

916

2005-2007

תקופת המחקר:

837-0002-07

קוד מחקר:

Subject: EXPRESSION OF SMALL HSPS IN TOMATO TO PROMOTE FRUIT RIPENING AND STRESS TOLERANCE.

Principal investigator: DAVID WEISS

Cooperative investigator: SUSAN LURIE

Institute: Faculty of Agriculture

שם המחקר: בטוי חלבוני עקת חום קטנים לעידוד הבשלת פרי עגבניה לאחר קטיף והרקיית עמידות לפרי ולצמח כנגד עקות שונות

חוקר ראשי: דוד וייס

חוקרים שותפים: סוזן לוריא

מוסד: הפקולטה לחקלאות, רחובות

תקציר

חלבוני עקת חום קטנים (smHSP) מעורבים בתהליכי התגוננות של הצמח בפני עקות שונות. בעבודה קודמת הראנו שלחלבון הכלורופלסטי LeHSP21 מעגבנייה, תפקיד בהגנה על מערכת הובלת האלקטרונים PSII מפני עקות פוטואוקסידטיביות. בנוסף הראנו שחלבוני עקת חום קטנים מצטברים בשלבי ההתפתחות המאוחרים של פירות עגבנייה, במקביל לתהליך האדמת הפרי והבשלתו. מטרת המחקר היו לאפיין את הגן *LeHSP21* והבקרה שלו, לברר את תפקידו בהתפתחות פרי העגבנייה ובהגנה מפני עקות ולזהות את חלבוני המטרה שלו. במחקר זה בחרנו להשתמש בעגבנייה מין Microtom כמערכת המודל. הראנו שהחלבון LeHSP21 מצטבר בכלורופלסטים ונמצא תחת בקרה לא ישירה של הגן RIN המעורב בבקרת התפתחות הפרי. על מנת לנסות ולאתר חלבוני שעתוק (HSF) המפעילים באופן ישיר את הגן *LeHSP21* בפרי, ערכנו אנליזות microarray וזיהינו את הגן המקודד לחלבון השעתוק LeHSF אשר פועל בפרי ומבוקר ע"י RIN. בודדנו את הפרומוטור של הגן *LeHSP21*, חיברנו אותו לגן המדווח *GUS*, יצרנו צמחי עגבנייה טרנסגנים המבטאים את גן הכימרי והראנו הפעלה ע"י חום. ערכנו אנליזות 2-D לחלבוני פרי ועלה בהם הושתק הגן *LeHSP21* במטרה לזהות חלבונים המוגנים במהלך עקת חום ע"י *LeHSP21* וזיהינו מספר קנדידיטים. יצרנו צמחי Microtom טרנסגנים בהם הגן *LeHSP21* מבוטא ביתר וכן צמחים בהם עוכב ביטוי הגן (RNAi) ואפינו אותם מולקולרית ופיזיולוגית. בדקנו את עמידותם של הצמחים הטרנסגנים לעקות פוטואוקסידטיביות וכן את השפעת שינוי ביטוי הגן *LeHSP21* על התפתחות והאדמת הפרי. תוצאות הניסויים הראו שבשונה מצמחים טרנסגנים של הזן VF36 אשר נבדקו בעבודה קודמת והראו עמידות לעקות וזירוז בהאדמת הפרי כתוצאה מביטוי ביתר של הגן, שינוי בביטוי הגן (עליה או ירידה) בצמחי Microtom כמעט ולא השפיע על תהליכים אלה. על מנת לברר את הסיבה לכך, השונו את עמידותם של הזנים השונים לעקות שונות ומצאנו ש-Microtom עמיד יותר. יתכן שהמחסור בהורמון ברסינוסטרואיד בזן Microtom (מוטנט ליצור ההורמון) מעניק עמידות לצמח ולכן ההבדל הגדול שנמצא בתגובה לשינויים ברמת החלבון *LeHSP21* בהשוואה לזן נורמלי. למרות שתקופת המימון הסתיימה אנו ממשיכים במחקר ופועלים להשלמת אפיון הפרומוטור ובקרתו, לבירור פעולתו של חלבון השעתוק HSF שזוהה ולזיהוי חלבוני מטרה של *LeHSP21*.

ביטוי חלבוני עקת חום קטנים לעידוד הבשלת פרי העגבנייה לאחר קטיפה והקניית עמידות לפרי ולצמח
כנגד עקות שונות

The use of tomato small HSPs to promote fruit ripening under normal and stress conditions

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ע"י פרופ' דוד וייס¹, דר' סוזן לוריא² ודר' אסף
אהרונים³

¹הפקולטה לחקלאות, המכון למדעי הצמח וגנטיקה בחקלאות

²מחלקה לאיחסון, מכון וולקני

³מדעי הצמח, מכון וייצמן

Submitted by David Weiss, Susan Lurie and Asaph Aharoni

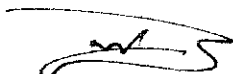
PI- David Weiss, The Robert H. Smith Institute of Plant Sciences and Genetics in
Agriculture , Faculty of Agricultural, Food and Environmental Quality Sciences,
Rehovot.

Tel. 08-9489436

Fax. 08-9468263

E-mail weiss@agri.huji.ac.il

הממצאים בדו"ח זה הנם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים
חתימת החוקר



רשימת פרסומים

חלק מתוצאות המחקר נכללו במאמר:

Neta-Sharir I., Isaacson T., Lurie S. and Weiss D. (2005) Dual role for
tomato HSP21: protecting photosystem II from oxidative stress and
promoting color changes during fruit maturation. **The Plant Cell** 17: 1829-
1838.

תקציר

חלבוני עקת חום קטנים (smHSP) מעורבים בתהליכי התגוננות של הצמח בפני עקות שונות. בעבודה קודמת הראנו שלחלבון הכלורופלסטי LeHSP21 מעגבנייה, תפקיד בהגנה על מערכת הובלת האלקטרונים PSII מפני עקות פוטואוקסידטיביות. בנוסף הראנו שחלבוני עקת חום קטנים מצטברים בשלבי ההתפתחות המאוחרים של פירות עגבנייה, במקביל לתהליך האדמת הפרי והבשלתו. מטרות המחקר היו לאפיין את הגן *LeHSP21* והבקרה שלו, לברר את תפקידו בהתפתחות פרי העגבנייה ובהגנה מפני עקות ולזהות את חלבוני המטרה שלו. במחקר זה בחרנו להשתמש בעגבנייה מזן Microtom כמערכת המודל. הראנו שהחלבון LeHSP21 מצטבר בכלורופלסטים ונמצא תחת בקרה לא ישירה של הגן RIN המעורב בבקרת ההתפתחות הפרי. על מנת לנסות ולאתר חלבוני שעתוק (HSF) המפעילים באופן ישיר את הגן *LeHSP21* בפרי, ערכנו אנליזות microarray וזיהינו את הגן המקודד לחלבון השעתוק LeHSF אשר פועל בפרי ומבוקר ע"י RIN. בודדנו את הפרומוטור של הגן *LeHSP21*, חיברנו אותו לגן המדווח *GUS*, יצרנו צמחי עגבנייה טרנסגנים המבטאים את גן הכימרי והראנו הפעלה ע"י חום. ערכנו אנליזות 2-D לחלבוני פרי ועלה בהם הושק הגן *LeHSP21* במטרה לזהות חלבונים המוגנים במהלך עקת חום ע"י *LeHSP21* וזיהינו מספר קנדיטים. יצרנו צמחי Microtom טרנסגנים בהם הגן *LeHSP21* מבוטא ביתר וכן צמחים בהם עוכב ביטוי הגן (RNAi) ואפינו אותם מולקולרית ופיזיולוגית. בדקנו את עמידותם של הצמחים הטרנסגנים לעקות פוטואוקסידטיביות וכן את השפעת שינוי ביטוי הגן *LeHSP21* על ההתפתחות והאדמת הפרי. תוצאות הניסויים הראו שבשונה מצמחים טרנסגנים של הזן VF36 אשר נבדקו בעבודה קודמת והראו עמידות לעקות וזירוז בהאדמת הפרי כתוצאה מביטוי ביתר של הגן, שינוי בביטוי הגן (עליה או ירידה) בצמחי Microtom כמעט ולא השפיע על תהליכים אלה. על מנת לברר את הסיבה לכך, השונו את עמידותם של הזנים השונים לעקות שונות ומצאנו ש-Microtom עמיד יותר. יתכן שהמחסור בהורמון ברסינוסטרואיד בון Microtom (מוטנט ליצור ההורמון) מעניק עמידות לצמח ולכן ההבדל הגדול שנמצא בתגובה לשינויים ברמת החלבון *LeHSP21* בהשוואה לזן נורמלי. למרות שתקופת המימון הסתיימה אנו ממשיכים במחקר ופועלים להשלמת אפיון הפרומוטור ובקרתו, לבירור פעולתו של חלבון השעתוק HSF שזוהה ולזיהוי חלבוני מטרה של *LeHSP21*.

חשיפת צמחים לעקת חום גורמת להופעת חלבונים חדשים הנקראים חלבוני עקת חום או Heat Shock Proteins (HSP). חלבונים אלה מגנים על התא הצמחי מפני נזקי העקה. ניתן לחלק את חלבוני עקת החום לגדולים וקטנים (משקל מולקולרי). בצמחים בניגוד לבעלי חיים חלבוני עקת החום הקטנים הם הדומיננטיים ביותר ומופיעים בכמויות גדולות לאחר עקת החום. ניתן לחלק את חלבוני עקת החום הקטנים לשש קבוצות: 2 קבוצות של חלבונים ציטוזוליים, קבוצה של חלבוני גרעין, קבוצה של חלבוני ER, אחת של חלבוני מיטוכונדריה וקבוצה אחת של חלבונים כלורופלסטים. פעילותם השפרונית של חלבוני עקת חום רבים הוכחה *in vitro* אך למרות זאת מעט מאוד ידוע על מנגנון פעולתם *in vivo*. כאמור, הביטוי של הגנים המקודדים לחלבוני עקת חום קטנים מופעל בעקבות עקת חום אך חלקם מתבטא גם בתנאי גידול נורמאליים בתהליכי התפתחות ספציפיים. בניגוד למחקר המקיף על תפקידם של חלבוני עקת חום קטנים בהגנה בפני עקות, לא ידוע דבר על תפקידם בתהליכי ההתפתחות של הצמח. בפירות עגבייה מצטברים חלבוני עקת חום קטנים בשלבי ההתפתחות המאוחרים (בשלב ה-Turning), במקביל לתהליך האדמת הפרי והבשלתו. נמצאו מספר גנים המקודדים לחלבוני עקת חום קטנים שביטויים עולה בפרי המתפתח, כולל כאלה המקודדים לחלבונים הציטוזוליים *LeHsp17.3*, *LeHsp17.7* ו-*Tom66* וכן לחלבון הכלורופלסטי *LeHsp21*. החלבון הכלורופלסטי מופיע בפלסטידה במקביל לשינוי והמעבר מכלורופלסט בפרי הירוק לכרומופלסט בפרי האדום.

פירות עגבייה ירוקים מבשילים לאחר קטיף באופן נורמאלי על המדף. אולם אם הם מאוחסנים לתקופה ממושכת (מעל שבועיים) בקור, הם סובלים לאחר העברה לטמפרטורת החדר מנזקי צינה, כולל עיכוב הבשלה על המדף. בעבודה שערכנו בעבר נמצא שחשיפת פירות עגבייה ירוקים קטופים לעקת חום מתונה מונעת את נזקי הצינה לאחר אחסון הקור ומאפשרת הבשלה תקינה של הפרי על המדף. טיפול החום גרם להפעלתם של גנים המקודדים לחלבוני עקת חום קטנים (*Tom66* הציטוזולי ו-*LeHsp21* הכלורופלסטי) אשר ביטויים נמשך במהלך הקירור וגם לאחר העברתם לטמפרטורת החדר. הקורלציה בין ביטוי הגנים והתפתחות הפרי על הצמח ולאחר הקירור העלתה את ההשערה שייתכן ויש להם תפקיד בהתפתחות הפרי. בעבודה שנערכה לאחרונה במעבדתנו יצרנו צמחי עגבייה מהזן VF36 טרנסגנים המבטאים ביתר את הגן המקודד ל-*LeHsp21* הכלורופלסטי. מצאנו, שביטוי הטרנסגן בעלים מעניק עמידות למערכת הפוטוסינטטית (PSII) כנגד נזקי חמצון הנגרמים מעקה משולבת של טמפרטורה קיצונית ואור. בנוסף, מצאנו שהפירות הטרנסגנים מאדימים על הצמח לפני פירות הביקורת. יתרה מכך, כאשר אוחסנו פירות ירוקים מהצמחים הטרנסגנים ומצמחי הביקורת בקור, פירות הביקורת נשארו ירוקים לאחר העברה לטמפרטורת החדר, בעוד שהפירות הטרנסגנים האדימו. תוצאות אלה מצביעות על תפקיד אפשרי לחלבון עקת החום הכלורופלסטי בהתפתחות הפלסטידה והמעבר מכלורופלסט לכרומופלסט. כאמור, מלבד החלבון הכלורופלסטי, חלבוני עקת חום נוספים מופעלים במהלך הבשלת הפרי. יתכן שגם לחלבונים אלה תפקיד בתהליך הבשלת הפרי. הצעת מחקר זו באה לבדוק השערה זו וכן לפתח צמחים אשר יבטאו את הגנים השונים באופן קבוע וכך יעניקו לצמח עמידות כנגד עקות ובנוסף יאפשרו הבשלת פרי נורמאלית לאחר אחסון ממושך בקור.

אפיון כימי של פירות טרנסגנים המבטאים ביתר את הגן LeHSP21

את העבודה התחלנו באפיון הצמחים הטרנסגנים מהזן VF36 אשר מבטאים ביתר את הגן הכלורופלסטי LeHSP21. צמחים אלה הוכנו ונלמדו קודם לתחילת מחקר זה. מחקר זה הראה שהפירות הטרנסגנים מקדימים להאדים וכן לא דורשים חימום על מנת להאדים לאחר אחסון בקור. בכדי לברר מהם הפיגמנטים המצטברים בפירות הטרנסגנים ערכנו אנליזות כימיות לבירור הפיגמנטים המופיעים ומצטברים בפירות העגבנייה. כאמור הפירות הטרנסגנים הקדימו להאדים בהשוואה לפירות הביקורת. אנו ערכנו מיצוי פיגמנטים בשתי נקודות זמן במהלך ההבשלה, 40 ו- 50 ימים לאחר אנטזיס, ואפיינו את הפיגמנטים המצטברים.

Type of carotenoid	Distribution of carotenoid (% of total)			
	Days from anthesis			
	40	50	40	50
	control	T4-311	control	T4-311
Phytoene	n.d.	n.d.	12.6	12.4
phytofluene	n.d.	n.d.	7.4	6.4
β -carotene	n.d.	n.d.	9.5	1.0
ζ -carotene	n.d.	n.d.	1.6	1.2
γ -carotene	n.d.	n.d.	0.3	n.d.
Neurosporene	n.d.	n.d.	2.5	0.9
Lycopene	n.d.	n.d.	61.6	77.4
Lutein	86.8	87.2	4.3	0.7
Violaxanthin	7.2	7.0	0.2	n.d.
Neoxanthin	6.0	5.8	n.d.	n.d.
total carotenoid ($\mu\text{g}/\text{gr fw}$)	1.73 ± 0.49	2.21 ± 0.29	3.81 ± 1.52	44.4 ± 1.0

טבלה 1. אנליזה של קרוטנואידים שמוצו מפירות עגבנייה טרנסגנים המבטאים ביתר את הגן LeHSP21 ומפירות ביקורת. הפיגמנטים מוצו מפירות שנקטפו מצמחים טרנסגנים דור רביעי (T-4) ומצמחי ביקורת VF-36 40 או 50 ימים לאחר אנטזיס. כמותם הכללית של הקרוטנואידים נמדדה בספקטרופוטומטר ולאחר מכן הם אופיינו בעזרת HPLC.

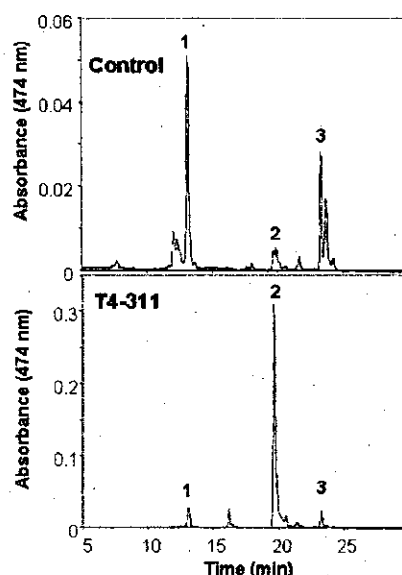
תוצאות האנליזה מראות שלאחר 40 ימים אין הבדל ברמת הקרוטנואידים בפירות הביקורת והטרנסגנים ושניהם מכילים בעיקר lutein. חמישים ימים לאחר אנטזיס רמת הקרוטנואידים בפירות הטרנסגנים הייתה גבוהה פי 10 מזו שנמדדה בפירות הביקורת, אך ההתפלגות של הפיגמנטים הייתה דומה. הפיגמנט העיקרי שנמצא היה lycopene. תוצאות אלה מראות שהטרנסגן לא השפיע על סוג הפיגמנט המצטבר אלא על מועד הופעתו, כלומר הוא גרם להקדמת צבירת ה- lycopene האדום.

בשלב הבא אפיינו את הפיגמנטים המופיעים לאחר אחסון בקור. כאמור הראנו, שבניגוד לפירות הביקורת, הפירות הטרנסגנים מסוגלים להאדים לאחר אחסון ממושך בקור. פירות ביקורת (VF-36) וטרנסגנים נקטפו בשלב ירוק בוגר (mature green), אוחסנו למשך שבועיים ב-2 מצ' ולאחר מכן הועברו לטמפרטורת חדר. פיגמנטים מוצו מיד עם הקטיף (לפני טיפול הקור) ושבעה ימים לאחר העברה לטמפרטורת החדר ונערכה אנליזה ב-HPLC.

Distribution of carotenoid (% of total)				
Type of carotenoid	At harvest (Mature Green)		7 days after cold storage	
	control	T4-311	control	T4-311
Phytoene	n.d.	n.d.	4.8	12.5
phytofluene	n.d.	n.d.	2.7	5.9
β -carotene	n.d.	n.d.	34.7	5.9
ζ -carotene	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
γ -carotene	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Neurosporene	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Lycopene	n.d.	n.d.	16.6	68.3
Lutein	86.3	86.1	41.2	7.4
Violaxanthin	7.5	7.6	n.d.	n.d.
Neoxanthin	6.2	6.3	n.d.	n.d.
total carotenoid ($\mu\text{g}/\text{gr fw}$)	1.76 ± 0.52	2.21 ± 0.31	1.53 ± 0.3	11.89 ± 1.1

טבלה 2. פיגמנטים מפירות בוגרים ירוקים (mature green) שנקטפו מצמחים טרנסגנים המבטאים ביתר את הגן LeHSP21 ומצמחי ביקורת VF-36 לפני אחסון קור (שבועיים ב-2 מצ') ושבעה ימים לאחר העברה מהקור לטמפרטורת חדר. כמותם הכללית של הקרוטנואידים נמדדה בספקטרופוטומטר ולאחר מכן הם אופיינו בעזרת HPLC.

תוצאות האנליזה מראות הבדלים ברורים ברמה הכללית של הקרוטנואידים לאחר האחסון בקור (פי 10 יותר בפירות הטרנסגנים). בנוסף, ניתן לראות שהפירות הטרנסגנים, אבל לא פירות הביקורת, צברו רמות גבוהות יחסית של lycopene. בפירות הביקורת אנו רואים רמות גבוהות יחסית של lutein ו- β -carotene. תוצאות אלה מראות שהחלבון LeHSP21 (אשר ביטוי הנורמאלי מעוכב בפירות הביקורת ע"י טיפול הקור) דרוש על מנת לאפשר הצטברות של הפיגמנט האדום lycopene.

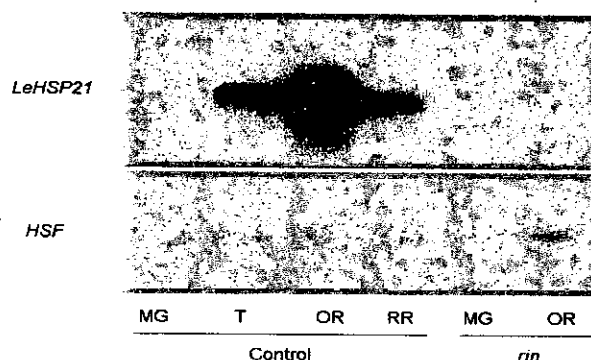


איור 1. אנליזת HPLC של קרטנואידים שמוצו הפירות ביקורת וטרנסגנים המבטאים ביתר את הגן *LeHSP21* שבוע לאחר העברה מטיפול קור לטמפרטורת החדר.

בקרת הביטוי של הגן *LeHSP21* במהלך התפתחות הפרי

בכדי ללמוד על הבקרה של הגן *LeHSP21*, במהלך התפתחות הפרי, בדקנו את ביטוי במוטנט *rin*. מוטנט זה, הפגוע בגן *LeMADS-RIN* אינו מבשיל. חלבון זה פועל במסלול שאינו תלוי באתילן ומבקר גנים שונים הקשורים לתהליך הבשלת הפרי. בנוסף, בכדי לנסות ולברר האם הגן *LeHSP21* מופעל בפרי במסלול העקה או כחלק מתהליך התפתחות הפרי בדקנו גם את ביטוי של חלבון השעתוק *HSF6*. חלבון זה מעורב בהפעלת *HSPs* שונים בעקבות עקת חום. סריקה וניתוח של בסיס נתונים לביטוי גנים בעגבנייה (תוצאות microarray) הראו כי הגן המקודד לחלבון השעתוק מתבטא בפרי, וביטוי עולה במהלך ההבשלה.

תוצאות ה- northern חוזרות ומראות שהגן *LeHSP21* מופעל בשלב ה- turning וביטוי מגיע לשיא במהלך ההבשלה. במוטנט *rin* הגן מתבטא ברמה נמוכה ביותר, כלומר הוא נמצא תחת בקרת RIN (ישירה או עקיפה). הביטוי של פקטור השעתוק *HSF6* בדומה ל- *LeHSP21* מופעל במהלך התפתחות הפרי, במקביל להופעת הצבע ולתהליך ההבשלה, אך בשונה מ- *LeHSP21* ביטוי לא מעוכב במוטנט *rin*. תוצאה זו מראה ש- *LeHSP21* כנראה לא מבוקר ע"י *HSF6* במהלך הבשלת הפרי.



איור 2. ביטוי הגנים *LeHSP21* ו-*HSF6* במהלך הבשלת פרי העגבנייה. האנליזה נערכה לפירות מצמחי ביקורת MicroTom ומהמוטנט *rin*. פירות נקטפו בשלבי התפתחות שונים: MG- MG- red ripe, OR- orange ripe, T- turning, mature green, RR- red ripe.

בכדי לבדוק האם העיכוב בצבירת ליקופן בפירות *rin* נובע מעיכוב בביטוי *HSP21*, יצרנו צמחי *rin* טרנסגנים המבטאים את הגן *HSP21* תחת בקרת הפרומוטר *35S*. בבחינה ראשונית של הצמחים הטרנסגנים לא מצאנו כל השפעה לביטוי ביתר של הגן על האדמת הפרי. תוצאה זו לא מפתיעה כיוון שחוסר ב- *RIN* מביא לעיכוב כללי בהשלה ולכן גם ביצירת הפיגמנטים, בעוד שהנחת המחקר שלנו היא שלחלבון *HSP21* אין תפקיד בהפעלת המערכת ליצירת הצבע, אלא הוא פועל כחלק ממערכת הגנה על האנזימים המעורבים בסיתות הקרוטנואידים. לכן אם אין הפעלה של המערכת ליצירת הצבע, ביטוי של *HSP21* לא ישפיע על התהליך.

בידוד פרומוטר הגן *LeHSP21* - בכדי ללמוד על בקרת הביטוי של הגן *LeHSP21* ולאתר אלמנטים המעורבים בתהליך, בודדנו את הפרומוטר של הגן. הפרומוטר בודד בעזרת הקיט *GenomeWalker™ Kits*. חלק הפרומוטר שבודד הוא באורך של 3729 בסיסים. אנליזה של רצף הפרומוטר מראה על קיומם של מספר *cis elements* ידועים הקושרים חלבוני שעתוק הקשורים לעקת חום (*heat shock factors-HSF*) וכן גם אתרי תגובה לעקת קור (איור 6).

Site Name	Organism	Position	Strand	Matrix score.	sequence	function
<u>LTR</u>	Hordeum vulgare	2393	+	6	CCGAAA	cis-acting element involved in low-temperature
<u>LTR</u>	Hordeum vulgare	3333	-	6	CCGAAA	cis-acting element involved in low-temperature
<u>LTR</u>	Hordeum vulgare	3250	+	6	CCGAAA	cis-acting element involved in low-temperature

SE

Site Name	Organism	Position	Strand	Matrix score.	sequence	function
<u>HSE</u>	Brassica oleracea	1647	-	9	AAAAAATTTC	cis-acting element involved in heat stress
<u>HSE</u>	Brassica oleracea	3416	-	9	AAAAAATTTC	cis-acting element involved in heat stress
<u>HSE</u>	Brassica oleracea	1194	-	9	AGAAAATTTCG	cis-acting element involved in heat stress
<u>HSE</u>	Brassica oleracea	2914	-	9	AAAAAATTTC	cis-acting element involved in heat stress

טבלה 3. אנליזת ממוחשבת של הפרומוטר *HSP21* לזיהוי אלמנטים המעורבים בתגובה לעקת חום (*HSE*) וקור (*LTR*). האנליזה נעשתה תוך שימוש בתוכנה שבאתר:

<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>

זיהוי חלבוני שעתוק המבוקרים ע"י הגן RIN ומבקרים את הגן *LeHSP21*

כאמור הגן *LeHSP21* מבוקר ע"י חלבון השעתוק RIN. כיוון ש-RIN מבקר באופן כללי את תהליך ההתפתחות של הפרי, לא סביר שהוא מבקר באופן ישיר את הגן *LeHSP21* אלא מבקר חלבון שיעתוק ספציפי לחלבוני עקת חום. על מנת לנסות ולאתר חלבון שכזה ערכנו אנליזה Microarray להשוואת ביטוי גנים בפירות צמח ה-Microtom (Custom Tomato Gene Expression DNA chips Array AMADID: 19003) המכילים 44000 רצפים שונים מעגבנייה (כ-20000 גנים). באנליזה זו זיהינו 15 רצפים החשודים כחלבוני שעתוק אשר ביטויים יורד במוטנט. מבין הגנים שזוהו אחד מכיל את האתר השמור בחלבוני HSF. הביטוי של גן זה ילמד בהמשך העבודה. בנוסף ננסה לבדוק האם החלבון המקודד נקשר לפרומוטר של הגן *LeHSP21* (ראה בהמשך) ע"י שימוש בטכניקת one hybrid וכן האם הוא מפעיל אותו ע"י co-expression של החלבון HSF וגן כימרי המכיל את הפרומוטר של *LeHSP21* מחובר לגן מדווח.

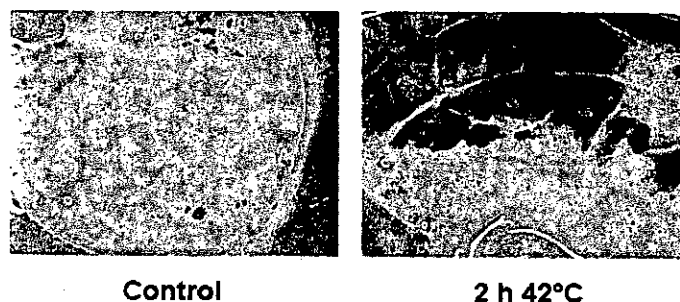
ratio	Common	Synonyms
0.41	TC170872	MBK5.26
0.20	TC170944	F15H21.12
0.46	TC177492	AGAMOUS-LIKE 8
0.369	BE431876	FLORAL HOMEOTIC PROTEIN APETALA 2 ;
0.46	TC170121	F14M13.17
0.28	TC184175	HSF
0.411	TC173970	NAC-LIKE

טבלה 4. גנים המקודדים לחלבוני שעתוק אשר ביטויים יורד במוטנט rin. הגן המקודד ל-HSF מודגש.

יצירת צמחי עגבניה טרנסגנים עם הגן הכימרי *pLeHSP21:GUS*

בכדי ללמוד על בקרת הפרומוטר של הגן, יצרנו צמחי עגבניה טרנסגנים עם הגן המדווח GUS תחת בקרת הפרומוטר השלם של הגן *HSP21*. בכדי לבדוק את פעילות הפרומוטר חשפנו עלים מנותקים לטמפרטורה של 42 מ"צ למשך שעותיים. עלי הביקורת מהצמחים הטרנסגנים נשארו בטמפרטורת החדר (25 מ"צ). עשרים וארבע שעות לאחר סיום עקת החום העלים נלקחו לצביעה לבדיקת פעילות GUS. תוצאות הצביעה (איור X) מראות שהפרומוטר אכן פעיל ומגיב לעקת חום.

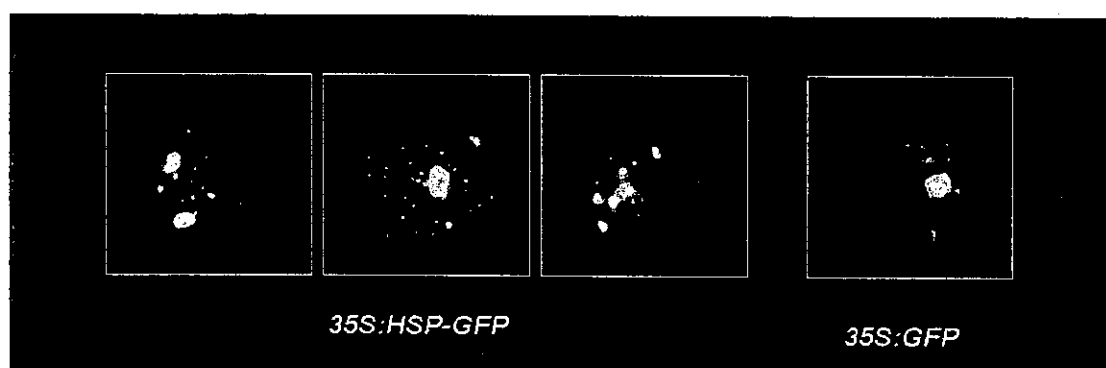
pHSP21:GUS



איור 3. עלים טרנסגניים עם הקונסטראקט pHSP21:GUS עם וללא טיפול חום. פעילות GUS נמצאה לאחר טיפול החום.

בירור מיקומו של החלבון LeHSP21 בתא

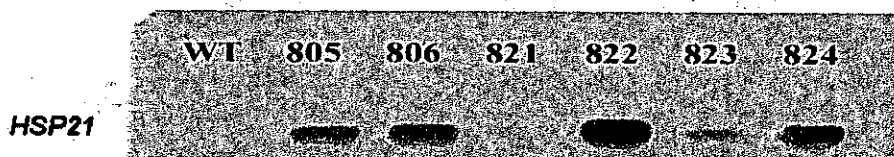
כל העדויות על מיקומו הכלורופלסטי של החלבון LeHSP21 התבססו על פרקציונציות ודיסקציות תוך שימוש בנוגדן. אנו בחנו את מיקומו של החלבון ע"י חיבורו של הגן לגן מדווח GFP והחדרת הקונסטראקט כולו תחת בקרת הפרומוטר 35S בתחילה לפרוטופלסטים ולאחר מכן לצמחים טרנסגניים. פרוטופלסטים הוכנו מעלים צעירים והקונסטראקט הוחדר באמצעות PEG. ביטוי הקונסטראקט בפרוטופלסטים הראה שאכן החלבון הכימרי מצטבר בפלסטידות של התא (איור X). אולם מהתמונות נראה שההצטברות היא באזורים ספציפיים של הכלורופלסט. בכדי לבדוק היכן בפרוטופלסט מצטבר החלבון, יצרנו לאחרונה צמחי ארבידופסיס טרנסגניים המבטאים את חלבון העגבנייה LeHSP21 מאותה ל-GFP, תחת בקרת הפרומוטר 35S. צמחים אלה ישמשו כעת ליצירת חתכים ללימוד מיקרוסקופי של מיקום החלבון באורגנלה תוך שימוש בנוגדן ספציפי ל-GFP (immunolocalization).



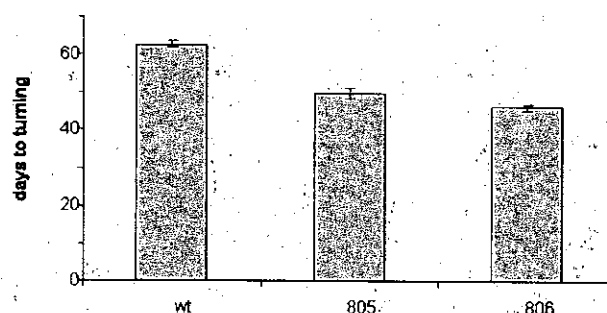
איור 4- מיקום החלבון LeHSP21 בכלורופלסטים. פרוטופלסטים הוכנו מתאי מזופיל של עלי ארבידופסיס והגן בכימרי LeHSP21-GFP מעגבנייה תחת בקרת הפרומוטר 35S הוחדר לביטוי חולף. מיקום החלבון הכימרי אופיין תוך שימוש במיקרוסקופ פלואורנסטי. כביקורת הוחדר בגן ל-GFP תחת בקרת הפרומוטר 35S.

לימוד תפקידו של החלבון LeHSP21 בעגבנייה מזן Microtom

ביטוי ביתר של הגן *LeHSP21* בזן *Microtom* - כיוון שזן העגבנייה הגדול VF36 אינו נוח לעבודה, רצינו לערוך את המחקר כולו בזן הננסי *Microtom*. זן זה פגוע לפחות בשני גנים אשר גורמים לפריחה מסיימת ולננסות. הננסות נגרמת כתוצאה מפגיעה בייצור ההורמון ברסינוסטרואיד. בשלב הראשון רצינו לבדוק האם החלבון HSP21 משפיע על התפתחות הפרי בזן הננסי בדומה להשפעתו בזן VF36. ייצרנו צמחים טרנסגנים של הזן *Microtom* אשר מבטאים ביתר את הגן *HSP21* (תחת בקרת הפרומוטר 35S). לאחר אישור לביטוי ביתר של הגן (איור 1) ערכנו הכלאות עצמיות וייצרנו קווי T1 ולאחר בדיקת ביטוי והוכחה שאכן הצמחים מבטאים ביתר את הגן עקבנו אחר התפתחות הפרי. פרחים סומנו באנטזיס והזמן עד לשלב שינוי הצבע (turning) נבדק. ניסוי זה נערך מספר פעמים במשך שנתיים, בתקופות השנה השונות בדורות שונים של הצמחים הטרנסגנים. למרות שבחלק מהניסויים התוצאות הראו שבדומה לפירות הטרנסגנים של הזן VF36 גם פירות *Microtom* המבטאים ביתר את הגן *LeHSP21* מקדימים בהאדמה וצבירת ליקופן (איור 2), בניסויים אחרים לא ראינו את התופעה, כך שהשפעת הטרנסגן ברקע גנטי זה על התפתחות הפרי עדיין לא ברורה.



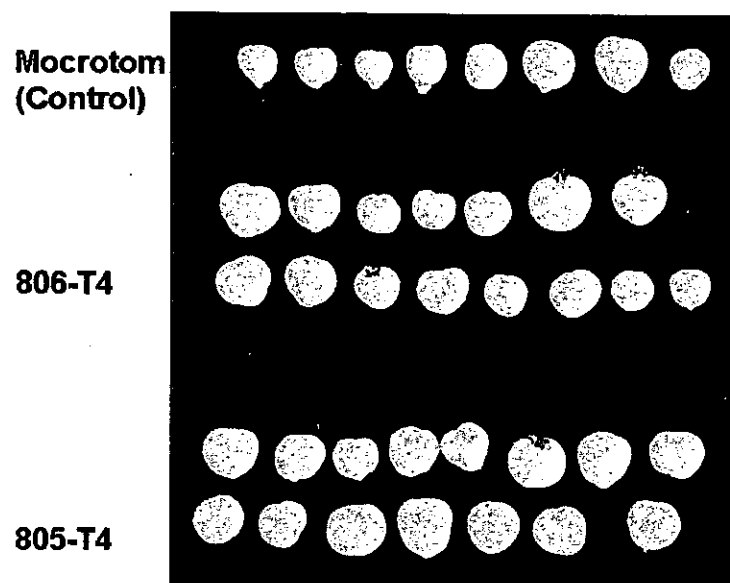
איור 5. ביטוי ביתר של הגן *LeHSP21* בקווים טרנסגנים שונים של *Microtom*. RNA הופק מעלים של צמחי ביקורת וקווים טרנסגנים בלתי תלויים ונערכה אנליזה לביטוי הגן *LeHSP21*.



איור 6. ביטוי ביתר של הגן *LeHSP21* ב-*Microtom* גורם להקדמה בהופעת הצבע בפרי. פרחים בצמחי ביקורת ובצמחים טרנסגנים המבטאים ביתר את הגן *LeHSP21* סומנו בשלב אנטזיס ומספר הימים עד שלב ה-Turning (הופעת הצבע) נספר.

השפעת ביטוי ביתר של הגן *LeHSP21* על האדמת הפרי לאחר קירור ממושך

בעבודה קודמת הראנו שפירות טרנסגנים של עגבנייה VF36 אשר מבטאים ביתר את הגן *LeHSP21*, אך לא פירות ביקורת, מאדימים לאחר אחסון בקור ללא דרישה לחימום מוקדם. אנו בדקנו האם גם פירות עגבנייה מהזן Microtom אשר מבטאים ביתר את הגן מאדימים לאחר איחסון קור. פירות אוחסנו למשך שלושה שבועות ב-2 מ"צ ולאחר מכן הועברו לטמפרטורת החדר ואחרי שבעה ימים נוספים נבדקה ההאדמה. תוצאות הניסוי מראות שגם חלק מפירות הביקורת וגם הפירות הטרנסגנים מאדימים (איור 7). כ-30% מפירות הביקורת ומפירות הקו הטרנסגני 806 נמצאו לאחר שבעה ימים בשלבי האדמה שונים. בקו הטרנסגני 805 נמצאו כ-60% מהפירות בשלבי האדמה שונים. תוצאה זו מראה שפירות הזן Microtom עמידים יותר מפירות VF36 לתנאי קור ולכן כנראה השפעת הטרנסגן לא בולטת.

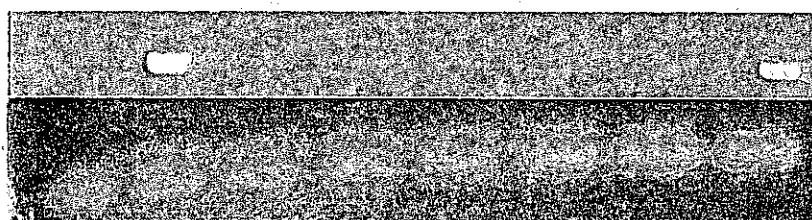


איור 7. פירות ביקורת (Microtom) וטרנסגנים משני קוים המבטאים ביתר את הגן *LeHSP21* אשר אוחסנו בקור (2 מ"צ) למשך שלושה שבועות ולאחר מכן שהו במשך 7 ימים בטמפרטורת החדר. בתמונה מוצגים פירות שונים שעברו את הטיפול.

עיכוב ביטוי הגן *LeHSP21* - לשם לימוד מעמיק יותר על תפקידו של החלבון *LeHSP21* בהתפתחות הפרי ובהקניית עמידות לצמחים כנגד עקות סביבה, התחלנו לבדוק כיצד משפיע חוסר בחלבון על תהליכים אלה. לשם כך בנינו קונסטראקט RNAi של רצף הגן ויצרנו צמחי Microtom טרנסגנים. בכדי לבדוק את השתקת הגן לקחנו עלים טרנסגנים ועלי ביקורת חשפנו אותם לעקת חום (42 מ"צ) לשעתיים ובדקנו את ביטוי הגן ב-RT-PCR. תוצאות האנליזה הראו ביטוי גבוה של הגן בעלי הביקורת לאחר עקת החום, והשתקה חזקה של הגן בחלק מהקווים הטרנסגנים (איור 7). קווים אלה נבחרו להמשך עבודה.

LeHSP21

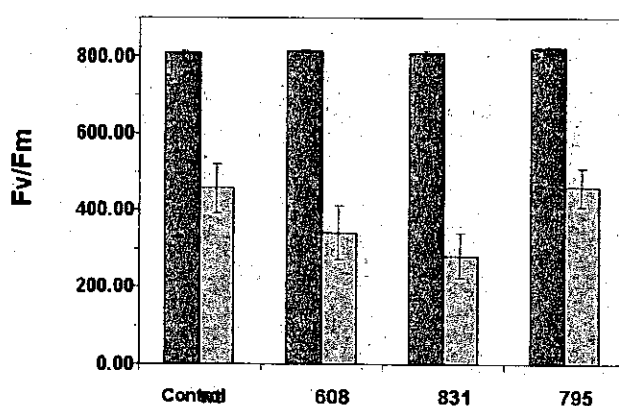
TUB



608 736 793 734 810 665 795 Microtom (control)

איור 8. אנליזת RT-PCR לביטוי הגן *LeHSP21* בצמחי ביקורת וצמחים טרנסגנים להם הוחדר רצף ה-RNAi. השפעת עיכוב הגן *LeHSP21* על פעילות מערכת הובלת האלקטרונים PSII בעקבות עקה אוקסידטיבית

בעבודה קודמת הראנו שלחלבון *LeHSP21* יש תפקיד בהגנה על הרקמה מפני נזקים פוטואוקסידטיביים. נזקים אלה מתקבלים בין השאר בתנאים של קור משולב בהארה בעוצמות גבוהות. בתנאים אלה החלבון מגן על מערכת העברת האלקטרונים ב-PSII. אנו בדקנו האם החלבון משפיע באופן דומה גם בצמחים טרנסגנים של *Microtom* בהם עוכב ביטוי הגן. נבדקה הפגיעה במעבר האלקטרונים ב-PSII בעקבות חשיפה לחום ולאחר מכן לאור גבוה. עלים של צמחי ביקורת וצמחים טרנסגנים בהם הושתק הגן *LeHSP21* שחו במשך שעתיים בחום של 42°C ולאחר מכן מכן נחשפו ל-8 דקות אור $2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. פלורסנציית כלורופיל נמדדה על ידי מכשיר PAM המודד את הערך המינימלי של פלורסנציית הכלורופיל (F_0) והערך המקסימאלי (F_m) המתקבל על ידי הארה המרווה את מקבלי האלקטרונים ב-PSII. הערך המתקבל מחושב לפי: $F_m - F_0 / F_m = F_v / F_m$.

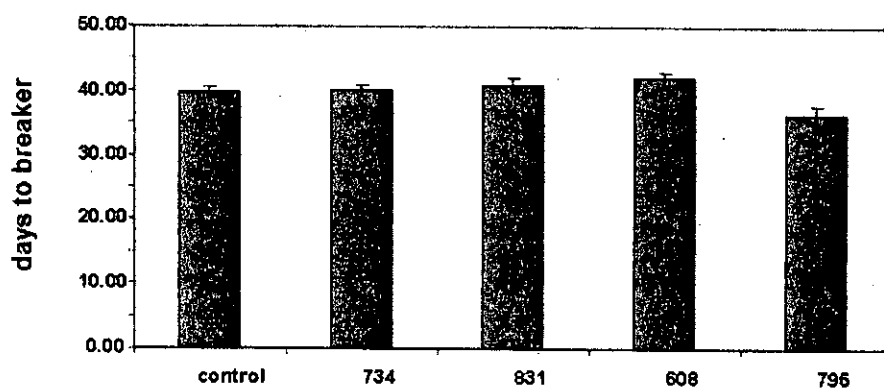


איור 9. פעילות מערכת PSII לפני (עמודות שחורות) ואחרי עקת חום (42°C מ"צ למשך) ואור (עמודות אפורות) בצמחי *Microtom* ביקורת וצמחים טרנסגנים בהם עוכב ביטוי הגן *LeHSP21* (קווים 608, 831 ו-795).

תוצאות ניסויים אלה הראו שעייכוב הביטוי של הגן LeHSP21 לא גרם להגברת הרגישות של מערכת הובלת האלקטרונים PSII לעקת חימצון. העקה המשולבת של חום ואור (עקה פוטואוקסידטיבית) הביאה לעייכוב דומה בפעילות המערכת בצמחי הביקורת ובצמחים טרנסגנים.

השפעת עייכוב הגן LeHSP21 על קצב האדמת הפרי

בעבודה הקודמת הראנו שהגברת פעילות הגן LeHSP21 בצמחי עגבנייה VF36 הביאה לזירוז קצב האדמת הפרי ולצבירה מוקדמת של קרוטנואידים (ראה חלק ראשון של הדו"ח). אנו בדקנו האם ירידה בפעילותו של הגן בצמחי Microtom גורמת להאטה בקצב האדמת הפירות. לשם כך, פרחים סומנו בשלב אנטזיס ומספר הימים עד שלב תחילת שינוי הצבע (Turning/Breaker).

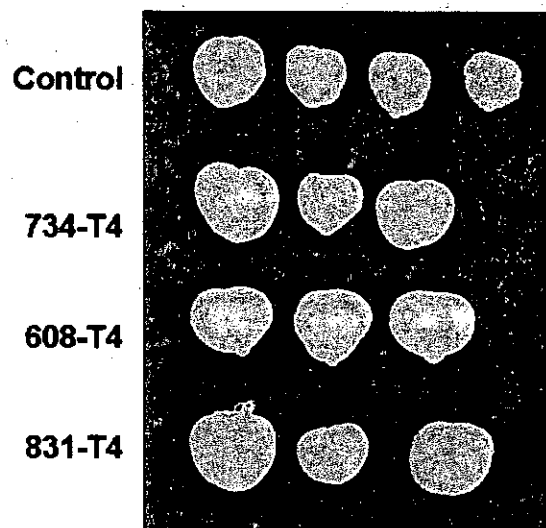


איור 10. עייכוב ביטוי הגן LeHSP21 לא גורם לעייכוב האדמת הפרי. פרחים מצמחי ביקורת (Microtom) וממספר קוים טרנסגנים בהם עוכב ביטוי הגן LeHSP21 סומנו בשלב אנטזיס והימים עד שלב תחילת האדמה (breaker) נספרו.

תוצאות הניסוי מראות שירידה ברמת ביטוי הגן LeHSP21 לא גורמת להאטה בקצב האדמת הפרי.

השפעת עייכוב ביטוי הגן LeHSP21 על האדמת הפרי לאחר אחסון קור

בניסוי זה בדקנו האם פירות עגבנייה מהזן Microtom אשר מבטאים את הגן LeHSP21 ברמה נמוכה אינם מסוגלים להאדים לאחר איחסון קור. פירות ביקורת וטרנסגנים אוחסנו למשך שלושה שבועות ב-2 מ"צ ולאחר מכן הועברו לטמפרטורת החדר ואחרי שבעה ימים נוספים נבדקה ההאדמה.

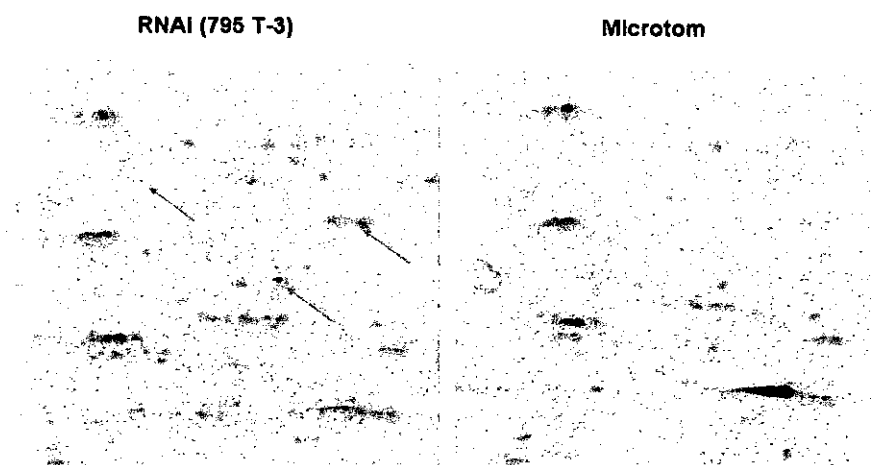


איור 11. פירות ביקורת (Microtom) וטרנסגנים משלושה קוים בהם עוכב ביטוי הגן *LeHSP21* אשר אוחסנו בקור (2 מ"צ) למשך שלושה שבועות ולאחר מכן שהו במשך 7 ימים בטמפרטורת החדר. בתמונה מוצגים פירות שונים שעברו את הטיפול.

תוצאות הניסוי מראות שוב שפירות הביקורת וגם מרבית הפירות הטרנסגנים מאדימים לאחר טיפול הקור. יש לציין שפירות של אחד הקוים הטרנסגנים לא האדים כלל. יש לבדוק האם רמת החלבון בקו זה נמוכה משמעותית מזו שבפירות הקוים האחרים.

זיהוי חלבונים הנקשרים ל- *LeHSP21* בפרי המתפתח - השערת המחקר שלנו לגבי מנגנון הפעולה של *LeHSP21* בעידוד צבירת הקרוטנואידים בפרי המתפתח היא שהחלבון *LeHSP21* מגן על האנזימים המעורבים בביוסנתזה של הפיגמנט. בשלבים הראשונים הפרי מכיל כלורופלסטים אשר הופכים בשלב בהתפתחות מסוים לכרומופלסטים צוברי קרוטנואידים. המעבר מכלורופלסט לכרומופלסט מלווה בהרס המערכת הפוטוסינטטית והממברנות הפנימיות, תהליך הגורם ליצירת חמצן אקטיבי (ROS). בסביבה הרסנית זו מתחילים לפעול האנזימים המעורבים ביצירת הקרוטנואידים ויש לשער שדרושה מערכת הגנה לתפקוד מלא של אנזימים אלה. אנו מציעים ש- *LeHSP21* ממלא תפקיד בהגנה זו.

בכדי לזהות את חלבוני המטרה של *LeHSP21* ניסינו להפריד חלבוני פרי במערכת 2-D gels. ערכנו מיצוי חלבונים מפירות ביקורת ומפירות טרנסגנים אשר מבטאים ביתר את הגן או כאלה בהם ביטוי הגן מעוכב. את החלבונים הפרדנו בגלים דו-מימדיים. למרות שבתחילת העבודה התקבל הרושם שהמערכת עובדת, ניסיונות חוזרים הראו שהתוצאות לא עקביות. נתקלנו בבעיות טכניות רבות ולכן החלטנו לעבור לזהות חלבוני עלה. לשם כך השונו את פרופיל החלבונים המצטברים בעלי ביקורת ובעלים מצמחים טרנסגנים בהם עוכב ביטוי הגן *LeHSP21* (RNAi) בהשפעת טיפול חום (שעתיים ב- 42 מ"צ). אנליזת החלבונים בעלה הייתה איכותית יותר מזו שלחלבוני הפרי והתוצאות היו עקביות, כך שניתן היה לערוך מפות רפרנס לזיהוי החלבונים.

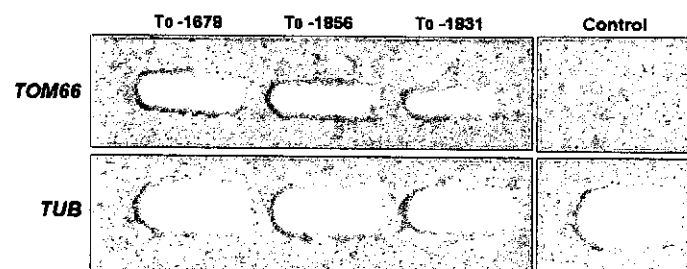


איור 12. מפות 2-D של חלבונים עלה (ביקורת ו- LeHSP21 RNAi) לאחר טיפול חום. חלבונים אשר הראו הצטברות דיפרנציאלית (עליה בצמחים הטרינסגנים) מסומנים.

בהשוואה בין מפות של החלבונים של העלים לאחר טיפול חום לא הצלחנו למצוא חלבונים שרמתם יורדת בטרנסגן באופן עקבי. לאומת זאת מצאנו מספר חלבונים אשר הראו באופן עקבי ירידה בצמחי Microtom בהשוואה לצמחים הטרינסגנים. חלבונים אלה יבודדו מגילים שונים וימסרו לאנליזת LCMS לזיהוי ואפיון. יתכן שחלבונים אלה מופיעים ברמה גבוהה בצמחים הטרינסגנים כתוצאה מעקה מוגברת בתא (עקב החוסר של LeHSP21) או שהם תוצרי פירוק של חלבונים גדולים יותר אשר לא הצלחנו לזהות עד כה.

לימוד תפקיד החלבון TOM66 בהתפתחות הפרי

בעבר הראנו שגנים המקודדים לחלבוני עקת חום קטנים נוספים מתבטאים במהלך התפתחות הפרי. אחד מהם TOM66 מקודד לחלבון עקת חום ציטוזולי והוא מופעל בדומה ל- *HSP21* בשלב ה- Turning. בכדי לבדוק את מעורבותו בהתפתחות הפרי, בנינו קונסטראקט *35S:TOM66* ולאחרונה החדרנו אותו לצמחי Microtom. צמחים אלה יבדקו להתפתחות והבשלת הפרי ולעמידות כנגד עקות חום וקור.



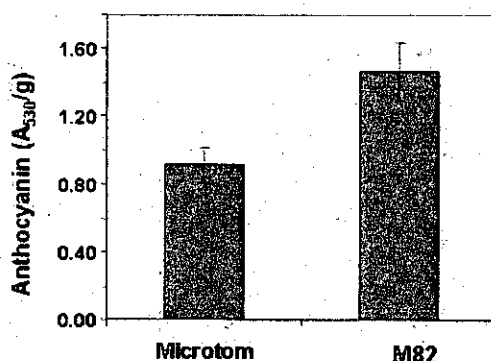
איור 13. ביטוי הגן *TOM66* בצמחי Microtom (ביקורת) וצמחים טרינסגנים להם הוחדר הגן תחת בקרת הפרומוטר *35S*. כביקורת שימש הגן *TUBULIN* (*TUB*)

האם לזן Microtom עמידות כנגד עקות?

תוצאות המחקר מראות באופן ברור שיש הבדל עקרוני בתגובה של צמחי Microtom לשינויים ברמות הביטוי של הגן LeHSP21 לבין התגובה של צמחי VF36 אשר נילמדו בעבר. ההבדלים נמצאו גם בתגובת המערכת הפוטוסינטטית לעקות חימצון וגם בתהליך הבשלת הפרי (קצב האדמה והאדמה לאחר אחסון קור). אחד ההבדלים הבולטים ביותר שנמצאו הייתה העובדה שפירות Microtom מסוגלים להאדים לאחר אחסון קור ממושך ולא סובלים בצורה בולטת מנזקי צינה, בעוד שפירות של זנים אחרים שנבדקו בעבר במעבדתנו ובמעבדות אחרות בעולם הראו נזקים בולטים בעקבות טיפול דומה ולא האדמו. הזן Microtom פגוע ביכולת ליצור נורמאלי של ההורמון ברסינוסטרואיד ולכן הוא ננסי. בסידרת הניסויים הבאה בדקנו האם זן זה עמיד יותר מזן גבוהה נורמאלי (M82) בפני עקות שונות.

תגובה לקור

נבטי Microtom ו-M82 שהו בטמפרטורה של $16^{\circ}\text{C}/10^{\circ}\text{C}$ (לילה/יום) לאחר חודש הופקו אנטוציאנינים מעלים של הצמחים וחושב הממוצע עבור כל זן.



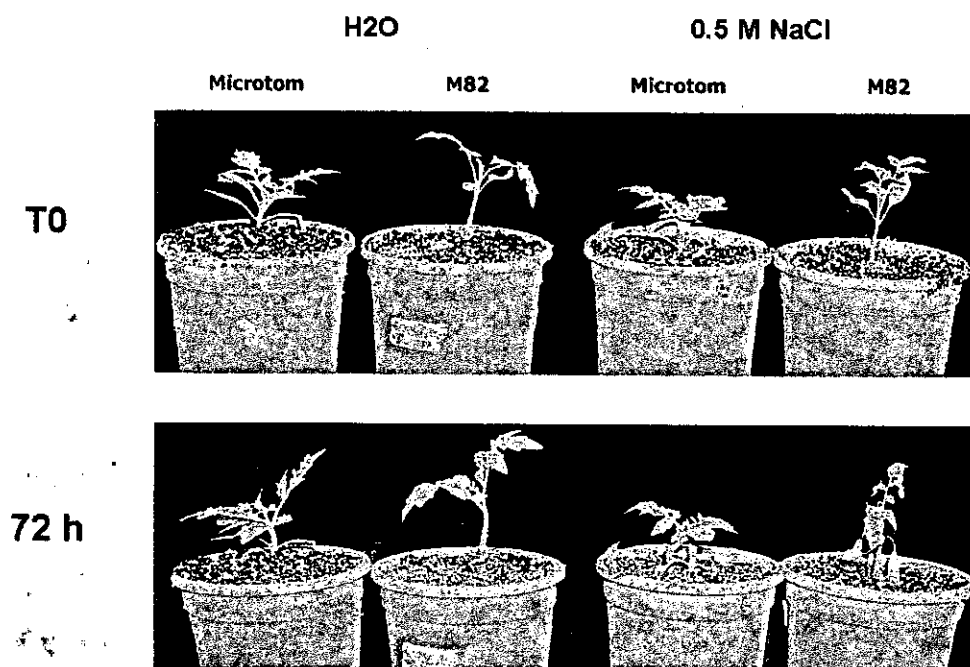
איור 14. צבירת אנטוציאנינים בעלים של צמחי M82 וצמחי Microtom לאחר חודש בתנאי קור.

תוצאות הניסוי מראות שתגובת צמחי M82 לקור (בצבירת הפיגמנט אנטוציאנין) חזקה בהרבה מזו שנצפתה בצמחי Microtom.

תגובה לעקת מלח

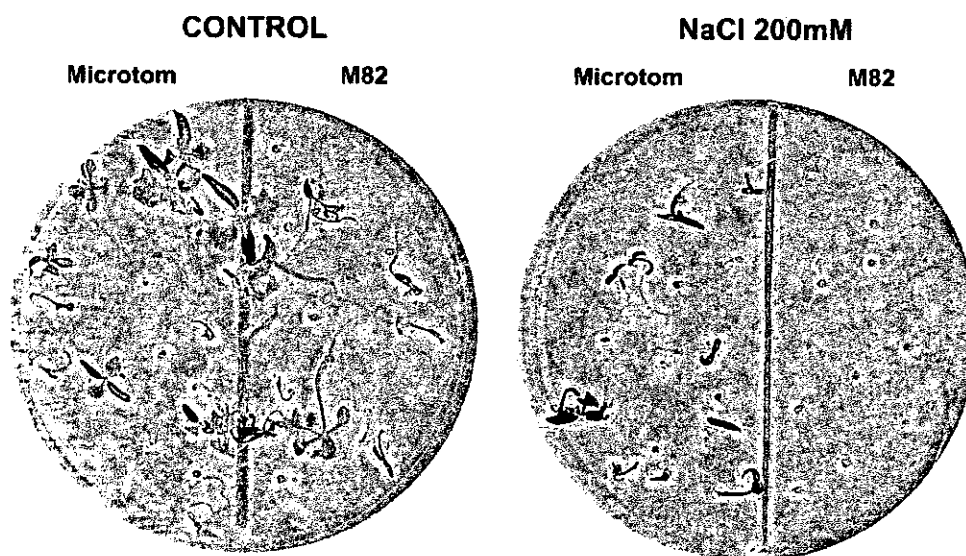
נבטי Microtom ו-M82 הועברו לעציצים והושקו בתמיסת NaCl 500Mm או במים באותו נפח. לאחר 72 שעות צולמו הצמחים (איור 13).

תוצאות הניסוי מראות כמישה ברורה של נבטי M82 72 שעות לאחר ההשקיה בתמיסת מלח בעוד שנבטי Microtom לא הושפעו.



איור 15. השפעת טיפול מלח על כמישת נבטי M82 ו-Microtom. נבטים של הצמחים השונים טופלו במים או בתמיסת מלח (0.5 M NaCl) ולאחר 72 שעות צולמו.

בנוסף לתגובת הצמחים בדקנו גם את העמידות של הזרעים לנביטה על גבי מצע המכיל מלח. זרעי Microtom ו-M82 הונחו על גבי מצע MS או MS המכיל 200 mM NaCl ונבדקה נביטה.



איור 16. נביטה של זרעי Microtom ו-M82 על מצע MS המכיל 200 mM NaCl או על מצע MS.

תוצאות הניסוי מראות שלמרות שאחוזי הנביטה של שני הזנים על מצע MS דומים, כאשר המצע הכיל מלח, זרעי Microtom אבל לא זרעי M82, נבטו. תוצאה זו מראה שזרעי Microtom עמידים יחסית למלח.

מסקנות המחקר

חלבוני עקת חום קטנים (smHSP) מעורבים בתהליכי התגוננות של הצמח בפני עקות שונות. בעבודה קודמת הראנו שלחלבון הכלורופלסטי LeHSP21 מעגבנייה, תפקיד בהגנה על מערכת הובלת האלקטרונים PSII מפני עקות פוטואוקסידטיביות. בנוסף הראנו שלחלבון תפקיד בהבשלת הפרי ובעידוד צבירת קרוטנואידים ברקמה. בעבודה זו בחרנו להשתמש בעגבנייה מין Microtom כמערכת המודל ויצרנו צמחי Microtom טרנסגנים בהם הגן *LeHSP21* בוטא ביתר וכן צמחים בהם עוכב ביטוי הגן (RNAi) ואפינו אותם מולקולרית ופיזיולוגית. בדקנו את עמידותם של הצמחים הטרנסגנים לעקות פוטואוקסידטיביות וכן את השפעת שינוי ביטוי הגן *LeHSP21* על התפתחות והאדמת הפרי. תוצאות הניסויים הראו שבשונה מצמחים טרנסגנים של הזן VF36 אשר נבדקו בעבודה קודמת והראו עמידות לעקות וזירוז בהאדמת הפרי כתוצאה מביטוי ביתר של הגן, שינוי בביטוי הגן (עליה או ירידה) בצמחי Microtom כמעט ולא השפיע על תהליכים אלה. על מנת לברר את הסיבה לכך, השונו את עמידותם של הזנים השונים לעקות שונות ומצאנו שאכן Microtom עמיד יותר. ההשערה שלנו היא שהמחסור בהורמון ברסינוסטרואיד בון Microtom (מוטנט ליצור ההורמון) מעניק עמידות לצמח ולכן התגובה הנמוכה לשינויים ברמת החלבון *LeHSP21* בהשוואה לזן נורמאלי. עובדה זו מראה שהבחירה שלנו בון Microtom הייתה שגויה ולא סייעה לנו בחבנה עמוקה יותר לגבי תפקידו של החלבון בהתגוננות מפני עקות ובהתפתחות הפרי.

בחלקו האחר של המחקר התמקדנו באיפיון החלבון, זיהוי חלבוני המטרה שלו ולימוד הבקרה של הגן. הראנו תוך שימוש בגן הכימרי *LeHSP21-GFP* שהחלבון אכן מתבטא בכלורופלסטים וכעת אנו מנסים לברר האם מיקומו בתוך הכלורופלסט משתנה בעקבות עקת חום. באנליזות 2-D לחלבוני פרי נתקלנו בבעיות רבות לכן פנינו לאפיין את חלבוני העלה בעקבות עקת חום עם וללא החלבון *LeHSP21*. מצאנו מספר חלבונים אשר רמתם יורדת כתוצאה מהמחסור ב- *LeHSP21* ואנו פועלים כעת לאפיין אותם. הראנו שהביטוי של *LeHSP21* נמצא תחת בקרה לא ישירה של הגן *RIN* המעורב בבקרת התפתחות הפרי. באנליזות microarray לפירות של Microtom ושל המוטנט *rin* זיהינו את הגן המקודד לחלבון שעתוק המפעיל חלבוני עקת חום. גן זה פועל בפרי ומבוקר ע"י החלבון *RIN*. אנו מבררים כעת האם חלבון זה מעורב באופן ישיר בבקרת השעתוק של הגן *LeHSP21* בפרי. בודדנו את הפרומוטר של הגן *LeHSP21* והראנו תוך שימוש בגן מדווח שהוא אכן מופעל ע"י עקת חום. כעת אנו פועלים לזיהוי אתרי התגובה בפרומוטר הן לעקת חום והן להתפתחות הפרי. למרות שתקופת המימון הסתיימה אנו ממשיכים בלימוד הבקרה ודרך הפעולה של החלבון בפלסטידות של העלים והפירות.

1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
מטרת המחקר היו לאפיין את הגן *LeHSP21* המקודד לחלבון עקת חום קטן, ללמוד את הבקרה שלו בפרי ולברר את תפקידו בהתפתחות פרי העגבנייה ובהגנה מפני עקות ולזהות את החלבונים אשר מושפעים (מוגנים) מנוכחותו בפרי ובעלה.
2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.
הראנו שהחלבון *LeHSP21* מצטבר בכלורופלסטים ונמצא תחת בקרה לא ישירה של הגן *RIN*. ערכנו אנליזות microarray וזיהינו את הגן המקודד לחלבון השעתוק *LeHSF* אשר פועל בפרי ומבוקר ע"י *RIN*. בודדנו את הפרומוטור של הגן *LeHSP21* והתחלנו לאפיין אותו. ערכנו אנליזות 2-D לחלבונים עלה בהם הושתק הגן *LeHSP21* במטרה לזהות חלבונים המוגנים במהלך עקת חום ע"י *LeHSP21* וזיהינו מספר קנדידיטים. יצרנו צמחי Microtom טרנסגנים בהם הגן *LeHSP21* בוטא ביתר וכן צמחים בהם עוכב ביטוי הגן (*RNAi*) ואיפיינו אותם מולקולרית ופיזיולוגית. מצאנו שבשונה מצמחים טרנסגנים של הזן VF36 אשר נבדקו בעבודה קודמת והראו עמידות לעקות וזירו בהאדמת הפרי כתוצאה מביטוי ביתר של הגן, שינוי בביטוי הגן (עליה או ירידה) בצמחי Microtom כמעט ולא השפיע על תהליכים אלה. על מנת לברר את הסיבה לכך, השונו את עמידותם של הזנים השונים לעקות שונות ומצאנו ש-Microtom עמיד יותר.
3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו.
הגן *LeHSP21* נמצא תחת בקרת חלבוני שעתוק ספציפיים להתפתחות הפרי. תפקידו של החלבון בא לידי ביטוי רק ברקעים גנטיים מסוימים: כאשר הצמח עמיד לעקות (כתוצאה מהפעלת מנגנון אחר) לחלבון תפקיד מינורי בהגנה מפני עקות פוטואוקסידטיביות ובבקרת הצטברות קרוטנואידים בפרי. זן העגבנייה Microtom עמיד למגוון עקות בהשוואה לזנים נורמאליים לא ננסיים.
הבעיות שנתרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים): התייחסות המשך המחקר לגביהן.
המשך איפיון הפרומוטור של *LeHSP21*. לימוד תפקידו של החלבון *HSF* שפועל בפרי ומבוקר ע"י *RIN*. אפיון החלבונים אשר רמתם בעלה, לאחר עקת חום, מושפעת מנוכחותו של *LeHSP21*. לימוד תפקידו של החלבון TOM66 בהתפתחות הפרי.
5. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - יש לפרט: פרסומים - כמקובל בביבליוגרפיה, פטנטים - יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך.
חלקה הראשון של העבודה נכלל במאמר אשר התפרסם בתחילת תקופת המחקר בעיתון Plant Cell.
- Neta-Sharir I., Isaacson T., Lurie S. and Weiss D. (2005) Dual role for tomato HSP21: protecting photosystem II from oxidative stress and promoting color changes during fruit maturation. *The Plant Cell* 17: 1829-1838.

פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)

• ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)