

2000-2002

תקופת המחקר:

409-0031-02

קוד מחקר:

**Subject:** DEVELOPMENT OF NEW TREATMENTS TO INHIBIT RAPID OPENING AND SENESCENCE OF CUT FLOWER PETALS BY USING INHIBITORS FOR DE NOVO SYNTHESIS OF PROTEASES

**Principal investigator:** SONIA PHILOSOPH-HADAS

**Cooperative investigator:** ABRAHAM HALEVI, MEIR SHIMON, AMNON LERS, Haya Friedman

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

**שם המחקר:** פיתוח טיפולים חדשים לעיכוב פתיחה והזדקנות מואצת של פרחי קטיף באמצעות חומרים המעכבים סינתזה מחודשת של פרוטאזות

**חוקר ראשי:** סוניה פילוסוף-הדס

**חוקרים שותפים:** אברהם הלוי, שמעון מאיר, אמנון לרס, חיה פרידמן

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

### תקציר

**הצגת הבעיה (חשיבות ומטרות):** הזדקנות המואצת של פרחים לאחר הקטיף ופתיחתם המהירה במהלך האחסון והמשלוח מהוות מגבלה קשה בשיווקם, בעיקר בפרחים שאינם רגישים לאתילן (איריס, זני ורדים מסוימים), שכן מעכבי האתילן אינם יעילים לגביהם. ידוע שתהליך פירוק החלבונים הוא תהליך דומיננטי במהלך הזדקנות פרחים המלווה בעליית פעילות של פרוטאזות. לכן מחקר זה התמקד באפיון תהליכי פירוק אלה ובבחינת יעילותם של מעכבי פרוטאזות ומעכבים של תהליכי תרגום ושעתוק חלבונים, בעיכוב תהליכי ההזדקנות בעלי הכותרת בפרחים קצרי חיים שאינם רגישים לאתילן. בשנה א' אופיינו תהליכי התפתחות וההזדקנות בעלי כותרת של פרחי איריס הארגמן, ונבחנו השינויים (על בסיס משקל טרי) במספר מדדי הזדקנות פיסיולוגיים בפרחי איריס ארגמן ובזני ורדים שונים. מדד דליפת היונים שהקדים את ההזדקנות החזותית, שימש לסריקת מעכבים. בשנה ב' אופיינו שני מדדים פיסיולוגיים נוספים שהקדימו את ההזדקנות (רמת חלבון על בסיס דסקית רקמה ועלייה ב- pH של מוהל התא), ובאמצעותם אותרו מספר מעכבי הזדקנות בפרחי ורדים מזן 'ירד צ'ארס' ובאיריס הארגמן. כן התחלנו באפיון הפרוטאזות המופעלות במהלך ההזדקנות של פרחי איריס הארגמן. מטרות המחקר בשנה השלישית היו: א. המשך בחינת ההשפעות של חומרים מעכבי פרוטאזות והערכת יעילותם בעיכוב תהליכי הזדקנות והארכת משך חיי האגרטל של פרחי איריס הארגמן. ב. המשך אפיון הפרוטאזות המשתתפות בתהליך ההזדקנות של פרחים אלה.

**מהלך ושיטות עבודה:** הניסויים התמקדו בפרחי איריס הארגמן ובמספר זני ורדים ('פריסקו', 'ירד צ'ארס'). בשנה ג' הניסויים התמקדו בפרחי איריס הארגמן (זן הבר וזני היברידי 'זיו' ו'מור'). נמשך אפיון הפרוטאזות בשלבי ההתפתחות וההזדקנות באמצעות גיל פעילות, בהשפעת pH ומעכבים שונים. נבחנו השפעת החומרים שעכבו את הזדקנות הפרח, על פעילות פרוטאזות באמצעות גיל פעילות בתנאים האופטימליים שפותחו. בוצע מעקב אחר הזדקנות הפרח הקטוף השלם בהשוואה להזדקנות של עלי כותרת מנותקים.

**תוצאות עיקריות:** בפרחי ורדים קצרי חיים מזנים 'פריסקו' ו'ירד צ'ארס' אופיינו מספר מדדי הזדקנות שהקדימו את ההזדקנות החזותית (דליפת יונים ועליה ב- pH של מוהל התא), ונמצאו מספר מעכבי סינתזה של חומצות גרעין שעכבו הן את המדדים הנ"ל והן את הזדקנות הפרחים. למרות זאת, לא הצלחנו לאפיין את הפעילות הפרוטאוליטית בורדים בשל בעיות טכניות עם

רקמת עלי הכותרת. בפרחי איריס הארגמן הוגדרו 8 שלבי התפתחות והזדקנות שונים, החל מפקע סגור לגמרי (שלב 2-) ועד לפרח זקן וכמוש (שלב 5). הזדקנות עלי הכותרת לוותה בירידה במשקל הטרי והיבש ותכולת החלבון ובעליה מקבילה בתכולת חומצות אמינו, בשיעור דליפת היונים מהרקמה, וב-pH של מוהל התא. השינויים בתכולת החלבון וב-pH הובחנו כבר בשלב מוקדם מאוד של פקע סגור (1-), והקדימו את השינויים במדדי ההזדקנות החזותיים. הפעילות הפרוטאוליטית בעלי הכותרת של איריס אופיינה בהופעתן של 3 פרוטאזות בטווח משקל מולקולרי של 25-50 KD בגיל הפעילות. פרוטאזות אלה הופיעו כבר בשלבי ההתפתחות המוקדמים מאוד של הפרח (2-, 1-), ופעילותן הוגברה מאוד בשלבי ההזדקנות המאוחרים (3, 4). הפרוטאזות הראו פעילות מקסימאלית ב-pH חומצי (3.5) ובנוכחות DTT, ופעילות זו עוכבה ע"י מעכבי ציסטאין-פרוטאזות או מעכבי ציסטאין וסרין-פרוטאזות. ההשפעה המעכבת של יוני הסידן על פעילות הפרוטאזות לא הייתה עקבית, והיא לא התבטאה ברמת הפרח. המעכב היעיל ביותר באיריס, שעכב את הזדקנות הפרח, את דליפת היונים ואת פעילות הפרוטאזות בגיל היה מעכב סינתזת החלבון, ציקלוקסימיד (CHI). מעכבי פרוטאוליזה אחרים היו פחות יעילים בעיכוב הזדקנות הפרחים, כנראה בשל חוסר קליטה ע"י הפרח הקטוף.

**מסקנות והמלצות:** ההזדקנות המהירה של עלי הכותרת בפרחי איריס אונקוציקלוס היא תהליך אקטיבי, מבוקר, ומתוכנן מראש (PCD), שבו מעורבת סינתזת חלבונים, כולל אנזימים פרוטאוליטיים. הפרוטאזות המעורבות משתייכות בעיקר לקבוצת הציסטאין-פרוטאזות, והן כנראה ממוקמות בוקואולה. ניתן לעכב את תהליך ההזדקנות רק ע"י שימוש במעכב סינתזה של חלבונים (CHI) כאשר הוא ניתן בשלבי ההתפתחות המוקדמים (2-, 0).

#### רשימת קיצורים:

DTT = Dithiothreitol; CHI = Cycloheximide; E-64 = *trans*-Epoxysuccinyl-L-leucine-4-guanidino-butylamide; EDTA = Ethylenediaminetetraacetic acid; PCD = Programmed Cell Death; PMSF = Phenylmethylsulfonyl fluoride.

# דו"ח מסכם לשנת 2002 (שנה שלישית)

לתכנית מחקר מספר 409-0031-02

בנושא:

פיתוח טיפולים חדשים לעיכוב פתיחה והזדקנות מואצת של פרחי קטיף באמצעות חומרים המעכבים סינתזה מחודשת של פרוטאזות

Development of new treatments to inhibit rapid opening and senescence of cut flower petals by using inhibitors of de-novo synthesis of proteases

מוגש:

לקרן המדען הראשי – מ"פ איכות תוצרת חקלאית

מאת:

סוניה פילוסוף-הדס<sup>1</sup>, חיה פרידמן<sup>1</sup>, שמעון מאיר<sup>1</sup>, אמנון לרס<sup>1</sup>, אברהם הלוי<sup>2</sup>, בטינה קוכאנק<sup>1</sup>, אילונה רוט<sup>1</sup>, אידה רוזנברגר<sup>1</sup>

Sonia Philosoph-Hadas<sup>1</sup>, Haya Friedman<sup>1</sup>, Shimon Meir<sup>1</sup>, Amnon Lers<sup>1</sup>, Abraham H. Halevy<sup>2</sup>, Betina Kochanek<sup>1</sup>, Ilona Rot<sup>1</sup>, and Ida Rosenberger<sup>1</sup>

<sup>1</sup>המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר הקטיף, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני, בית דגן, <sup>2</sup>מרכז קנז-לי להורטיקולטורה, הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית, רחובות

<sup>1</sup>Dept. of Postharvest Science of Fresh Produce, ARO, The Volcani Center, Bet-Dagan; <sup>2</sup>The Kennedy-Leigh Centre of Horticulture Research, Faculty of Agriculture, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot

E-mail: vtsoniap@volcani.agri.gov.il

הנני מאשרת שהממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים.

חתימת החוקרת

אפריל 2003

מרכז וולקני, בית-דגן

## א. תקציר

**הצגת הבעיה (חשיבות ומטרות):** הזדקנותם המואצת של פרחים לאחר הקטיף ופתיחתם המהירה במהלך האחסון והמשלוח מהוות מגבלה קשה בשיווקם, בעיקר בפרחים שאינם רגישים לאתילן (איריס, זני ורדים מסוימים), שכן מעכבי האתילן אינם יעילים לגביהם. ידוע שתהליך פירוק החלבונים הוא תהליך דומיננטי במהלך הזדקנות פרחים המלווה בעלית פעילות של פרוטאזות. לכן מחקר זה התמקד באפיון תהליכי פירוק אלה ובבחינת יעילותם של מעכבי פרוטאזות ומעכבים של תהליכי תרגום ושעתוק חלבונים, בעיכוב תהליכי ההזדקנות בעלי הכותרת בפרחים קצרי חיים שאינם רגישים לאתילן. בשנה א' אופיינו תהליכי התפתחות והזדקנות בעלי כותרת של פרחי איריס הארגמן, ונבחנו השינויים (על בסיס משקל טרי) במספר מדדי הזדקנות פיסיולוגיים בפרחי איריס ארגמן ובזני וורדים שונים. מדד דליפת היונים שהקדים את ההזדקנות החזותית, שימש לסריקת מעכבים. בשנה ב' אופיינו שני מדדים פיסיולוגיים נוספים שהקדימו את ההזדקנות (רמת חלבון על בסיס דיסקית רקמה ועלייה ב- pH של מוהל התא), ובאמצעותם אותרו מספר מעכבי הזדקנות בפרחי ורדים מזן 'רד צ'ארם' ובאיריס הארגמן. כן התחלנו באפיון הפרוטאזות המופעלות במהלך ההזדקנות של פרחי איריס הארגמן. מטרות המחקר בשנה השלישית היו: א. המשך בחינת ההשפעות של חומרים מעכבי פרוטאזות והערכת יעילותם בעיכוב תהליכי הזדקנות והארכת משך חיי האגרטל של פרחי איריס הארגמן. ב. המשך אפיון הפרוטאזות המשתתפות בתהליך ההזדקנות של פרחים אלה. מהלך ושיטות עבודה: הניסויים התמקדו בפרחי איריס הארגמן ובמספר זני ורדים ('פריסקו', 'רד צ'ארם'). בשנה ג' הניסויים התמקדו בפרחי איריס הארגמן (זן הבר זוגי היברידי 'זיו' ו'מור'). נמשך אפיון הפרוטאזות בשלבי ההתפתחות וההזדקנות באמצעות ג'ל פעילות, בהשפעת pH ומעכבים שונים. נבחנה השפעת החומרים שעכבו את הזדקנות הפרח, על פעילות פרוטאזות באמצעות ג'ל פעילות בתנאים האופטימליים שפותחו. בוצע מעקב אחר הזדקנות הפרח הקטוף השלם בהשוואה להזדקנות של עלי כותרת מנותקים.

**תוצאות עיקריות:** בפרחי ורדים קצרי חיים מזנים 'פריסקו' ו'רד צ'ארם' אופיינו מספר מדדי הזדקנות שהקדימו את ההזדקנות החזותית (דליפת יונים ועליה ב- pH של מוהל התא), ונמצאו מספר מעכבי סינתזה של חומצות גרעין שעכבו הן את המדדים הנ"ל והן את הזדקנות הפרחים. למרות זאת, לא הצלחנו לאפיין את הפעילות הפרוטאוליטית בורדים בשל בעיות טכניות עם רקמת עלי הכותרת. בפרחי איריס הארגמן הוגדרו 8 שלבי התפתחות והזדקנות שונים, החל מפקע סגור לגמרי (שלב 2-) ועד לפרח זקן וכמוש (שלב 5). הזדקנות עלי הכותרת לוותה בירידה במשקל הטרי והיבש ותכולת החלבון ובעליה מקבילה בתכולת חומצות אמינו, בשיעור דליפת היונים מהרקמה, וב- pH של מוהל התא. השינויים בתכולת החלבון וב- pH הובחנו כבר בשלב מוקדם מאוד של פקע סגור (1-), והקדימו את השינויים במדדי ההזדקנות החזותיים. הפעילות הפרוטאוליטית בעלי הכותרת של איריס אופיינה בהופעתן של 3 פרוטאזות בטווח משקל מולקולרי של 25-50 KD בג'ל הפעילות. פרוטאזות אלה הופיעו כבר בשלבי ההתפתחות המוקדמים מאוד של הפרח (2-, 1-), ופעילותן הוגברה מאוד בשלבי ההזדקנות המאוחרים (3, 4). הפרוטאזות הראו פעילות מקסימאלית ב- pH חומצי (3.5) ובנוכחות DTT, ופעילות זו עוכבה ע"י מעכבי ציסטאין-פרוטאזות או מעכבי ציסטאין וסרין-פרוטאזות. ההשפעה המעכבת של יוני הסידן על פעילות הפרוטאזות לא הייתה עקבית, והיא לא התבטאה ברמת הפרח. המעכב היעיל ביותר באיריס, שעכב את הזדקנות הפרח, את דליפת היונים ואת פעילות הפרוטאזות בג'ל היה מעכב סינתזת החלבון, ציקלוקסימיד (CHI). מעכבי פרוטאוליזה אחרים היו פחות יעילים בעיכוב הזדקנות הפרחים, כנראה בשל חוסר קליטה ע"י הפרח הקטוף.

**מסקנות והמלצות:** ההזדקנות המהירה של עלי הכותרת בפרחי איריס אונקוציקלוס היא תהליך אקטיבי, מבוקר, ומתוכנת מראש (PCD), שבו מעורבת סינתזת חלבונים, כולל אנזימים פרוטאוליטיים. הפרוטאזות המעורבות משתייכות בעיקר לקבוצת הציסטאין-פרוטאזות, והן כנראה ממוקמות בוקואולה. ניתן לעכב את תהליך ההזדקנות רק ע"י שימוש במעכב סינתזה של חלבונים (CHI) כאשר הוא ניתן בשלבי ההתפתחות המוקדמים (2-, 0).

רשימת קיצורים:

DTT = Dithiothreitol; CHI = Cycloheximide; E-64 = *trans*-Epoxysuccinyl-L-leucine-4-guanidino-butylamide; EDTA = Ethylenediaminetetraacetic acid; PCD = Programmed Cell Death; PMSF = Phenylmethylsulfonyl fluoride.

ב. מבוא, רקע מדעי קצר ומטרות המחקר לתקופת הד"ח:

פתיחתם המהירה של פרחים לאחר הקטיף ו/או הזדקנותם המואצת במהלך האחסון והמשלוח מהווה מגבלה קשה בשיווקם, שכן תהליכים אלה גורמים לקיצור משך המכירה שלהם. התופעה חמורה בעיקר בשיווק של מיני פרחים שהזדקנותם אינה מבוקרת ע"י לאתילן, שכן במקרים אלה מעכבי האתילן אינם יעילים בדחיית ההזדקנות, ולכן אין בידנו כלים לעיכוב התפתחותם והזדקנותם.

הזדקנות עלי כותרת היא תהליך טבעי שנועד למחזר את חומרי המזון ולהעבירם לפרי ולזרע המתפתת. תהליכי ההזדקנות בפרחים מאופיינים בהופעת שינויים מבניים בממברנות ובקיומם של תהליכים קטבוליים כמו: פירוק של פיגמנטים, חלבונים, פוספוליפידים וחומצות גרעין. בשנים האחרונות רוחת ההשערה שפעילות פרוטאוליטית במערכות שונות קשורה לתמותת תאים מבוקרת (PCD). אחד המאפיינים של תהליך ה-PCD במערכות אנימליות הוא עליה ברמת הציסטאין-פרוטאזות הקרויות Caspases האחראיות לפירוק החלבונים המתקיים בתהליך זה. גם בצמחים נמצא שתהליך פירוק החלבונים הוא תהליך דומיננטי במהלך ההזדקנות. בפרחים הצטברו עדויות המלמדות על כך שהזדקנות עלי הכותרת מתבצעת באמצעות תמותה מבוקרת של תאים, שלוותה בעליה של סרין, ציסטאין ומטלו-אנדופרוטאזות. במקביל, במספר פרחים נמצא שניתן לעכב הזדקנות על ידי מעכבי ביוסינתזה של חלבונים. לפיכך העלנו את ההשערה שסינתזה של פרוטאזות או של חלבונים המגבירים פעילות פרוטאוליטית, משתתפת באופן ישיר או באופן עקיף בשרשרת אירועים המובילים להזדקנות עלי הכותרת. כדי לבחון השערה זו וללמוד את תהליכי ההזדקנות בפרחים קצרי חיים בוצעו ניסויים בשלושה כיוונים עיקריים: 1) הגדרת מדד פיסיולוגי מתאים המקדים בצורה משמעותית את ההזדקנות החזותית של עלי הכותרת, כדי שישמש בהמשך המחקר לסריקת יעילותם של מעכבי פרוטאזות בדחיית הזדקנות הפרח השלם. המעקב אחר מדדי ההזדקנות בוצע בפרח קטוף שלם ובעלי כותרת מנותקים כדי להשוות את קצבי ההזדקנות שלהם. 2) בחינת מעורבותן של פרוטאזות בשלבים הראשונים של תהליך ההזדקנות בעלי הכותרת ואפיון הפרוטאזות המשתתפות בתהליך בפרחים קצרי חיים. 3) בחינת ההשפעה של מעכבים שונים על סינתזה ופעילות של הפרוטאזות ועל תהליך ההזדקנות כדי למצוא מתאם בין שני גורמים אלה. מעכבים מבטיחים שהראו השפעה חיובית על מדד ההזדקנות שנבחר לצורך הסריקה, נבחנו בהמשך בעיכוב הזדקנות הפרח השלם, וכן נבחנה השפעתם גם על עיכוב העלייה בפעילות הפרוטאזות שאופיינו.

שנת המחקר הראשונה התמקדה בבחירת המודל הצמחי המתאים ביותר. מאחר ולא נמצאו זני גרברה קצרי חיים המתאימים לעבודה הנוכחית, התמקד המשך המחקר בפרחי איריס הארגמן ובורדים מזנים 'פריסקו' ו'רד צ'ארם', בשל היותם קצרי חיים. בשנה זו אופיינו תהליכי ההתפתחות וההזדקנות בעלי כותרת של פרחי איריס הארגמן, ונבחנו השינויים (על בסיס המשקל הטרי של הרקמה) במספר מדדי הזדקנות פיסיולוגיים בפרחי איריס ארגמן ובזני וורדים שונים. המדד שהקדים את ההזדקנות החזותית (בפרחי וורדים) או היה במתאם חיובי איתה (בפרחי איריס) היה מדד דליפת היונים. בשנת המחקר השנייה הניסויים התמקדו בפרחי איריס הארגמן ובורדים מזן 'רד צ'ארם' שנמצא כמתאים יותר מבין זני הורדים שנבחנו. אופיינו שני מדדים פיסיולוגיים נוספים שהקדימו את ההזדקנות (רמת חלבונים על בסיס דיסקית רקמה ועלייה ב-pH של מוהל התא). נבחנה השפעת מעכבים שונים על המדדים הפיסיולוגיים הנ"ל ועל משך חיי האגרטל, ואופיינה הפעילות הפרוטאוליטית במהלך

ההזדקנות של פרחי איריס הארגמן באמצעות ג'ל פעילות ומעכבים שונים. פעילות פרוטאוליטית גבוהה, שהתבטאה בהופעת פרוטאזות עוד בשלבי התפתחות הפרח, נמצאה בעלי כותרת של איריס הארגמן. פעילות זו הוגברה מאוד ע"י DTT ועוכבה ע"י מעכב הפרוטאוליזה PMSF, הכילטור EDTA ויוני סידן.

המטרות הספציפיות לשנת המחקר השלישית היו: (1) המשך בחינת ההשפעות של חומרים מעכבי פרוטאזות והערכת יעילותם בעיכוב תהליכי הזדקנות והארכת משך חיי האגרטל של פרחי איריס הארגמן. (2) המשך אפיון הפרוטאזות המשתתפות בתהליך ההזדקנות של פרחים אלה.

## ג. פירוס הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו לתקופת הד"ח:

### 1. סיכום הניסויים בשנה א'

בשנת המחקר הראשונה נבחן משך חיי האגרטל של זן אחד של גרברה, איריס הארגמן ו-4 זני ורדים. ורדים מזן 'פריסקו' (8 ימי אגרטל) ואיריס הארגמן (4 ימי אגרטל), נמצאו כמתאימים לביצוע המחקר, אך לא נמצאו זני גרברה קצרי חיים המתאימים לעבודה הנוכחית. במקביל, אופיינו באיריס הארגמן ובזני הורדים מספר מדדים פיסיוולוגיים במהלך ההתפתחות וההזדקנות של עלי הכותרת: דליפת יונים מעלים מנותקים, משקל טרי ויבש, רמת חלבונים וחומצות אמינו, שנקבעו על בסיס המשקל הטרי של הרקמה. מבין כל המדדים שנבחנו, מדד דליפת היונים מעלי כותרת מנותקים נמצא כמדד יעיל ומתאים לבחינת יעילותם של מעכבים שונים במבחנה *in vitro* מאחר והוא משקף את תהליך ההזדקנות על הפרח. לכן, מדד זה נועד לשמש בהמשך המחקר לסריקת יעילותם של מספר גדול של חומרים המעכבים תהליכי סינתזת חלבונים או מעכבי פרוטאזות בדחיית הזדקנות הפרח השלם. לאור התוצאות, המשך המחקר התמקד בפרחי איריס הארגמן ובורדים מזן 'פריסקו', הן בשל היותם קצרי חיים והן בשל ההקבלה שנמצאה בהם לגבי השינויים במדד דליפת היונים מעלי כותרת המזדקנים על הפרח או במבחנה. בפרחי איריס מדד דליפת היונים עלה במקביל לתהליך ההזדקנות, בעוד שבורדים מזן 'פריסקו' מדד דליפת היונים הקדים את ההזדקנות החזותית. יחד עם זאת, נותר הצורך לבחון מדדי הזדקנות נוספים שיקדימו בצורה משמעותית את ההזדקנות החזותית ויהיו קלים למדידה, ולשם כך נבחנו גם ורדים מזן 'רד צ'ארס'.

### 2. סיכום הניסויים בשנה ב'

בשנת המחקר השנייה הניסויים התמקדו בפרחי איריס הארגמן ובורדים מזן 'רד צ'ארס'. אופיינו שני מדדים פיסיוולוגיים נוספים שהקדימו את ההזדקנות (רמת חלבונים על בסיס דיסקית רקמה ועלייה ב- pH של מוהל התא). נבחנה השפעת מעכבי סינתזת חומצות גרעין על המדדים הפיסיוולוגיים הנ"ל ועל משך חיי האגרטל, ואופיינו הפרוטאזות במהלך ההזדקנות של פרחי איריס הארגמן באמצעות ג'ל פעילות ומעכבים שונים. מדד העלייה ב- pH של מוהל התא שהקדים את ההזדקנות החזותית בורדים ובאיריס, נמצא כמתאים ביותר לצורך המשך סריקת יעילותם של חומרים דוחי הזדקנות. מעכבי סינתזת חומצות גרעין (סולפנילאמידים) עכבו בצורה משמעותית את העלייה ב- pH ואת ההזדקנות של פרחי ורדים מזן 'רד צ'ארס'. פעילות פרוטאוליטית גבוהה, שהתבטאה בהופעת פרוטאזות עוד בשלבי התפתחות הפרח, נמצאה בעלי כותרת של איריס הארגמן. פעילות זו הוגברה מאוד ע"י DTT ועוכבה בנוכחות מעכב הפרוטאוליזה PMSF, הכילטור EDTA ויוני סידן. בהיותם חומר לא רעיל, יוני סידן עשויים אולי לשמש בהמשך כאמצעי יעיל וזול לעיכוב ההזדקנות של הפרח השלם. מהתוצאות שהצטברו בשנתיים הראשונות נראה שתהליך ההזדקנות של עלי הכותרת הוא תהליך אקטיבי ומבוקר, והעלייה בפרוטאזות נמצאת כנראה במתאם חיובי עם תהליך תמותת התאים המבוקרת.

### 3.3. סיכום הניסויים בשנה ג'

#### 1.3.1. בחינת ההשפעות של חומרים מעכבי פרוטאזות ופעילות פרוטאוליטית והערכת יעילותם

##### בעיכוב תהליכי הזדקנות והארכת משך חיי האגרסל של פרחי איריס הארגמן

כל הניסיונות לאפיין את הפעילות הפרוטאוליטית בעלי הכותרת של וורדים נכשלו כיון שאי אפשר היה להגיע למיצוי חלבון פעיל מרקמה זו, ולכן בשנת המחקר השלישית הוחלט להתמקד רק במערכת המודל של פרחי איריס אונקוציקלוס. נבחנו שני זנים, איריס הארגמן וזן היברידי שלו 'זיר'. בנוסף, לא נמצאה השפעה מעכבת ליוני הסידן ברמת הפרת הקטוף השלם, הן בורדים (תוצאות לא מובאות) והן באיריס הארגמן (ראה איור 1), וגם ההשפעה המעכבת על הפרוטאזות ברמת ג'ל הפעילות שנמצאה בשנה הקודמת, לא הייתה עקבית. לכן לא המשכנו לבצע ניסויים בכיוון זה.

בחיפוש אחר מעכבים יעילים של תהליך ההזדקנות בפרחי איריס הארגמן, בצענו סריקה מקיפה של חומרים שונים שניתן לסווגם עפ"י קבוצות מעכבים שונות כמפורט להלן: מעכבי אפופטוזיס (PCD), מעכבי סינתזת RNA, מעכבי מטבוליזם של חומצה פולית (הדרושה לסינתזה של חומצות גרעין), מעכבי סינתזת חלבונים, מעכבי סינתזה של חומצות אמינו, מעכבי פרוטאזות כלליים, מעכבי מטלו-פרוטאזות, מעכבי סריץ-פרוטאזות, מעכבי ציסטאין-פרוטאזות, מעכבי הפרוטאזום, מעכבי אמינו-פפטידאזות, מעכבי אספרטיק-פרוטאזות, וכן חומרים אחרים שאינם משתייכים לקבוצות הנ"ל. השפעת החומרים נבחנה תחילה על מדד דליפת היונים מעלי כותרת מנותקים, כמדד שנמצא בשנת המחקר הראשונה כמקדים את ההזדקנות החזותית. בנוסף, נבחנה השפעת החומרים על הזדקנות פרחים בעלי גבעול קצר (15 ס"מ) או ארוך (50 ס"מ) לאחר יישומם בהגמעה למשך 20 שעות. החומרים נבחנו בפרחים בעלי גבעול קצר או ארוך כדי לנטרל את האפשרות שהעדר השפעתם אולי נובע מחוסר קליטתם ע"י הפרח עקב בעיית הובלה.

בטבלה 1 בנספח מובא סיכום התוצאות מ-3 שנות המחקר, לגבי סריקת יעילות המעכבים השונים בעיכוב הזדקנות פרחי איריס אונקוציקלוס ובעיכוב מדד דליפת היונים. כל החומרים ניתנו לפרחי איריס הארגמן בשלב התפתחות 2- (ראה איור A בנספח); ומדד המוליכות נבחן בעלי כותרת מסוג L2 (ראה איור B בנספח), אלא אם כן צוין אחרת. בטבלה הובלטו באדום ריכוזי החומרים ששיפרו בצורה משמעותית את המדד ביחס לביקורת (++ או +++), כלומר, החומרים שערכו ביעילות את ההזדקנות. ניתן לראות שמרבית החומרים היעילים עכבו רק את אחד מהמדדים הנ"ל, פרט לציקלוהקסימיד (CHI), שערכב בצורה משמעותית הן את מדד דליפת היונים מעלי הכותרת והן את הזדקנות הפרחים הקצרים והארוכים (טבלה 1 בנספח). תוצאה זו מצביעה על יעילותו הרבה במערכת פרחי האיריס. מבין שאר החומרים שגרמו לעיכוב יעיל ניתן לציין את הקבוצות הבאות: מעכב הסריץ וציסטאין-פרוטאזות PMSF שערכב הזדקנות בפרחים קצרים ביום 4; מעכב ה-PCD דיסולפירם שערכב הזדקנות בפרחים קצרים ביום 3; מעכבי סינתזת RNA שערכו הזדקנות בפרחים קצרים ביום 4; מעכבי מטבוליזם של חומצה פולית: אמינופטרין, שערכב הזדקנות בפרחים קצרים במשך 4 ימים, וסולפאצטאמיד שערכב הזדקנות של פרחים ארוכים רק ביום 1; מעכבי סינתזה של חומצות אמינו - כלורוסולפרון, אימופיר וטריאסולפרון, שערכו דליפת יונים; מעכבי פרוטאזות כלליים ומעכבי הפרוטאזום שערכו הזדקנות בפרחים קצרים ביום 1; וכן מתאנול ואתאנול שערכו הזדקנות פרחים קצרים ביום 3 או בימים 1, 2 ו-4, בהתאמה (טבלה 1). מאחר ומרבית המעכבים שגרמו לעיכוב משמעותי בהזדקנות היו יעילים רק בפרחים בעלי גבעול קצר, ניתן אולי לייחס חלק מחוסר ההשפעה של חומרים אחרים לאורך הגבעול או להעדר קליטה נאותה ע"י הרקמה. מהתוצאות שבטבלה 1 ניתן להסיק שיש קשר בין סינתזה של חלבונים חדשים (כנראה פרוטאזות מסוגים שונים) לבין הזדקנות עלי הכותרת.

המשך העבודה התמקד בעיקר במעכב סינתזת החלבונים CHI, ובמספר מעכבים יעילים נוספים. השפעת החומרים נבחנה על קצב ההתפתחות וההזדקנות של פרחי איריס הארגמן במהלך חיי אגרסל. הפרחים הובאו

מגדעון להן ברשפון. מהתוצאות המסוכמות באיורים 1, 2 ניתן לראות שככל ש-CHI ניתן בשלב התפתחות מוקדם יותר (שלב 2- לעומת שלב 0) יעילות העיכוב שלו הייתה גבוהה יותר (איור 1A). שאר החומרים שנבחנו (מעכבי מטבוליזם של חומצה פולית ויוני סידן) לא עכבו את קצב ההתפתחות או ההזדקנות (איור 1A), פרט למעכב אמינופטרין ולמעכב סינתזת החלבון הנוסף, פורומיצין (איור 1B). גם אתאנול, ששימש כממס למספר מעכבים, עיכב את קצב ההזדקנות במידה מסוימת (איור 1B). שימוש בריכוז גבוה יותר של CHI ( $75 \mu\text{M}$ ) עיכב במידה דומה את פתיחת הפרחים והזדקנותם בהשוואה לסולפאצטאמיד (איור 2A), הן בפרחים ארוכים (איור 2B) והן בפרחים קצרים (איור 2C). נראה לכן שמעכבי סינתזה של חלבונים (CHI ופורומיצין), עיכבו ביעילות את תהליכי ההזדקנות, כנראה ע"י עיכוב פרוטאזות.

כדי לבחון את המועד האופטימלי למתן CHI מבחינת שלבי התפתחות וההזדקנות, המעכב ניתן בצורה מתמשכת בתמיסת האגרסל לפרחי איריס היברידי 'זיו' בשלבים שונים של התפתחות (שהוגדרו באיור A בנספח). הפרחים הובאו מדוד שחק במושב טירת צבי והודגרו ב-3 ריכוזי CHI כדי לבחון מהו הריכוז האופטימלי בתנאים אלה. מהתוצאות המובאות באיור 3 ניתן לראות ש-CHI בריכוז של  $20 \mu\text{M}$  היה היעיל ביותר בעיכוב הזדקנות הפרחים בשני שלבי ההתפתחות שנבחנו (שלב 0 ו-1), ולכן ריכוז זה שימש בהמשך. בניסוי נוסף ניתן ה-CHI בריכוז הנ"ל לפרחים קצרים ב-4 שלבי התפתחות שונים, 0, 1 ו-2. מהתוצאות המסוכמות באיור 4 ניתן לראות שה-CHI עיכב את פתיחת הפרחים ללא תלות בשלב ההתפתחות בו הוא ניתן. לעומת זאת, רק כאשר ה-CHI ניתן בשלבי ההתפתחות המוקדמים, 2- (איור 4A) או 0 (איור 4B), הוא עיכב בצורה משמעותית גם את ההזדקנות. ניתן להסיק מתוצאות אלה שרק עיכוב של סינתזת חלבונים בשלבי ההתפתחות המוקדמים יעיל בהשפעה על עיכוב ההזדקנות. כן יתכן שגם סינתזת הפרוטאזות מעוכבת, דבר התורם לעיכוב פעילותן המוגברת בהזדקנות.

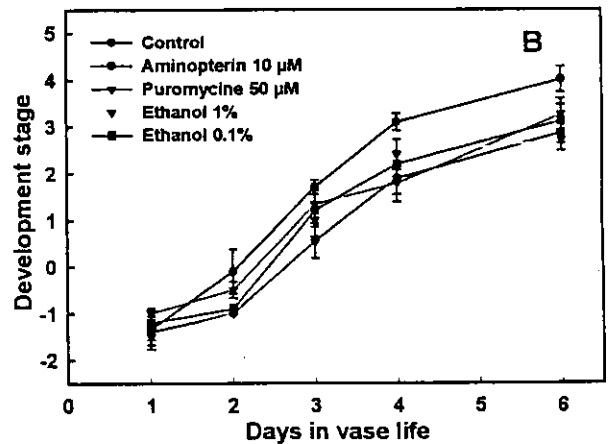
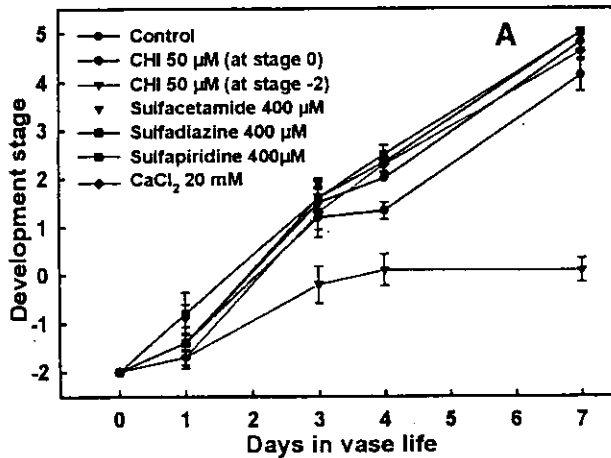
### 2.3.2. אפיון תהליכי ההזדקנות בעלי הכותרת של פרחי איריס הארגמן כמערכת של PCD

התוצאות שהובאו באיור 4 מרמזות שתהליך ההזדקנות של עלי הכותרת בפרחי איריס הארגמן הוא כנראה תהליך מתוכנן מראש שניתן לעכבו רק אם המעכב נוכח בשלב התפתחות מספיק מוקדם ברקמה. כדי לאשר ממצאים אלה, בחנו הזדקנות של פרחי איריס קצרים בהשוואה להזדקנות של עלי כותרת מנותקים שהודגרו במקביל, עם וללא נוכחות של CHI בתמיסת ההדגרה. הודגרו פרח קצר אחד ו-3 עלי כותרת מנותקים שנלקחו מפרחים בכל אחד משלבי ההתפתחות שצויינו (איור 5A). מופע הפרחים ועלי הכותרת לאחר 3 ו-6 ימי הדגרה מובא באיורים 5B ו-5D, בהתאמה. ניתן לראות בבירור, שקצב ההזדקנות בעלי הכותרת המנותקים זהה לזה של עלי הכותרת בפרחים השלמים בארבעת שלבי ההתפתחות וההזדקנות שנבחנו, בשני מועדי הבדיקה. כלומר: עלי כותרת מנותקים משלבים 0, 1 ו-2, כמשו לגמרי ביום 6 בדומה לעלי הכותרת של הפרח השלם (איור 5D). גם קצב ההזדקנות בנוכחות CHI של הפרחים ועלי הכותרת היה דומה: לאחר 3 או 6 ימים CHI שניתן בשלב 2- עיכב את ההזדקנות בשתי המערכות (איורים 5C, 5E). נראה לכן שהזדקנות עלי הכותרת של פרחי איריס הארגמן היא אוטונומית לחלוטין, נובעת מסיגנלים שמקורם בעלה עצמו, וכנראה מהווה מערכת של PCD.

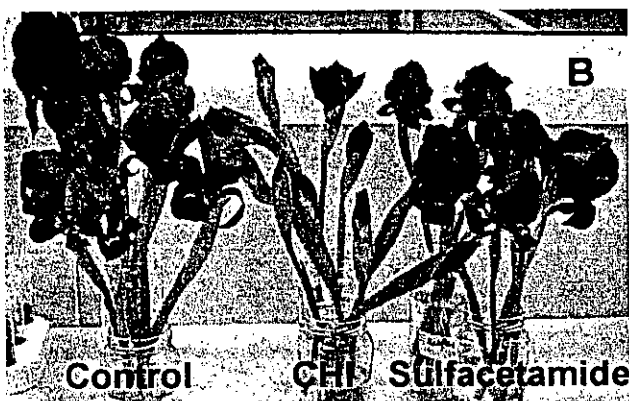
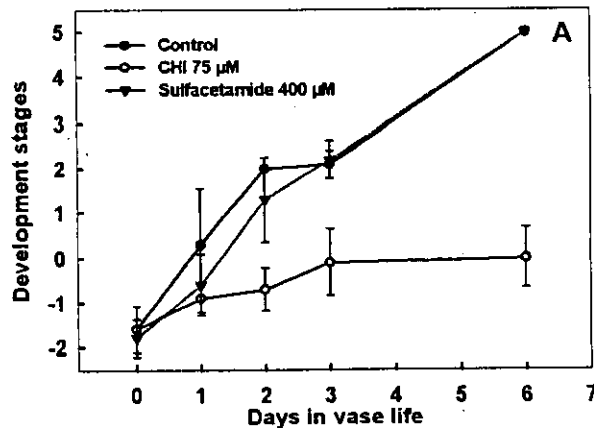
### 3.3.2. פיתוח תנאים לאחסון ממושך של פרחי איריס אונקוויקלוס מזני היברידי חדשים

מאחר ופרחי איריס אונקוויקלוס מאוד מבוקשים בשווקים אך עונת שיווקם קצרה יחסית (2-3 חודשים), נעשה ניסיון לפתח תנאים מיטביים לאחסון ממושך או הובלה ימית של פרחים אלה מזני ההיברידי החדשים ('זיו' ו'מור') שטופחו בשנים האחרונות ע"י דוד שחק מטירת צבי.



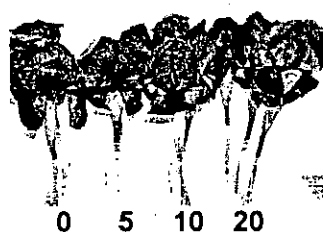


**איור 1:** השפעת מעכבי סינתזת חלבון, מעכבי סינתזה של חומצות גרעין וחומרים אחרים על קצב ההתפתחות וההזדקנות של פרחי איריס הארגמן במהלך חיי האגרסל. פרחי איריס הארגמן הוטענו בחומרים השונים בריכוזים המצוינים בגרפים למשך 20 שעות ב-20 מ"צ והוצבו לאחר מכן במים בחדר תצפית למעקב. כל הפרחים הוטענו בשלב התפתחות 2- פרט לקבוצת פרחים אחת שהוטענה בציקלוקסימיד. בשלב 0. שלבי ההתפתחות וההזדקנות הם כמוגדר באיור A. בנספח. התוצאות מייצגות ממוצעים של 5 פרחים  $\pm$  שגיאת תקן.



**איור 2:** השפעת הטענה בציקלוקסימיד (CHI) ובסולפאצטאמיד על קצב ההתפתחות וההזדקנות של פרחי איריס הארגמן (A) ועל מופע הפרחים לאחר יומיים באגרסל בפרחים בעלי גבעול ארוך (B) ובפרחים בעלי גבעול קצר (C). התנאים הם כמפורט באיור 1. התוצאות בגרף A מייצגות ממוצעים של 5 פרחים  $\pm$  שגיאת תקן.

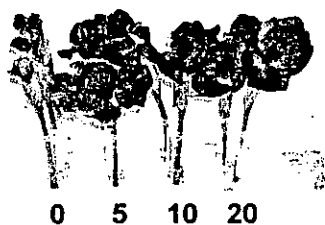
A. Stage 0



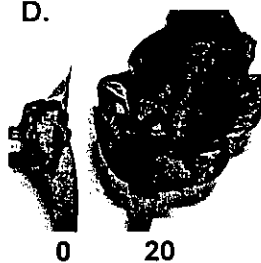
B.



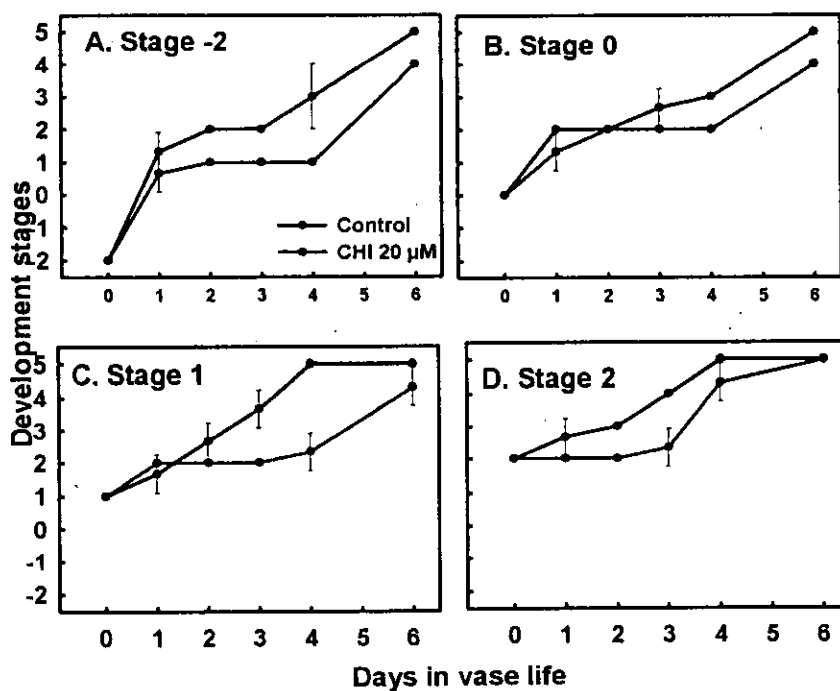
C. Stage 1



D.

CHI concentrations ( $\mu\text{M}$ )

**איור 3:** השפעת מתן מתמשך של ציקלוהקסימיד (CHI) בריכוזים שונים משלב התפתחות 0 (A, B) או משלב התפתחות 1 (C, D) על המופע של פרחים קצרים (15 ס"מ) של איריס הארגמן (היבריד 'זיו') לאחר 4 ימים באגרסל.



**איור 4:** השפעת מתן מתמשך של ציקלוהקסימיד (CHI) בריכוז של 20  $\mu\text{M}$  משלב התפתחות -2 (A), 0 (B), 1 (C) או 2 (D) על קצב ההתפתחות וההזדקנות של פרחים קצרים של איריס הארגמן (היבריד 'זיו') במהלך חיי האגרסל. התוצאות מייצגות ממוצעים של 3 פרחים  $\pm$  שגיאת תקן.

A. Day 0



B. Day 3 - control

C. Day 3 - CHI 20  $\mu$ M

D. Day 6 - control

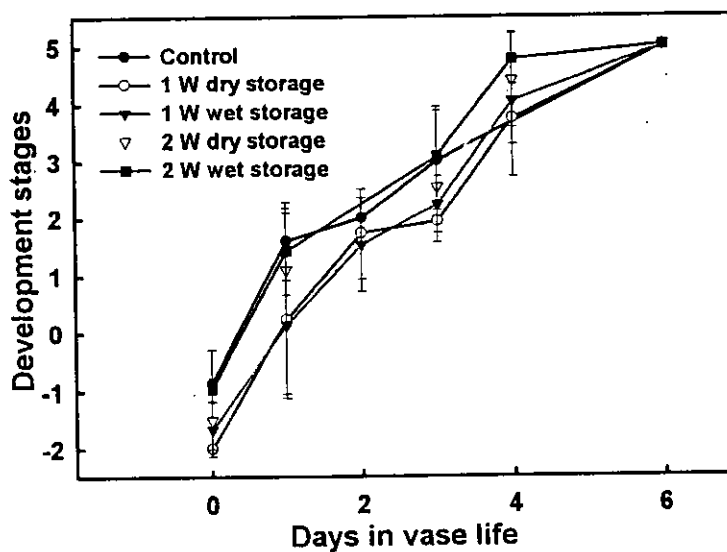
E. Day 6 - CHI 20  $\mu$ M

Stages:

2 1 0 -2

2 1 0 -2

**איור 5:** השפעת ציקלוהקסימיד (CHI) על התפתחות והזדקנות של פרחים שלמים של איריס הארגמן בהשוואה לעלי כותרת מנותקים ביום 0 (A) ולאחר 3 (B, C) ו-6 (D, E) ימים באגרסל. הציקלוהקסימיד ניתן בריכוז של 20  $\mu$ M בצורה מתמשכת. עלי הכותרת המנותקים של הפרח היו מסוג L2 (כמוגדר באיור B בנספח).



**איור 6:** השפעת משך האחסון וסוג האחסון על קצב ההתפתחות וההזדקנות של פרחי איריס הארגמן (היבריד 'זיו') במהלך חיי האגרסל. התוצאות מייצגות ממוצעים של 5 פרחים  $\pm$  שגיאת תקן.

לשם כך בחנו את ההשפעה של אחסון ממושך לשבוע או שבועיים במים או ללא מים, על איכות הפרחים ומשך חיי האגרטל שלהם. הבעיות שאותרו ע"י המגדל כללו: התייבשות עלי חפה, פריחה מעוותת, אי פתיחת פרחים לאחר האחסון ומשך חיי אגרטל קצר. הפרחים נקטפו בשעות הבוקר כאשר הטמפרטורה בשטח הייתה בטווח של 14-16 מ"צ, הוכנסו למים תוך 10 דקות מהקטיף, לאחר כשעה הוכנסו לקירור והובאו במים למעבדה בוולקני. הפרחים הודגרו במים למשך 4 שעות ב- 20 מ"צ, ולאחר מכן הועברו לקירור ב- 2 מ"צ למשך שבוע או שבועיים, עם או ללא מים, ארוזים בקרטון. בתום האחסון הממושך הפרחים הועברו לחדר תצפית בתמיסת TOG 6 למעקב אחר האיכות במהלך חיי האגרטל ב- 20 מ"צ. פרחי הביקורת הוגדרו ישירות בחדר התצפית ללא אחסון בקירור. מהתוצאות המסוכמות באיור 6 ניתן לראות שהאחסון הממושך לשבועיים לא פגע בפתיחה, כאשר האחסון היבש האט במקצת את ההזדקנות אך לא בצורה משמעותית, בעוד שהאחסון הרטוב האיץ את התהליך בהשוואה לפרחי הביקורת. לעומת זאת, אחסון בקירור למשך שבוע האט את תהליכי ההתפתחות וההזדקנות ביחס לפרחי הביקורת במשך 5 ימי אגרטל. לא התקבל הבדל משמעותי באיכות הפרחים לאחר אחסון רטוב או יבש לשבוע (איור 6). נראה לכן שניתן לשמור את זני ההיברידי החדשים של איריס הארגמן עד לשבוע ימים בתנאי הובלה ימית מבלי לפגוע באיכות הפרחים. בניסיון לבחון בתנאי משלוח את יעילותם של מספר מעכבים שנבחנו קודם לכן בתנאי מעבדה, הפרחים הוטענו ביוני סידן או במעכב סולפבנזאמיד לפני האחסון הממושך, אך לא נמצאה כל השפעה מעכבת הזדקנות בתנאים אלה (תוצאות לא מובאות).

#### **4.3.2. המשך אפיון הפרוטאזות המשתתפות בתהליך ההזדקנות של פרחי איריס הארגמן**

לאחר אפיון ראשוני של מעורבותן של הפרוטאזות בשלבי ההתפתחות וההזדקנות בעלי הכותרת של פרחי איריס הארגמן בשתי שנות המחקר הקודמות, התמקדנו בשנה זו בנושאים הבאים: (1) פיתוח התנאים האופטימאליים לביטוי פעילות הפרוטאזות; (2) סיווג הפרוטאזות מבחינת השתייכותן לקבוצת פרוטאזות ספציפית באמצעות בחינת השפעות של מעכבים ספציפיים שונים בג'ל פעילות; (3) בחינת הקשר בין עיכוב ההזדקנות בפרחים לבין עיכוב פעילות הפרוטאזות בג'ל פעילות.

התוצאות המסוכמות באיור 7 מתארות את תבנית הופעת הפרוטאזות במהלך שלבי ההתפתחות וההזדקנות של פרחי איריס הארגמן, בשלושת סוגי עלי הכותרת (המוגדרים באיור B בנספח). הדוגמאות הודגרו בנוכחות DTT שנמצא בשנה הקודמת כמגביר את רמת הפעילות. ניתן לראות בבירור, שתבנית הפרוטאזות משתנה בהתאם לסוגים השונים של עלי הכותרת, אם כי לפחות שני פסים באזור ה- 127-85 KD ושלושה פסים באזור ה- 50-25 KD הופיעו בכל סוגי העלים ובכל שלבי ההתפתחות. פסים אלה הוגברו בצורה משמעותית עם התקדמות ההזדקנות, והופיעו בעוצמה מקסימאלית בשלב 4. בנוסף, נראה בבירור שכל הפרוטאזות מופיעות בצורה ברורה כבר בשלב 0 (איור 7) בו הפרח סגור למחצה (ראה איור A בנספח), עוד הרבה לפני הופעת הסימפטומים של ההזדקנות התזזיתית. תוצאה זו מחזקת את הממצא המוצג באיור 5 שכנראה מתקיים בעלי הכותרת תהליך מתוכנן לתמותה מבוקרת של תאים (PCD). אפיון נוסף של התנאים הדרושים לביטוי מקסימאלי של הפעילות הפרוטאוליטית שאותרה בעלי הכותרת של פרחי איריס בוצע ע"י הורדת ה- pH בו בוצעה ריאקצית הפרוטאוליזה מ- 7.5 ל- 3.5. ניתן לראות בבירור, שהפעילות הפרוטאוליטית הוגברה באופן משמעותי ב- pH 3.5, גם ללא נוכחות DTT (איורים 8A, 8B), בהשוואה לפעילות שהתקבלה ב- pH 7.5 (איורים 8C, 8D). כך ב- pH 3.5 ניתן לראות בבירור פעילות פרוטאוליטית גבוהה גם בשלב ההתפתחות המוקדם ביותר של פקע סגור לגמרי (שלב 2-) (איור 8A). תוצאות אלה מרמזות על כך שהפרוטאזות בעלי הכותרת של איריס הארגמן ממוקמות כנראה בסביבה החומצית של הוקואולה. כן נראה בבירור שהפרוטאזות נוכחות ברקמה עוד בשלבי ההתפתחות

המוקדמים, ופעילותן גוברת בצורה משמעותית עם התקדמות ההזדקנות.

כדי להמשיך ולאפיין את סוג הפרוטאזות הפעילות במהלך הזדקנות פרחי איריס הארגמן, בחנו את גל הפעילות בנוכחות מעכבים ספציפיים, שחלקם פורטו בטבלה 1 בנספח. מהתוצאות המסוכמות באיור 9 ניתן לראות שפעילות הפרוטאזות עוכבה לחלוטין ע"י מעכב ספציפי של ציסטאין פרוטאזות (E-64) ושני מעכבים פחות ספציפיים (PMSF, לאופפטיין). PMSF ולאופפטיין ידועים כמעכבים הן של ציסטאין-פרוטאזות והן של סרין-פרוטאזות. בנוסף, ניתן לראות באיור 9 שהפעילות הפרוטאוליטית לא הושפעה מנוכחות של מעכבים ספציפיים של סרין-פרוטאזות (בנזמידין), של אמינו-פפטידאזות (בסטטין), ושל אספרטיק-פרוטאזות (פפסטטין A), או של מעכבים אחרים. על סמך תוצאות אלה ניתן להסיק שהפרוטאזות הפעילות בעלי הכותרת של איריס הארגמן משתייכות כנראה לקבוצת הציסטאין-פרוטאזות. גם פעולתו של החומר המחזר DTT בעידוד פעילות הפרוטאזות תומכת בהגדרתן כציסטאין-פרוטאזות.

כדי לבחון האם ניתן לעכב את פעילות הפרוטאזות הנ"ל ע"י מעכב סינתזת החלבונים CHI שעכב ביעילות את ההזדקנות, בחנו את ההשפעה של הסענת הפרחים ב-CHI על ביטוי הפעילות של הפרוטאזות בשלבי ההתפתחות וההזדקנות של הפרח ע"ג גל פעילות. מאיור 10 ניתן לראות בבירור, שנוכחות CHI ברקמה הפחיתה בצורה משמעותית את פעילות הפרוטאזות כמעט בכל שלבי ההתפתחות וההזדקנות, כולל בשלב 3 בו עוצמת הפעילות הייתה גבוהה במיוחד. תוצאות אלה יתכן וקשורות ליעילותו הרבה של ה-CHI בעיכוב הזדקנות הפרחים, ומציעות מנגנון אפשרי של עיכוב ההזדקנות באמצעות עיכוב הפרוטאזות הפעילות ברקמה.

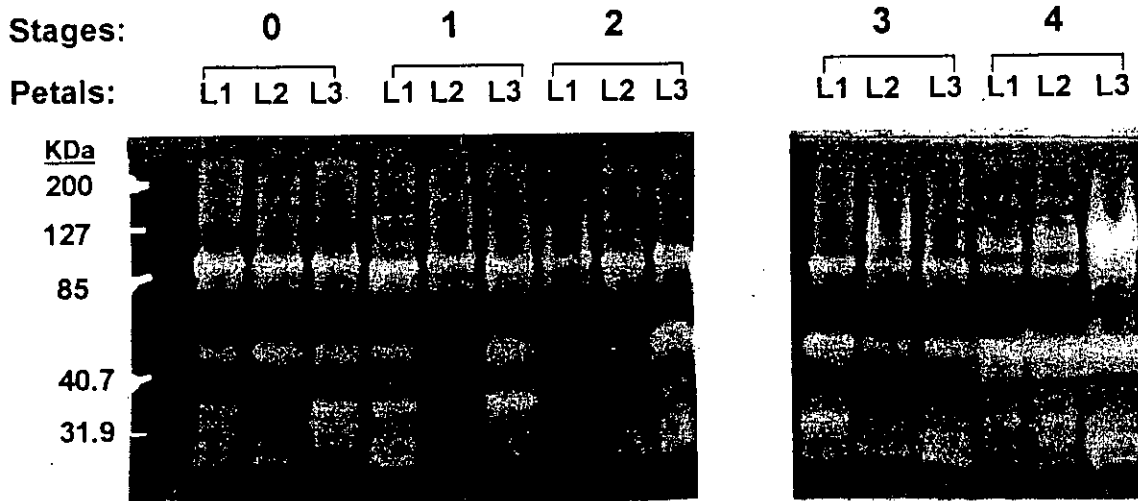
## 7. מסקנות והשלכותיהן על המשך ביצוע המחקר:

### החומר הצמחי:

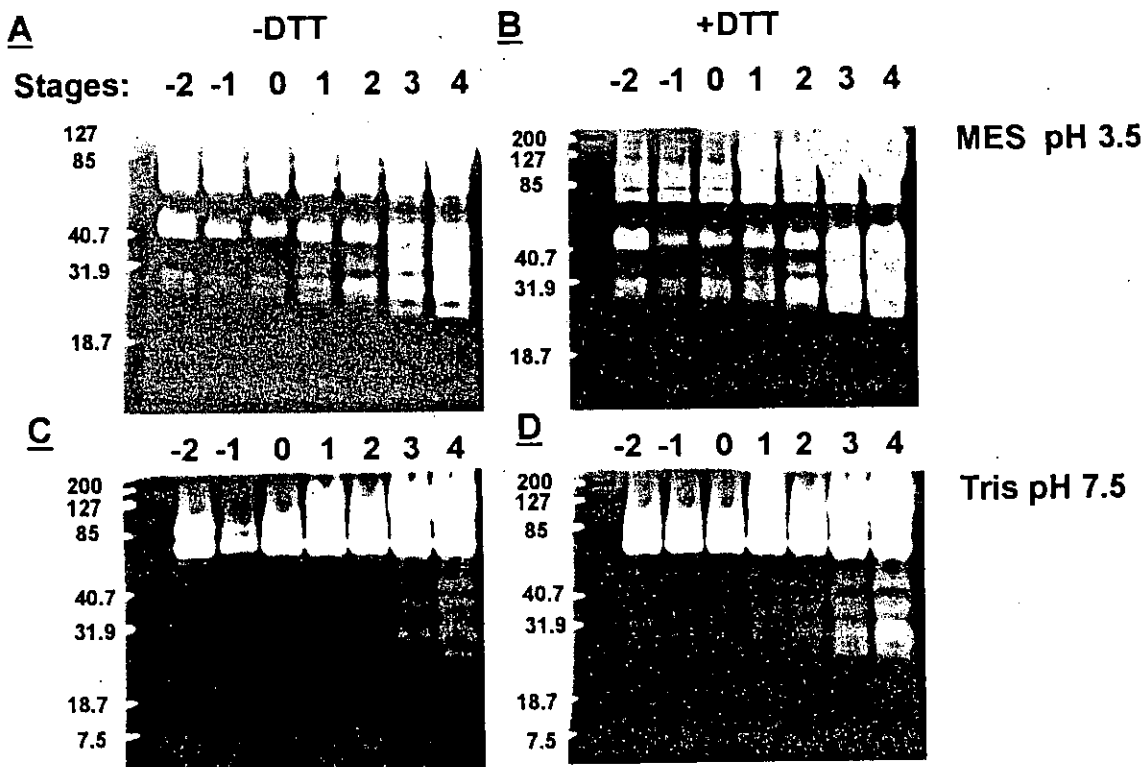
1. לא נמצאו זני גרברה קצרי חיים המתאימים לעבודה הנוכחית, ולכן הניסויים בוצעו בפרחי איריס וורדים מזנים שונים.
2. פרחי איריס הארגמן וורדים מזן 'פריסקו' ומזן 'רד צ'ארם' נמצאו כמתאימים ביותר לביצוע המחקר, הן בשל היותם קצרי חיים והן בשל ההקבלה שנמצאה בהם לגבי השינויים בממד דליפת היונים מעלי כותרת המזדקנים על הפרח או במבחנה ('פריסקו') או בממד העליה ב- $\text{pH}$  של מוהל התא (איריס ו'רד צ'ארם').
3. בהמשך המחקר, אפיון הפעילות הפרוטאוליטית בוצע על פרחי איריס בלבד (ארגמן וזן היברידי 'זיו'), שכן לא הצלחנו לאפיין פעילות זו בעלי כותרת של וורדים בשל בעיות במיצי החלבונים בגלל אופי הרקמה.
4. מרבית הניסויים בוצעו על עלה מסוג L2 של איריס הארגמן שנמצא כמאפיין ביותר מבין 3 סוגי עלי הכותרת.
5. הוגדרו 8 שלבי התפתחות והזדקנות שונים בפרחי איריס אונקוציקלוס, החל מפקע סגור לגמרי (שלב 2-) ועד לפרח זקן וכמוש לגמרי (שלב 5).

### מדדי הזדקנות:

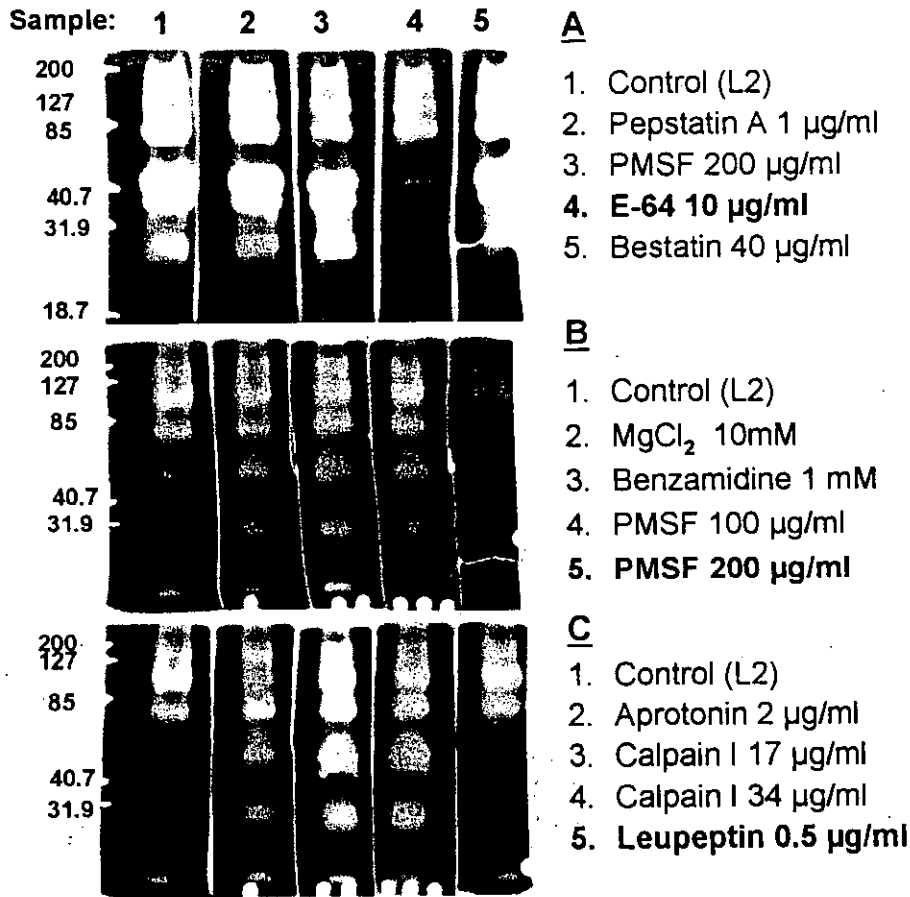
6. הזדקנות עלי הכותרת של פרחי איריס לוותה בירידה במשקל הטרי והיבש ותכולת החלבון (שבוטאו על בסיס משקל טרי) ובעליה מקבילה בתכולת חומצות האמינו (על בסיס משקל טרי), בשיעור דליפת היונים מהרקמה, וב- $\text{pH}$  של מוהל התא.
7. ביטוי תכולת החלבון על בסיס של דסקית רקמה ששטחה נשאר קבוע במהלך שלבי ההתפתחות וההזדקנות מאפשר קבלת תמונה מהימנה יותר של מעקבות השינויים בחלבון במהלך שלבים אלה, בהשוואה לביטוי החלבון על בסיס משקל טרי המשתנה גם הוא במהלך ההתפתחות וההזדקנות. שינויים בתכולת החלבון זוהו כבר בשלב מוקדם מאוד של פקע סגור (1-), והם הקדימו את השינויים במדדים החזותיים של ההזדקנות.



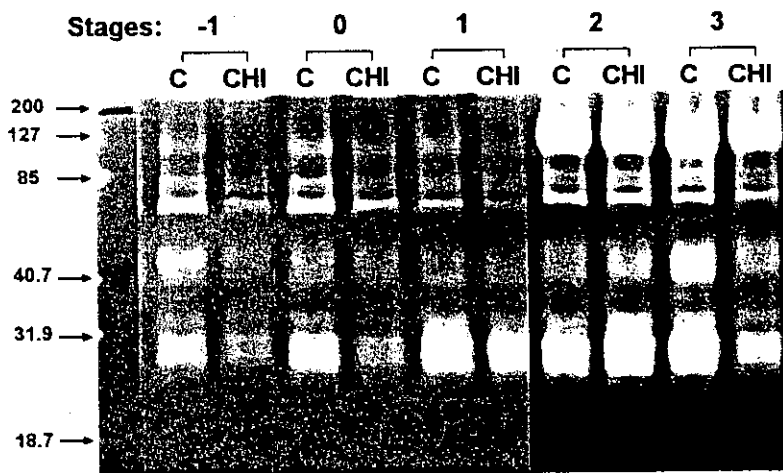
**איור 7:** תבנית הופעת הפרוטאזות בג'ל פעילות פרוטאוליטית של מיצויים שבודדו משלושת סוגי עלי הכותרת של פרחי איריס הארגמן במהלך שלבי ההתפתחות וההזדקנות של פרחים קטופים באגרסל. הדוגמאות הודגרו בבופר TRIS ב- $\text{pH} = 7.5$  בנוכחות DTT. משמאל לכל ג'ל מצוינים המשקלים המולקולריים של הסמנים שהורצו במקביל.



**איור 8:** השפעת ה- $\text{pH}$  ונוכחות DTT על תבנית הופעת הפרוטאזות במיצויים שבודדו מעלי כותרת מסוג L2 של פרחי איריס הארגמן (היבריד 'זיו') בשלבים השונים של ההתפתחות וההזדקנות באגרסל. הדוגמאות הודגרו בבופר MES ב- $\text{pH} = 3.5$  (B, A) או בבופר TRIS ב- $\text{pH} = 7.5$  (C, D), בהעדר (A, C) או בנוכחות (B, D) DTT. משמאל לכל ג'ל מצוינים המשקלים המולקולריים של הסמנים שהורצו במקביל.



**איור 9:** השפעת הוספה של חומרים שונים לגל הפעילות הפרוטאוליטית על תבנית הופעת הפרוטאזות בעלי כותרת של איריס הארגמן. המיצויים בודדו מעלי כותרת מסוג L2 בשלב 4 של הזדקנות הפרח הקטוף באגרסל. הדוגמאות הודגרו בבופר TRIS ב-  $\text{pH} = 7.5$  בנוכחות DTT. משמאל לכל ג'ל מצוינים המשקלים המולקולריים של הסמנים שהורצו במקביל, ומימין מצוינים סוגי המעכבים שנבחנו וריכוזיהם.



**איור 10:** השפעת הסענת פרחי איריס הארגמן (היבריד 'זיו') בציקלוהקסימיד (CHI) בריכוז של 20  $\mu\text{M}$  על תבנית הופעת הפרוטאזות במיצויים שבודדו מעלי כותרת מסוג L2 בשלבים השונים של ההתפתחות וההזדקנות באגרסל. הדוגמאות הודגרו בבופר MES ב-  $\text{pH} = 3.5$  בנוכחות DTT. משמאל לג'ל מצוינים המשקלים המולקולריים של הסמנים שהורצו במקביל.

8. בשנה א' נמצא שמדד דליפת היונים מעלי כותרת מנותקים עשוי לשמש כמדד יעיל ומתאים לבחינת יעילותם של מעכבים שונים במבחנה (*in vitro*) מאחר והוא משקף את תהליך ההזדקנות על הפרת. לכן, מדד זה שימש בהמשך המחקר לסריקת יעילותם של מספר גדול של חומרים המעכבים תהליכי סינתזת חלבונים או מעכבי פרוטאזות.

9. בשנה ב' נמצא שעליית ה-pH של מוהל התא בעלי כותרת מסוג L1 ו-L2 של איריס הארגמן ובעלי כותרת של וורדים מזן 'רד צ'ארס' מהווה מדד פיסיוולוגי הנמצא במתאם הדוק עם תהליכי ההתפתחות וההזדקנות, והמקדים מאוד את ההזדקנות החזותית (שינוי הובחן כבר בשלב של פקע סגור, 1-, באיריס). לכן ניתן להשתמש במדד זה בפרחים אלה כמדד מקדים וקל לבדיקה לצורך המשך סריקת יעילותם של מעכבי הפעילות הפרוטאוליטית בעיכוב הזדקנות הפרח.

#### השפעת מעכבים בפרח השלם:

10. מעכבי סינתזה של חומצות גרעין מקבוצת הסולפונילמידים עכבו בפרחי וורדים מזן 'רד צ'ארס' את העליה ב-pH של מוהל התא וגם את הזדקנות פרח השלם.
11. יוני סידן לא עכבו את הזדקנות הפרחים של איריס או וורדים.
12. מאחר ומרבית המעכבים שגרמו לעיכוב משמעותי בהזדקנות באיריס היו יעילים בפרחים בעלי גבעול קצר ניתן לייחס חלק מחוסר ההשפעה של חומרים אחרים להעדר קליטה נאותה ע"י הרקמה עקב אורך הגבעול.
13. מרבית החומרים היעילים עכבו רק את אחד ממדדי ההזדקנות בפרחי איריס, פרט לציקלוהקסימיד (CHI), שעייב בצורה משמעותית הן את מדד דליפת היונים מעלי הכותרת והן את הזדקנות הפרחים הקצרים והארוכים. תוצאה זו מצביעה על יעילותו הרבה במערכת פרחי האיריס.
14. סיכום התוצאות של סריקת יעילות המעכבים השונים תומך באפשרות שיש קשר בין הפעילות הפרוטאוליטית מסוגים שונים לבין הזדקנות רקמת עלי הכותרת של פרחי איריס.
15. רק כאשר ה-CHI ניתן בשלבי ההתפתחות המוקדמים, הוא עייב בצורה משמעותית גם את ההזדקנות. ניתן להסיק מתוצאות אלה שרק עיכוב של חלבונים המופיעים כנראה בשלבי ההתפתחות המוקדמים, ובכללם פרוטאזות, תורם לעיכוב תהליך ההזדקנות.

#### אפיון הפעילות הפרוטאוליטית בפרחי איריס:

16. הפעילות הפרוטאוליטית בפרחי איריס הארגמן משתנה בהתאם לסוג עלי הכותרת ולאזור העלה הנבדק (בהיקף או במרכז). יתכן והבדלים אלה נובעים מהשוני שנצפה בקצבי ההזדקנות של סוגי עלי הכותרת השונים.
17. בגלל פעילות הופיעו 3 פרוטאזות בטווח משקל מולקולרי שבין 25-50 KD. פרוטאזות אלה הופיעו כבר בשלבי ההתפתחות המוקדמים מאוד של הפרח (2-, 1-), עוד לפני הופעת הסימפטומים של ההזדקנות החזותית, ופעילותן הוגברה בצורה משמעותית בשלבי ההזדקנות המאוחרים (3, 4). ממצא זה תומך בכך שתהליך ההזדקנות הוא תהליך אקטיבי ומבוקר. העלייה ברמת הפרוטאזות נמצאת במתאם חיובי עם התקדמות התהליך של תמותת תאים מבוקרת (PCD) בעלי הכותרת.
18. הפרוטאזות הראו פעילות מקסימאלית ב-pH 3.5) וניתן להסיק מכך שהפרוטאזות בעלי הכותרת של איריס הארגמן ממוקמות כנראה בסביבה החומצית של הוקואולה.



19. אפיון הפרוטאזות המופיעות במהלך ההתפתחות וההזדקנות של עלי הכותרת של איריס הארגמן בעזרת מעכבים שונים מצביע על כך שניתן לסווגן כציסטאין-פרוטאזות. מסקנה זו נתמכת גם בהגברת רמת הפעילות ע"י DTT, אשר פעילותו המתזרת ידועה כמעודדת פעילות של ציסטאין-פרוטאזות עקב חיזור קשרי S-S הדרוש לפעילותן.

#### אפיון תהליך ההזדקנות בפרחי איריס:

20. קצב ההזדקנות בעלי הכותרת המנותקים זהה לזה של עלי הכותרת בפרחים השלמים, עם או ללא CHI. נראה לכן שהזדקנות עלי הכותרת של פרחי איריס היא אוטונומית לחלוטין וכנראה מהווה מערכת של PCD.
21. ניתן לשמור את זני ההיבריד החדשים של איריס הארגמן עד לשבוע ימים בקירור בתנאי הובלה ימית מבלי לפגוע באיכות הפרחים.
22. הזדקנות עלי כותרת של פרחי איריס היא תהליך אקטיבי הכולל סינתזת חלבונים של אנזימים פרוטאוליטיים.
23. התוצאות המראות עיכוב של פעילות הפרוטאזות בג'ל הפעילות לאחר מתן טיפול הטענה ב- CHI לפרח מוכיחות שפעילות זו נובעת מהשראה *de novo* של ביטוי גנים במהלך הזדקנות הפרח. יתכן גם שלעיכוב פעילות הפרוטאזות ע"י CHI יש חלק בעיכוב הברור של תהליך ההזדקנות ע"י מעכב זה, יחד אולי עם עיכוב ביטוי של חלבונים אחרים הדרושים לתהליך ההזדקנות.
24. ההזדקנות המהירה של פרחי איריס אונקוציקלוס מהווה למעשה תהליך מתוכננת מראש (PCD), שמעורבות בו בעיקר ציסטאין-פרוטאזות שכנראה ממוקמות בוקואולה. ניתן לעכב את תהליך ההזדקנות רק ע"י שימוש במעכב סינתזה של חלבונים (CHI) כאשר הוא ניתן בשלבי ההתפתחות המוקדמים (2-, 0).

#### ה. פירוס מלא של הפרסומים המדעיים בכתב ובע"פ:

תוצאות מחקר זה הוצגו בפני המדריכים החקלאיים של שה"מ במסגרת יום עיון שהתקיים בקריה החקלאית באפריל 2001, וכן הוצגו ביום דיווח של מחקרים הממומנים ע"י קרן המדען הראשי בינואר 2002. סיכום התוצאות יוצג גם בהרצאה שתינתן בוונקינגן, הולנד באוגוסט 2003 במסגרת הכנס הבינלאומי ה- 8 לפיסיולוגיה שלאחר הקטיף של צמחי נוי (QualiFlor2003).

#### ו. סיכום עם שאלות מנחות לדו"ח המחקר:

##### מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתכנית העבודה:

כדי לפתח טיפולים יישומיים חדשים להארכת משך חיי האגרטל של פרחי קטיף שיתאימו בעיקר לפרחים שאינם רגישים לאתילן, אופיינו תהליכי פירוק החלבונים המתרחשים במהלך הזדקנות פרחים. במקביל, בחנו האם חומרים שונים, המעכבים תהליכי תרגום ושעתוק חלבונים או פעילות פרוטאוליטית, יעילים גם בעיכוב תהליך ההזדקנות. מערכות המודל שנבחנו כללו פרחי איריס אונקוציקלוס וורדים מזנים שונים. מטרות המחקר בשנה ג' היו: א. המשך בחינת ההשפעות של חומרים מעכבי פרוטאזות והערכת יעילותם בעיכוב תהליכי הזדקנות והארכת משך חיי האגרטל של פרחי איריס הארגמן. ב. המשך אפיון הפרוטאזות המשתתפות בהזדקנות של פרחים אלה.

##### עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח:

הניסויים במהלך המחקר התמקדו בפרחי איריס הארגמן (זן הבר וזני היבריד 'זיו' ו'מור') ובמספר זני ורדים ('פריסקו', 'רד צ'ארם'). אופיינו הפרוטאזות בשלבי ההתפתחות וההזדקנות של איריס באמצעות ג'ל פעילות,

בהשפעת pH ומעכבים שונים. נבחנה השפעת החומרים שערכו את הזדקנות הפרח, על פעילות פרוטאזות באמצעות גל פעילות בתנאים האופטימאליים שפותחו. בפרחי ורדים קצרי חיים מזנים 'פריסקו' ו'רד צ'ארס' אופיינו מספר מדדי הזדקנות שהקדימו את ההזדקנות החזותית (דליפת יונים ועליה ב- pH של מוהל התא), ונמצאו מספר מעכבי סינתזה של חומצות גרעין שערכו הן את המדדים הנ"ל והן את הזדקנות הפרחים. בפרחי איריס הארגמן הוגדרו 8 שלבי התפתחות והזדקנות שונים, החל מפקע סגור לגמרי (שלב 2-) ועד לפרח זקן וכמוש (שלב 5). הזדקנות עלי הכותרת לוותה בירידה במשקל הטרי והיבש ותכולת החלבון ובעליה מקבילה בתכולת חומצות אמינו, בשיעור דליפת היונים מהרקמה, וב-pH של מוהל התא. השינויים בתכולת החלבון וב-pH הובחנו כבר בשלב מוקדם מאוד של פקע סגור (1-), והקדימו את השינויים במדדי ההזדקנות החזותיים. הפעילות הפרוטאוליטית בעלי הכותרת של איריס אופיינה בהופעתן של 3 פרוטאזות בטווח משקל מולקולרי של 25-50 KD בגל הפעילות. פרוטאזות אלה הופיעו כבר בשלבי ההתפתחות המוקדמים מאוד של הפרח (2-, 1-), ופעילותן הוגברה מאוד בשלבי ההזדקנות המאוחרים (3, 4). הפרוטאזות הראו פעילות מקסימאלית ב- pH חומצי (3.5) ובנוכחות DTT, שעוכבה ע"י מעכבי ציסטאין-פרוטאזות או מעכבי ציסטאין וסרין-פרוטאזות. המעכב היעיל ביותר בפרחי איריס, שערכ את הזדקנות הפרח, את דליפת היונים ואת הפעילות הפרוטאוליטית בגל היה מעכב סינתזת החלבון, ציקלוקסימיד (CHI). מעכבי פרוטאוליזה אחרים היו פחות יעילים, כנראה בשל חוסר קליטה ע"י הפרח.

#### המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו:

ההזדקנות המהירה של עלי הכותרת בפרחי איריס אונקוציקלוס היא תהליך אקטיבי, מבוקר, ומתוכנן מראש (PCD), שבו מעורבת סינתזת חלבונים של אנזימים פרוטאוליטיים. הפרוטאזות המעורבות משתייכות בעיקר לקבוצת הציסטאין-פרוטאזות, והן כנראה ממוקמות בוקאולה. ניתן לעכב את תהליך ההזדקנות רק ע"י שימוש במעכב סינתזה של חלבונים (CHI) כאשר הוא ניתן בשלבי ההתפתחות המוקדמים (2-, 0). הוכחה השערת המחקר שסינתזה של פרוטאזות או של חלבונים המגבירים פעילות פרוטאוליטית, מעורבת באופן ישיר או עקיף בשרשרת האירועים המובילים להזדקנות עלי הכותרת.

#### הבעיות שונתרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה:

על בסיס הבנת מנגנון ההזדקנות בפרחים קצרי חיים שאינם רגישים לאתילן שנחקר בפרויקט זה, ניתן יהיה לפתח בעתיד אמצעים לעיכוב הזדקנותם. נמצאו אמנם מספר מעכבים יעילים להזדקנות פרחים באיריס ובורדים, אך הם אינם מתאימים עדיין ליישום מסחרי. בנוסף, יש לבחון האם מנגנון ההזדקנות שנמצא לגבי פרחי איריס פועל בצורה דומה גם בפרחי קטיף אחרים. מאחר ורקמת עלי הכותרת של ורדים לא נמצאה מתאימה לנושא זה, התחלנו לבחון את מנגנון הפרוטאוליזה בפרחי ליזיאנטוס.

#### האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הד"ח:

תוצאות מחקר זה הוצגו בפני המדריכים החקלאיים של שה"מ במסגרת יום עיון שהתקיים בקריה החקלאית באפריל 2001, וכן הוצגו ביום דיווח של מחקרים הממומנים ע"י קרן המדען הראשי בינואר 2002. סיכום התוצאות יוצג גם בהרצאה שתינתן בווכנינגן, הולנד באוגוסט 2003. במסגרת הכנס הבינלאומי ה-8 לפיסיולוגיה שלאחר הקטיף של צמחי נוי (QualiFlor2003).

### ת/ד/ת:

תורתנו נתונה למגדלי האיריסים גדעון להן מרשפון ודוד שחק מטירת צבי, על הספקת הפרחים ושיתוף הפעולה.

## נספח תוצאות

**טבלה 1:** סיכום ההשפעות של סוגים שונים של מעכבי פרומאזות ומעכבים אחרים על מיד המוליכות בעלי הכותרת ועל עיכוב ההדקנות החותית של פרחי איריס הארגמן במהלך חיי האגרטל. כל המעכבים ניתנו בהסעה למשך 20 שעות ב- 20 מ"צ לפרחים בשלב 2, שלאחר מכן הוצבו במים בחדר התצפית למעקב אחר איכותם. מיד המוליכות נקבע בדיסקיות שנלקחו מיד יום מעלי כותרת מנותקים מסוג L2. התוצאות מבטאות את מידת עיכוב ההדקנות ביחס לפרחי הביקורת עפ"י הערכה חזותית של איכות הפרח ביחס המצויין בטבלה. מקרא הסימנים: (-) = איכות גרועה מאוד ביחס לביקורת (נוק); (-) = איכות גרועה ביחס לביקורת (אין עיכוב הדקנות); (0) = איכות זהה לביקורת (אין השפעה); (+) = שיפור האיכות ביחס לביקורת (עיכוב הדקנות מסוים); (++) = שיפור משמעותי באיכות ביחס לביקורת (עיכוב הדקנות מאוד ביחס לביקורת (עיכוב הדקנות מאוד משמעותי); T = הפרחים הוצבו בחמיסת TOG-6; So = החומר ניתן בשלב L3; L3 = מיד המוליכות נקבע בעלה מסוג L3; \* = איריס הגלבי; \*\* = איריס הדור.

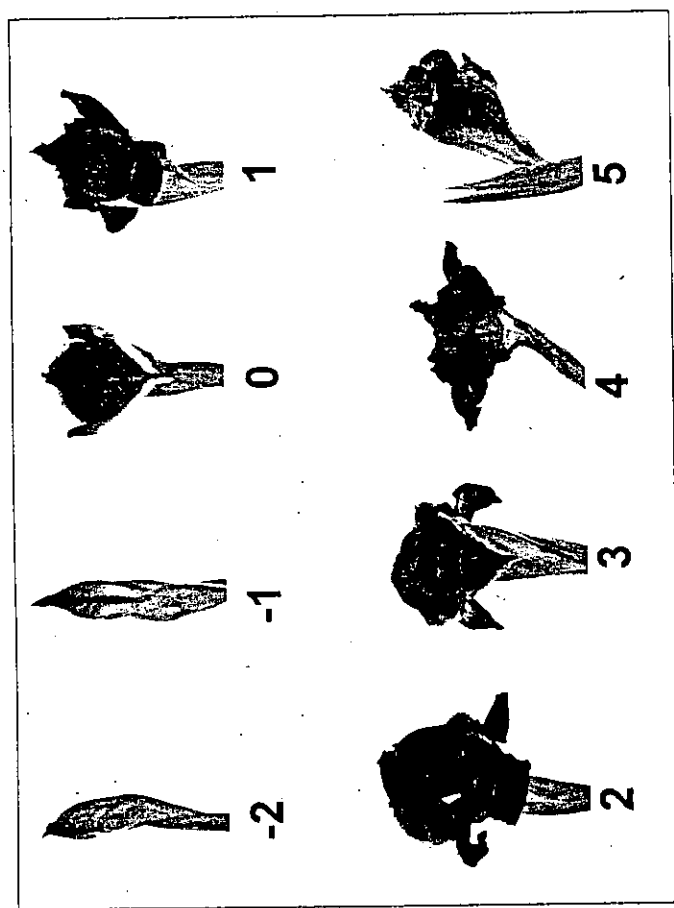
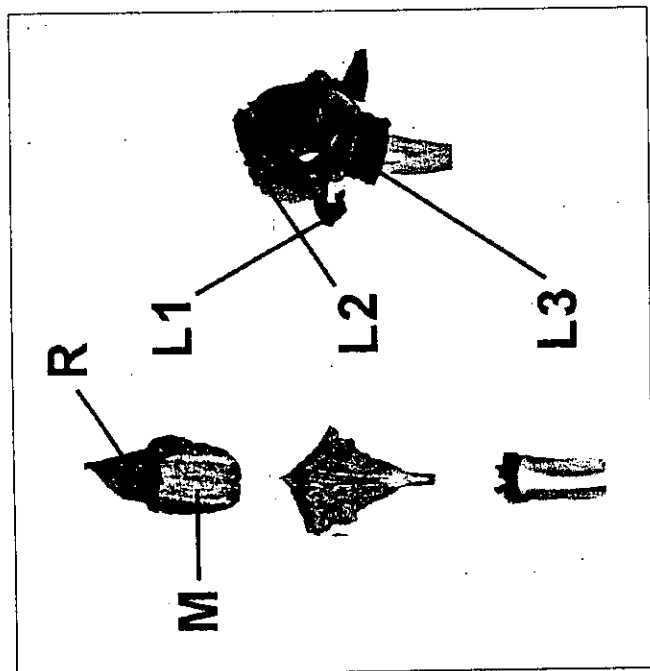
Type of Inhibitor	Inhibitor concentration ↓ Days in vase life →	Degree of inhibition relative to control														
		Petal conductivity					Visual quality of short flowers (15 cm)					Visual quality of long flowers (50 cm)				
		1	2	3	1	2	3	4	1	2	3	5				
<b>Serine Proteases Inhibitors</b>																
PMSF (not specific; inhibits also cystein proteases) (Soluble in methanol 1%)	50 µg/l				-	-	-									
	200 µg/ml				+	+	+	+								
	500 µg/ml				+		+	++								
	400 µM (**)												0		+	
	400 µM													+	+	
	200 µM (** S0)											0		0	0	+
	200 µM												0		0	+
Benzamidine	10 mM				+	-	-									
	1 mM				+	+	-									
<b>Metalloproteases Inhibitors</b>																
Phosphoramidon (Soluble in methanol 2%)	200 µg/ml		-													
	20 µg/ml		-													
	2 µg/ml		-													
<b>General Inhibitor of Apoptosis</b>																
3-Aminobenzamide	10 mM		-													
	1 mM		-													
	100 mM		-		+	--	--									
N-Ethylmaleimide	200 mM		-													



Sulfacetamide	250 $\mu$ M	-							++	+	-	0
	400 $\mu$ M											
	1 mM	-										
	500 $\mu$ M	-										
	250 $\mu$ M	-										
Sulfachloropyridazine	25 $\mu$ M	+										
	1 mM	-										
	500 $\mu$ M	-										
	250 $\mu$ M	-										
	25 $\mu$ M	-										
Sulfaminouracil	500 $\mu$ M	-							+	+	-	
	200 $\mu$ M	-							-	-	-	
	1 mM (L3)	-										
	250 $\mu$ M (L3)	0										
	25 $\mu$ M (L3)	-										
Aminopterin	100 $\mu$ M								+	+	+	
	10 $\mu$ M								++	++	++	
	200 $\mu$ M (L3)	-										
	20 $\mu$ M (L3)	-										
	2 $\mu$ M (L3)	-										
Protein Synthesis Inhibitors												
Cycloheximide	75 $\mu$ M								++	+	++	+
	50 $\mu$ M (S0)									0	+	+
	50 $\mu$ M									+	+++	++++
	100 $\mu$ M	- -	++	++								
	10 $\mu$ M	- -	++	++								
Puromycine	200 $\mu$ M								+	+	++	
	50 $\mu$ M								++	+	++	
Amino Acid Synthesis Inhibitors												
Chlorosulfaron	10,000 ppm	++	- -									
	1,000 ppm	++	++									
	100 ppm	++	++									
	10 ppm	++	++									
	1 ppm	++	- -									
	0.1%								+	++		wilted closed

	1%									0	+		"
	2%									-	-		
Glyphosate	20 mM								+	0	+	+	
	2 mM								-	--			
Imazapyr	100 µM								+		+		
	10,000 ppm	++											
	1,000 ppm	++											
	100 ppm	++	++										
	10 ppm	++	++										
	1 ppm	++	++										
	10,000 ppm	++	--										
Triasulfuron	1,000 ppm	++	--										
	100 ppm	++	+										
	10 ppm	++	--										
	1 ppm	++	--										
<b>General Protease Inhibitors</b>													
Protease cocktail inhibitor	1 tablet								-	-			
	2 tablets								-	-			
Chymostatin	40 µl/50ml								++	+	+	+	+
	2 µg/ml (**)										0	+	+
	2 µg/ml (T)										0	0	0
	10 µg/ml		-										
	100 µg/l		-										
Antipain	70 µl/50ml								++	+	+	++	
	50 µg/ml		-										
	5 µg/ml		-										
	2 µg/ml (**)										+	0	+
	2 µg/ml (T)										0	+	0
<b>Cysteine Protease Inhibitors</b>													
E-64 (Soluble in ethanol:water 1:1)	5 µg/ml								+		+	+	
Calpain inhibitor I	50 µM/ml								-	-			
(Soluble in methanol 1%)	20 µM/ml								-	-			
<b>Proteasome Inhibitors</b>													
Aclacinomycin A	100 µM								-				
	10 µM								-				

[illegible]

AB

איורים B-A: שלבים חזיתיים בהתפתחות והזדקנות פרחי קטף של איריס האדגמן (A) והגורת סוגי עלי הכותרת בפרח האיריס (B) (תמונה מהדף"ח של שנת 2001).