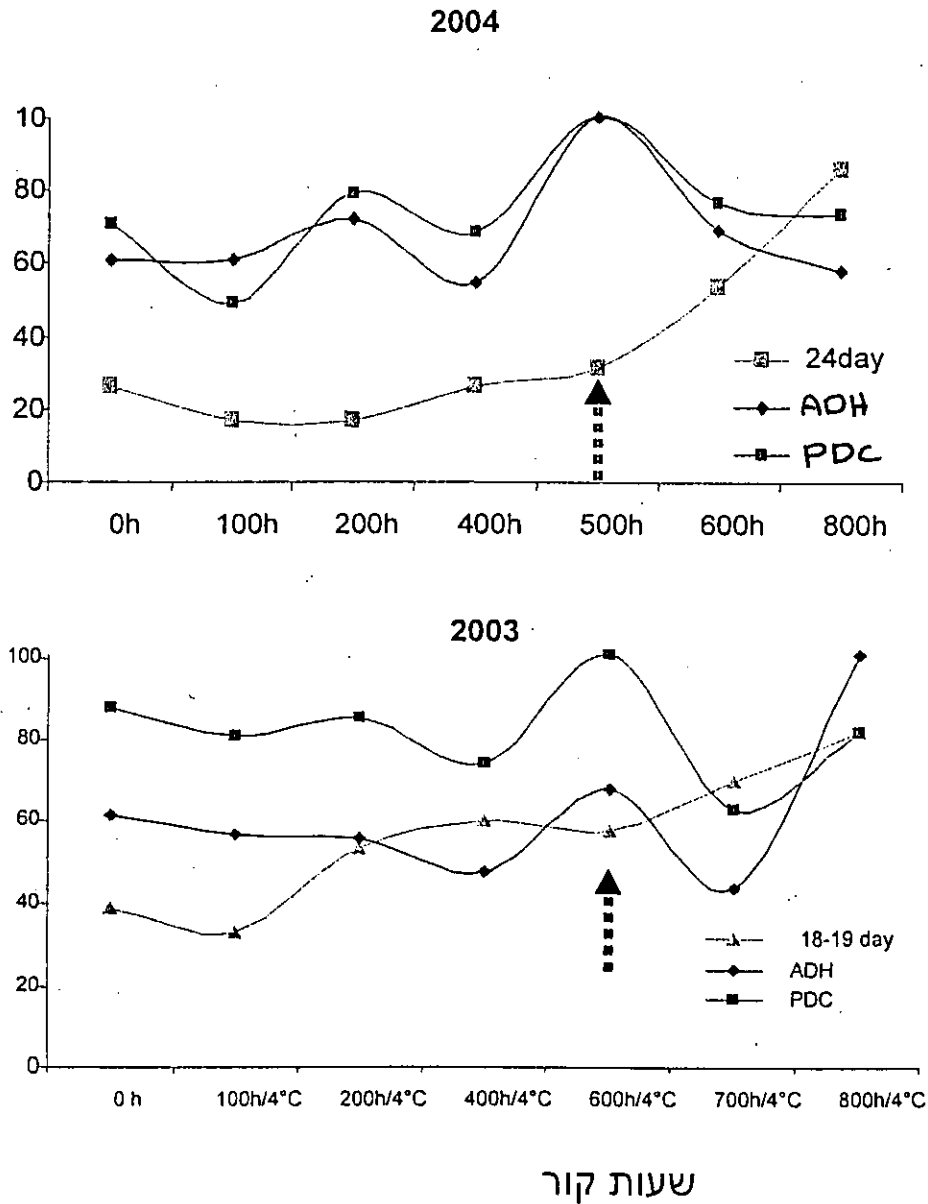
תמונה 6: עקומת תרדמה של פקעי פרלט מכרם במשואה (בקעת הירדן) במהלך הסתיו והחורף (פרוט שיטות בדוחו"ת קודמים).



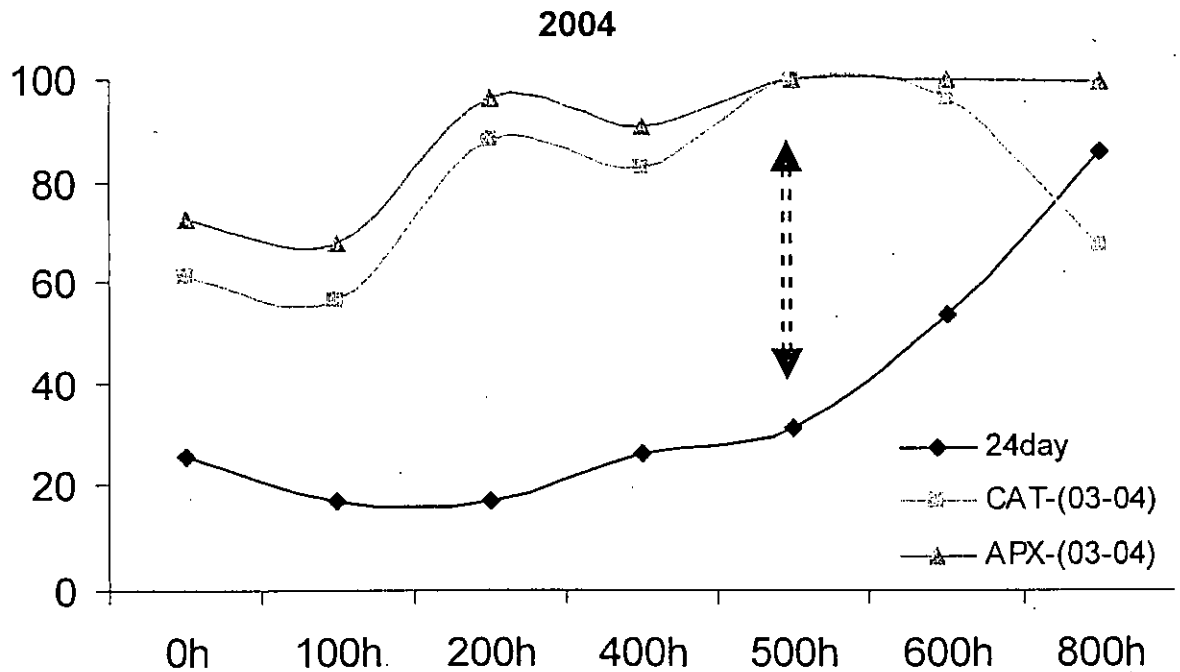
תמונה 7: השפעת טיפול קור מבוקר על שבירת תרדמה של פקעי "פרלט" מכרם בבקעת הירדן



תמונה 8: אנליזת Real Time PCR לדגימות RNA מנקודות הזמן השונות בהן נדגמו פקעים מטיפול קור מבוקר בשתי חזרות ביולוגיות משתי שנות טיפול. האנליזה נעשתה תוך שימוש בפריימרים מתוך אזור שמור ברצפי גנים המקדדים לאלכוהול דהידרוגנאז (ADH) ופירובט דקרבוקסילאז (PDC) ששובטו מגפן ופריימרים מאזור שמור ברצף גן המקדד ל-18s ribosomal RNA ששובט אף הוא מגפן. שני קווי הגרף העליונים מתארים את הביטוי היחסי של הגן בנקודות הדגימה השונות. הקו התחתון מתאר את דגם ההתעוררות של הפקעים בהשפעת שעות הקור שנצברו עד למועד כל דגימה (%) (התעוררות). החץ מסמן הערכה של נקודת המפנה בהתעוררות הפקעים.



תמונה 9: אנליזת Real Time PCR לדגימות RNA מנקודות הזמן השונות בהן נדגמו פקעים מטיפול קור מבוקר משנת הטיפול השנייה. האנליזה נעשתה תוך שימוש בפריימרים מתוך אזור שמור ברצפי גנים המקדדים קטאלאז (CAT) ואסקורבט פראוקסידאז (APX) ששובטו מגפן ופריימרים מאזור שמור ברצף גן המקדד ל-18s ribosomal RNA ששובט אף הוא מגפן. שני קווי הגרף העליונים מתארים את הביטוי היחסי של הגן בנקודות הדגימה השונות. הקו התחתון מתאר את דגם ההתעוררות של הפקעים בהשפעת שעות הקור שנצברו עד למועד כל דגימה (% התעוררות). החץ מסמן הערכה של נקודת המפנה בהתעוררות הפקעים.



ג.1. בניית ספריות וסלקציה של קלונים. בשנה הראשונה RNA בודד, בנפרד, מפקעים מטופלים שנאספו בנקודות הזמן השונות כמתואר ב-א.1 וכמויות זהות של RNA מהנקודות השונות אוחדו ושימשו להכנת ספריית cDNA מפקעים מטופלים בוקטור TripleEx2 תוך שימוש בטכנולוגיית SMART של Clontech לקבלת קלונים באורך מקסימלי. ספרייה נוספת הוכנה בצורה דומה מפקעי בקורת. לקבלת אוסף מייצג של קלונים תוך הפחתת החזרות נערכה אמפליפיקציה של מחדרי cDNA, באמצעות פריימרים אוניברסליים, מארבעה סטים של תשעים ושש מושבות מכל ספרייה ונבחרו באקראי שבטים שגדלם מעל 1000 בסיסים. התוצרים אוחדו ושימשו להכנת גלאי מסומן. הגלאי שימש ל- dot blot hybridization כנגד עשרים סטים נוספים בני 96 מושבות ולהמשך אנליזה נבחרו רק שבטים שלא נותנים סיגנל ושגדלם עולה על 700 בסיסים כמו שנקבע באמצעות שילוב PCR, אנליזה של גודל על ג'ל, הכנת dot blot והיברידיזציה. בשיטה זו של סלקציה, שהוכחה כשיטה זולה ונוחה להפחתת ייצוגם של שבטים הנמצאים בספרייה בעותקים רבים, בודדו בשנה הראשונה 2000 שבטים מפקעי הטיפול והבקורת ובשנה השניה בודדו כ- 4300 שבטים נוספים.

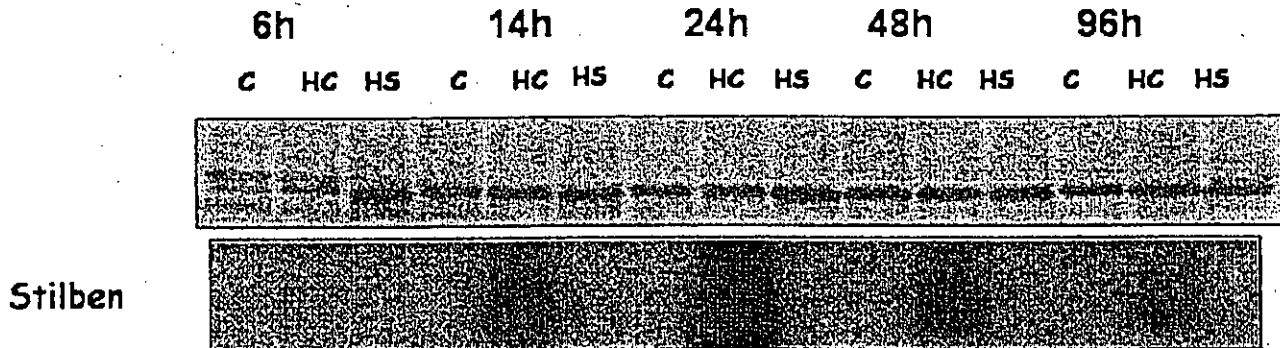
ג.2. פרויקט EST. כל השבטים נשלחו לבדיקת רצף בארה"ב. אנליזה ביואינפורמטית של התוצאות נערכה בשנה השלישית. מן האנליזה עולה כי 6300 שבטים מן הפקע הבוגר ועוד כ- 2000 שבטים מן הפקע הצעיר מייצגים 5515 גנים שונים שמהם רק 2238 רצפים קיימים כבר במאגר הרצפים לגפן ואילו 3279 הינם שבטים המייצגים גנים שלא שובטו קודם לכן מגפן. תוצאה זו היא בבחינת חידוש רב למחקר רקמת הפקע.

ההפרש בין מספר השבטים שרוצפו (8300) ומספר הגנים שהם מייצגים (5500) הינו 2800 וקוא-מייצג תופעה של ריבוי שבטים המייצגים את אותו גן. את התופעה של חזרתיות, שמקורה בביטוי מוגבר של גנים מסויימים בעקבות הטיפול (שהוביל לדגימת יתר שלהם בתהליך הדגימה באקראי), ניתן לנצל על מנת ללמוד על מגמות בהשפעת הטיפול באמצעות redundancy analysis. בתהליך של ספירת מספר השבטים שנדגמו מכל ספרייה (ספריית טיפול מול ספריית ביקורת) נמצאה עדות לביטוי מוגבר של גנים שונים בהשפעת הטיפול (תוצאות לא הובאו מחוסר מקום). לבחינת תקפות ההקשה על שינוי בביטוי על סמך שונות במספר השבטים בשתי הספריות נבחרו מספר גנים לאנליזת Northern ועבור כולם הוכח שינוי בולט בביטוי בין בקורת לטיפול. בין יתר הגנים שרמת ביטויים עולה בהשפעת הטיפול נמצאים גנים נוספים המעידים על קיום עקה חמצונית דוגמת Stilben synthase שהוא אנטיאוקסידנט ייחודי לגפן ו-Thioredoxin שהוא אנזים המעורב במערך התגוננות מעקה חמצונית. (תמונות 10 ו-11). גנים נוספים שביטויים הוגבר באופן דרמטי בהשפעת הטיפול הינם סוכרוז סינתז, polyubiquitin-actin depolymerization factor (תמונה 12). תוצאות אלו הינן ניצנים ראשונים לחידוש הגלום בפרוייקט והן מעידות על מעורבות משק האנרגיה, שלד התא ופרוק מבוקר של חלבונים בבקרת תהליך השחרור מתרדמה ובהוצאתו אל הפועל.

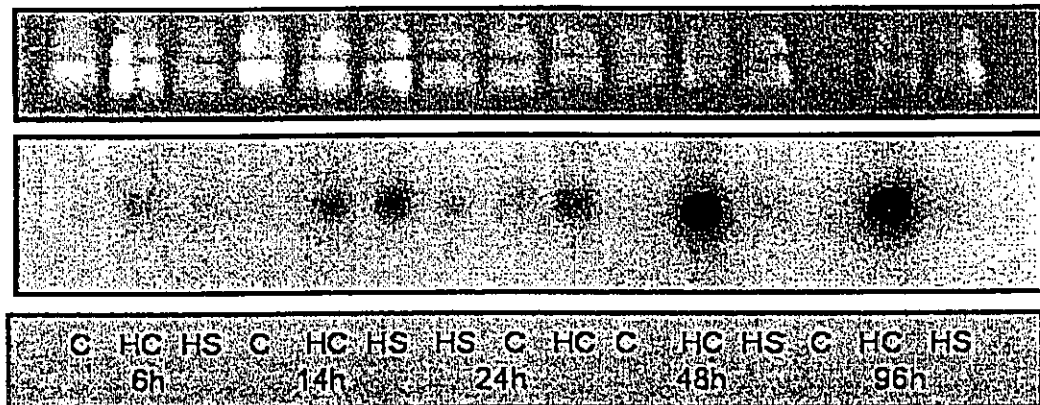
ג.3. היברידיזציות לצ'יפים (Microarray analysis). כל השבטים עברו במהלך השנה השניה אמפליפיקציה של המחדרים ממושבות בודדות (בפורמט של 96 בארות) והמחדרים נשלחו לארה"ב להדפסה של MICROARRAY על גבי שקופיות מצופות באמינו-סילאן באמצעות Gene Machines Omnigridded. תהליך ההדפסה הושלם בראשית השנה השלישית. במסגרת ההערכות לקראת שלב ההיברידיזציות הופק RNA מפקעים שנאספו במועדי הדגימה השונים לאחר שעברו טיפולי חום וציאנמיד ומפקעי ביקורת במהלך השנה הראשונה והשניה. במקביל הופק גם RNA מפקעים מטיפולי קור מבוקרים. כל דגימות ה-RNA עברו אמפליפיקציה והתוצר (aRNA) שימש להכנת גלאים פלורסנטיים. זוגות גלאים בעלי סימון פלורסנטי מבדיל שימשו להיברידיזציות שנערכו במבנה Loop design. גודלו של הנסיון (66 צ'יפים להשוואות חום, ציאנמיד ובקורת) חייב הרכבה של loop עצמאי עבור כל חזרה ביולוגית עם שלוש חזרות טכניות או יותר עבור היברידיזציה של כל גלאי בתוך כל loop. המבנה המורכב של הנסיון מחייב שימוש באנליזות סטטיסטיות שאינן שגרתיות בניתוח תוצאות היברידיזציות ועל כן נמצא עדיין בתהליך של בדיקה ושיפור תוך שיתוף פעולה עם ביואיפומטיקאים מהארץ ומארה"ב. התוצאות הנוכחיות מתבססות על ניתוח שנעשה שימוש בתכנת BAGEL בעזרתו האדיבה של ד"ר אייל סרוסי. ההיברידיזציות לגלאים מטיפולי הקור עדיין לא הושלמו. במבט כולל על דגם הביטוי (תמונה 13) ניתן לראות את עוצמתו הכבירה של הטיפול בציאנמיד על דגם הביטוי של כלל הגנים. גם עקת החום מובילה לשינוי בולט בהשוואה לבקורת אולם הוא אינו אלים כמו זה של הציאנמיד. מועדי השינוי ושיא השינוי בעקבות שתתי העקות תואמים את הממצאים שדווחו עליהם בפרק הראשון קרי שיא השינוי בעקבות עקת חום הוא לאחר 14 שעות ואילו שיא השינוי בעקבות הטיפול בציאנמיד הינו לאחר 24 עד 48 שעות. כבר מתמונה כללית זו ניתן ללמוד על ההבדל בין שוברי התרדמה, על פוטנציאל הפעולה של הציאנמיד מחד ועל פוטנציאל ההרס מאידך, על הזהירות המחוייבת בפרקטיקה ההורטיקולטורית (כך נראה כי אין כל סיבה לריסוס חוזר בציאנמיד וכי יש לשקול הפחתה בריכוז החומר) ועל מתינותה היחסית של עקת החום שמסמנת אותה כטיפול בעל פוטנציאל נזק פחות.

בשלב האנליזה אנו מאתרים שבטים נבחרים שמראים אינדוקציה או רפרסיה מובהקת של רמת הטרנסקריפט בעקבות הטיפול. השוואה למאגרי המידע מאפשרת לנו זיהוי הומולוגיות עם גנים ידועים. עושר הנתונים אינו מאפשר לפרוש את כל הנתונים. כדוגמאות בודדות לגנים שדגם הביטוי שלהם בצ'יפ מצביע על אינדוקציה יובאו הגנים ABC transporter - 1 Glutathione S Transferase שתוצריהם מעורבים בסילוק תוצרי עקה חמצונית ותוצרים רעילים אחרים לווקואולה (נתונים עבור GST בתמונה 14). כדוגמא לגנים שדגם הביטוי שלהם בצ'יפ מצביע על רפרסיה בהשפעת הטיפול יובא הגן המקדד ל-dehydrin (גרפים לא הובאו מחוסר מקום).

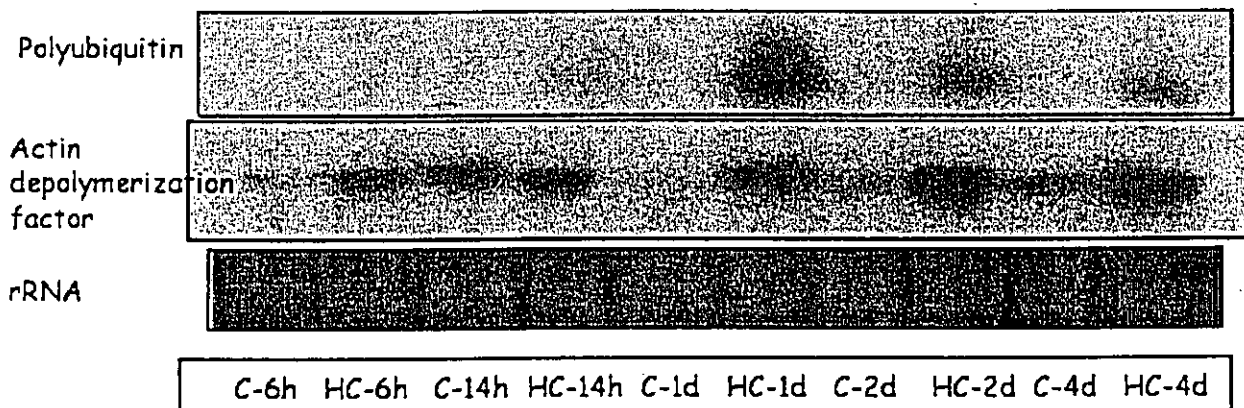
תמונה 10: בחינת תבנית הביטוי מהגן Stilben synthas נערכה לדגימות RNA מנקודות הזמן השונות מטיפול חום (HS), ציאמיד (HC) ובקורת (C) המתאימות השתמשנו בגלאי ששובט על ידינו במסגרת פרוייקט EST



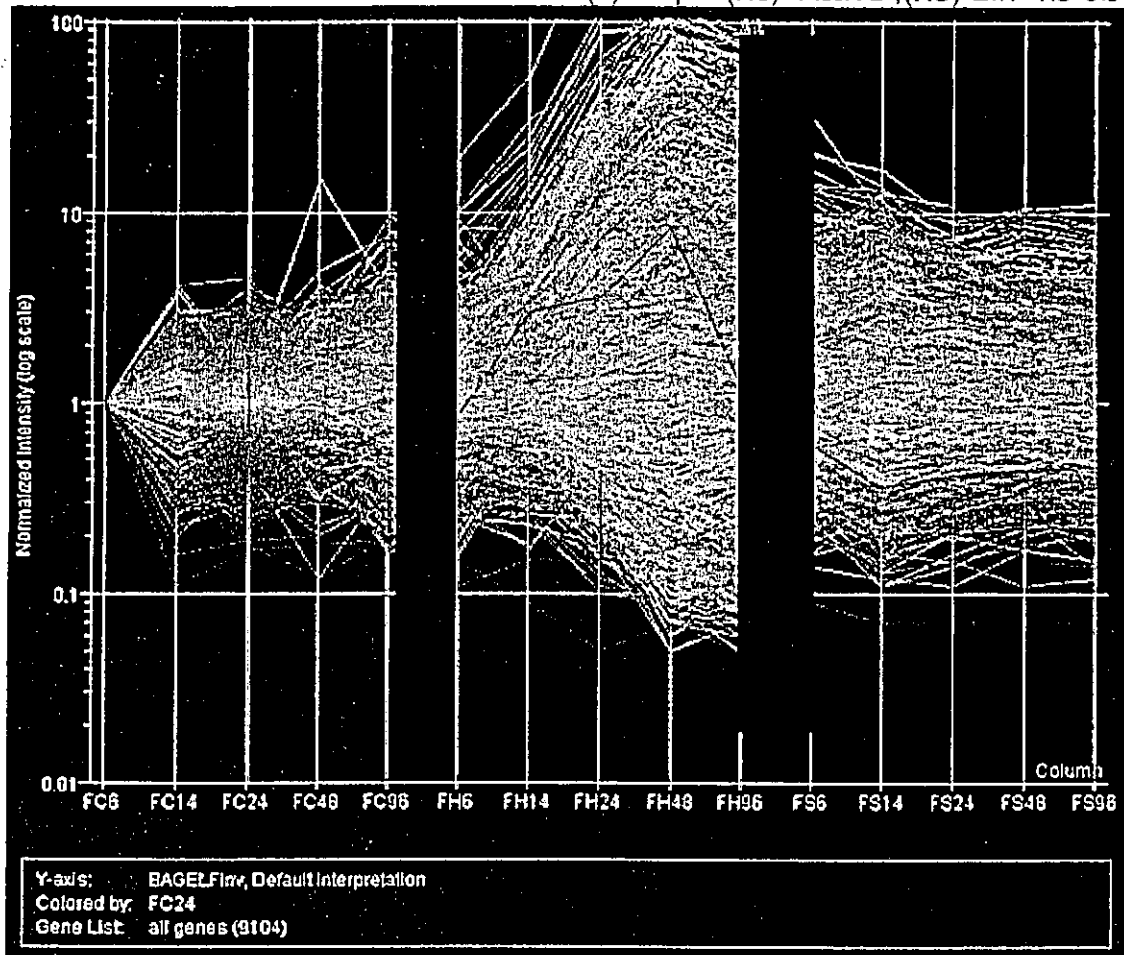
תמונה 11 : בחינת תבנית הביטוי מהגן Thioredoxin H נערכה לדגימות RNA מנקודות הזמן השונות מטיפול חום (HS), ציאמיד (HC) ובקורת (C) המתאימות השתמשנו בגלאי ששובט על ידינו במסגרת פרוייקט EST. בתמונה העליונה מוצג RNA ריבוסומלי ובתחתונה תוצאות ההיברידיזציה לגלאי



תמונה 12: בחינת תבנית הביטוי מהגנים המקודדים ל- polyubiquitin ו- actin polymerization factor נערכה לדגימות RNA מנקודות הזמן השונות מטיפול ציאמיד (HC) ובקורת (C) המתאימות השתמשנו בגלאי ששובט על ידינו במסגרת פרוייקט EST



תמונה 13: אנליזה של דגם הביטוי של כלל הגנים באמצעות cDNA microarray ייחודי לרקמת הפקע בגפן שעבר היברידיזציה לגלאים שסונתזו תוך שימוש בדגימות RNA מנקודות הזמן השונות (6, 14, 24, 48 ו-96 שעות) מטיפול חום (HS), ציאמיד (HC) ובקורת (C).

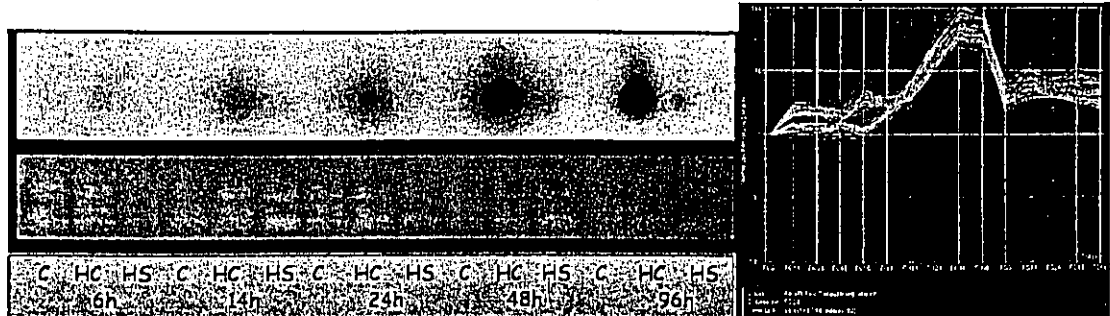


Control

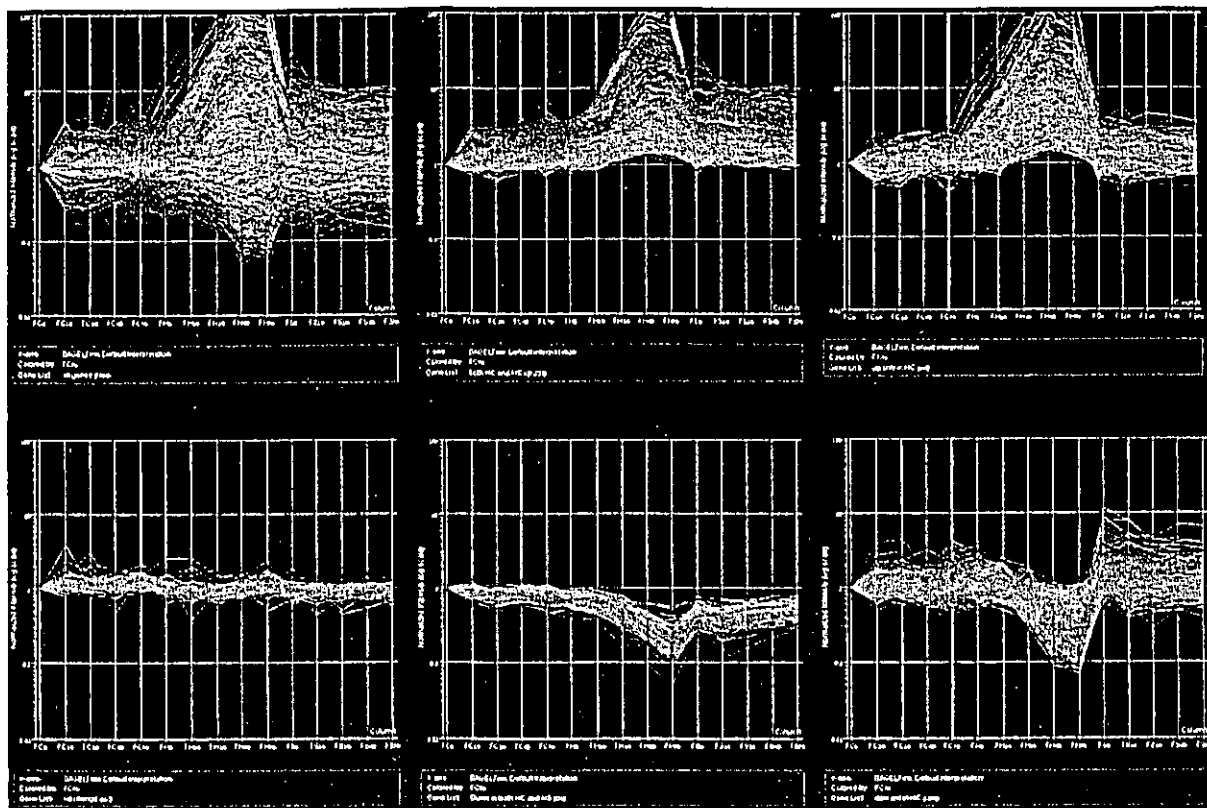
Cyanamide

Heat shock

תמונה 14: דגם הביטוי של קלונים המיצגים את הגן ל-GST ואישור הדגם לאחד מהם ב-Northern



תמונה 15: חלוקה ראשונית גסה של דגם הביטוי של כלל הגנים לצברי גנים בעלי דגם ביטוי משותף. ראה תמונה 13 לפרטי הניסוי



בסוף השנה השלישית התחלנו לבחון שינויים מקבילים בביטויים של גנים שונים באמצעות cluster analysis שדוגמה ראשונית וגסה שלה מובאת בתמונה 15. זיהוי של גנים בעלי פונקציה ידועה בתוך צברים אלו תאפשר לחשוף יחסים בין מסלולים מטבוליים ידועים והמנגנונים האחראים לשחרור מתרדמה.

מסקנות והשלכותיהן על המשך ביצוע המחקר (חלק מהמסקנות בגוף הדו"ח)

התוצאות שהתקבלו מאנליזת ביטוי מפורטת של מספר גנים (GR, APX, CAT, PDC, ADH) לאחר פרקי זמן שונים מטיפול HC וטיפול חום מראות באופן חד וברור כי:

- שני טיפולים שונים לשבירת תרדמה מובילים לאותו סט של שינויים ביוכימיים.
- יש הבדל במועד הופעת השינויים הביוכימיים כאשר טיפול חם הביא לשינויים אלו לפני טיפול בציאנמיד חומצי.
- יש קורלציה בין מועד ההתעוררות למועד הופעת השינויים הביוכימיים שתועדו כך שטיפול חום הביא להתעוררות מוקדמת מזו שהתקבלה בהשפעת ציאנמיד חומצי. קורלציה זו מציעה קשר ענייני בין השינויים הביוכימיים המתוארים למנגנון שבירת התרדמה.
- התוצאות מוכיחות באופן חותך כי שני הטיפולים מובילים ליצירת עקה זמנית המתבטאת בירידה בביטוי של קטאלאז המעורב בפרוק פראוקסידים ובעלייה מקבילה בביטויים של גנים הקשורים בהגנה מפני עקת חמצון ובנשימה אנארובית למשך 24-48 שעות שלאחריהם חלה

עלייה-בביטוי הקטאלאז וירידה מקבילה בביטוי הגנים שעברו אינדוקציה. זמניותה של העקה עשויה להציע כי היא משמשת להעברת סיגנל לשבירת תרדמה.

ה. העלייה בביטויים של אסקורבט פראוקסידאז וגלוטטיון רדוקטאז לאחר השלמת הירידה ברמת הביטוי של הקטאלאז ובשיאה מחזקת באופן משמעותי את ההנחה כי מדובר בעקה חמצונית שתפקידם של שני האחרונים להקטין את נזקה. על פי תוצאות אלו לשני האנזימים האמורים עשוי להיות תפקיד מרכזי בזמניותה של העקה. גם העלייה ברמתם של תיורדוקסין וסטילבן מחזקת הנחה זו.

ו. התוצאות מוכיחות את תקפות האסטרטגיה של איתור שינויים ביוכימיים משותפים ככלי לשיפור היכולת לזהות מרכיבים הכרחיים הנחוצים להתקדמות תהליך השחרור מתרדמה, ללא תלות בסיגנל המשרה את תחילתו של מפל הארועים, ולהפרדתם משינויים אחרים שעשויים להיות קשורים לעקה ספציפית זו או אחרת ואינם קשורים בהכרח לשבירת התרדמה. ההיברידוזיות לצ'יפים שתוצאות ראשוניות שלהן מוצגות בתמונה 15 מדגימות כלי יעיל למימוש אותה אסטרטגיה.

לאור הנסיון שנרכש במעבדה והובא בדיווח בכוונתנו להמשיך לבחון את אפקטיביות טיפול החום כאמצעי מעשי לשבירת תרדמה. כמו כן ננסה לבחון ביתר פירוט אם השינויים שדווחו חלים גם בהשפעת טיפול קור. בנוסף, נשלים כמובן את האנליזות הגנומיות לאיתור שינויים בביטוי גנים בהשפעת טיפול בציאנמיד, חום וקור כמו שתואר בפרק ג. היקף האנליזה ותוצאותיה הוא עצום ואנו מקווים כי יאפשרו לנו לחשוף יחסים בין מסלולים מטבוליים ידועים והמנגנונים האחראים לשחרור מתרדמה. השלכות נוספות של התוצאות ומסקנותיהן על המשך המחקר שולבו בפרק התוצאות.

פרוט מלא של פרסומים. עדיין אין.