



1998-2000

תקופת המחקר:

259-0088-00

קוד מחקר:

שם יצור קטניות מספוא עתירות בחומצות אמינו חיוניות, בדרכים מולקולריות

שם

MOLECULAR APPROACHES FOR IMPROVING ESSENTIAL AMINO ACIDES CONTENT
IN TRANSGENIC FORAGE PLANTS

המחקר:

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

חוקר ראשי: דר' שמואל גילי

מאמרים: 2

חוקרים
שותפים: רחל אמיר

תקציר

בני אדם ובעלי חיים חד קיבתיים אינם מסוגלים לייצר בעצמם עשר מתוך עשרים חומצות אמינו (ח"א), הנקראות חומצות אמינו חיוניות, ולכן הם צריכים לקבלם באמצעות המזון. צמחי דגניים וקטניות שהם בין מקורות החלבון החשובים ביותר לתזונת בני אדם ובעלי-חיים ברחבי העולם מכילים רמה מוגבלת של מספר ח"א חיוניות. חלבוני הקטניות חסרים בעיקר ח"א המכילות גופרית, מתיונין וציסטאין, בעוד שחלבוני הדגניים חסרים בעיקר ליזין. באופן חלקי ניתן להתגבר על חסרים אלו אם משלבים במנת המזון דגניים וקטניות, אך גם בדרך זו עדיין לא ניתן לקבל רמה מספקת של ח"א חיוניות ויש צורך להוסיפם בנפרד. שתי דרכים עיקריות נוסו בכדי להעלות את רמת הח"א החיוניות בצמחים מותמרים. דרך אחת היא שימוש בגנים המקודדים לאנזימי מפתח במסלול הביסנינתזה של ח"א חיוניות שאינם רגישים לעיכוב ע"י היזון חוזר. הדרך השניה היא להעלות את רמת הח"א בצמחים מותמרים ע"י ביטוי ביתר של חלבונים עתירי חומצות אמינו חיוניות. בעבודה זו בחנו שיפור ערך של צמחים בעזרת שתי הדרכים הנ"ל.

מטרות העבודה התמרת צמחי אספסת בגנים חידקיים המקודדים ל AK ו DHPS; איפיון הגורמים המשפיעים על הצטברות חלבוני ה S-VSPs מסויה בצמחים הטורולוגיים; ובחינת השפעת ביטוי ביתר של חלבוני ה S-VSPs על הערך התזונתי של צמחים. הראנו שצמחי אספסת מותמרים בגנים המקודדים ל AK ו DHPS התקבלו עליות מובהקות ברמת התראונון והליזין (הן החופשי והן הקשור בחלבונים), בהתאמה. תכונות אלו הועברו גם לדור F1.

בחלק השני הראנו שחלבוני התשמורת של הרקמה הצמחית מהווים מקור גנים נוסף לשיפור ערך תזונתי של צמחים אם הדגש לצמחי מספוא. חלבונים אלו הצטברו לרמות גבוהות בצמחים הטורולוגיים והראו עמידות לפרוק בכרס הפרה.

ייצור קטניות מספוא עתירות בחומצות עמינו חיוניות, בדרכים מולקולריות

Production of transgenic potato, alfalfa and wheat plants with improve quality

מאת שמואל גלילי¹, רחל אמיר²

(1) מרכז וולקני, ת.ד. 6, בית-דגן 50250,

(2) מיג"ל, מרכז טכנולוגי אזור תעשייה דרומי, קרית שמונה 12100,

Shmuel Galili¹ and Rachel Amir²

¹ Agronomy and Natural Resources Department., Agricultural Research Organization, The Volcani Center, P.O.B 6. Bet Dagan 50250 Israel, email vclidg@netvision.net.il

² Department of Plant Physiology, Migal Technological Center, Kiryat Shmona 12100 Israel,

תקציר

בני אדם ובעלי חיים חד קיבתיים אינם מסוגלים לייצר בעצמם עשר מתוך עשרים חומצות אמינו (ח"א), הנקראות חומצות אמינו חיוניות, ולכן הם צריכים לקבלם באמצעות המזון. צמחי דגניים וקטניות שהם בין מקורות החלבון החשובים ביותר לתזונת בני אדם ובעלי-חיים ברחבי העולם מכילים רמה מוגבלת של מספר ח"א חיוניות. חלבוני הקטניות חסרים בעיקר ח"א המכילות גופרית, מתיונין וציסטאין, בעוד שחלבוני הדגניים חסרים בעיקר ליזין. באופן חלקי ניתן להתגבר על חסרים אלו אם משלבים במנת המזון דגניים וקטניות, אך גם בדרך זו עדיין לא ניתן לקבל רמה מספקת של ח"א חיוניות ויש צורך להוסיפם בנפרד. שתי דרכים עיקריות נוסו בכדי להעלות את רמת הח"א החיוניות בצמחים מותמרים. דרך אחת היא שימוש בגנים המקודדים לאנזימי מפתח במסלול הביוסינתזה של ח"א חיוניות שאינם רגישים לעיכוב ע"י היזון חוזר. הדרך השנייה היא להעלות את רמת הח"א בצמחים מותמרים ע"י ביטוי ביתר של חלבונים עתירי חומצות אמינו חיוניות. בעבודה זו בחנו שיפור ערך של צמחים בעזרת שתי הדרכים הנ"ל. מטרות העבודה התמרת צמחי אספסת בגנים חידקיים המקודדים ל AK ו DHPS; איפיון הגורמים המשפיעים על הצטברות חלבוני ה S-VSPs מסויה בצמחים הטרוטופיים; ובחינת השפעת ביטוי ביתר של חלבוני ה S-VSPs על הערך התזונתי של צמחים. הראנו שצמחי אספסת מותמרים בגנים המקודדים ל AK ו DHPS התקבלו עליות מובהקות ברמת התראונין והליזין (הן החופשי והן הקשור בחלבונים), בהתאמה. תכונות אלו הועברו גם לדור F1.

בחלק השני הראנו שחלבוני התשמורת של הרקמה הצמחית מהווים מקור גנים נוסף לשיפור ערך תזונתי של צמחים אם הדגש לצמחי מספוא. חלבונים אלו הצטברו לרמות גבוהות בצמחים הטרוולוגיים והראו עמידות לפרוק בכרס הפרה.

1. רקע מדעי

בני אדם ובעלי חיים חד קיבתיים אינם מסוגלים לייצר בעצמם עשר מתוך עשרים חומצות אמינו (ח"א), הנקראות חומצות אמינו חיוניות, ולכן הם צריכים לקבלם באמצעות המזון. צמחי דגניים וקטניות שהם בין מקורות החלבון החשובים ביותר לתזונת בני אדם ובעלי-חיים ברחבי העולם מכילים רמה מוגבלת של מספר ח"א חיוניות. חלבוני הקטניות חסרים בעיקר ח"א המכילות גופרית, מתיונין וציסטאין, בעוד שחלבוני הדגניים חסרים בעיקר ליזין. באופן חלקי ניתן להתגבר על חסרים אלו אם משלבים במנת המזון דגניים וקטניות, אך גם בדרך זו עדיין לא ניתן לקבל רמה מספקת של ח"א חיוניות ויש צורך להוסיפם בנפרד. ההתפתחות האחרונה בכל הקשור בפיתוחו טכניקות של הנדסה גנטית ורגנציית צמחים מתרבויות רקמה מאפשרת החדרת גנים חדשים לצמחים. שיטות אלו, מהוות פריצת דרך לשיפור הערך התזונתי של צמחים, ולכן מאפשרות התערבות ישירה לשנוי הרכב הח"א החיוניות בצמחים. שתי דרכים עיקריות נוסו בכדי להעלות את רמת הח"א החיוניות בצמחים מותמרים. דרך אחת היא שימוש בגנים המקודדים לאנזימי מפתח במסלול הביוסיתזה של ח"א חיוניות שאינם רגישים לעיכוב ע"י היזון חוזר. בדרך זו השתמשו בעיקר באנזימי מפתח של ח"א מקבוצת האספרטט. בצמחים ח"א ליזין, מתיונין, תראונין ואיזולאוצין מיוצרים בתוך הכלורופלסטים מחומצה אספרטית. מחקרים הראו שאנזים אספרטט קינאז (AK), המהווה את נקודת הבקרה העיקרית לייצור תראונין בעוד שהאנזים דיהידרודיפקולינט סינטז (DHPS) מהווה את נקודת הבקרה העיקרית בייצור ליזין. ביטוי ביתר של גנים אלו בצמחים מותמרים הביא ליצור מוגבר של ליזין, תראונין חופשיים. הדרך השניה היא להעלות את רמת הח"א בצמחים מותמרים ע"י ביטוי ביתר של חלבונים. שהחלבון יעלה את הערך התזונתי של הצמחים המותמרים הוא צריך לעמוד ב 4 קריטריונים:

- יהיה עתיר חומצות אמינו חיוניות (כלומר שרצף שלהם יכיל % גבוה של ח"א חיוניות)
- יצטבר לרמות גבוהות בצמחים וכאשר מדובר בצמחי מספוא או צמחים למרעה חשוב שהוא יצטבר בכל חלקי הצמח ולא דווקא בזרעים.
- לא יזיק לבעלי החיים שלא יהיה רעיל עבורם ושלא יגרום להם לאלרגיה.

שלושת הקריטריונים האלו נכונים עבור כלל בעלי החיים. אך כאשר מדובר בהזנת מעלי-גירה

דרוש קריטריון נוסף:

- יהיה עמיד בכרס ויתפרק בקיבה האמיתית.

בדרך זו השתמשו בעיקר בגנים המקדדים לחלבונים תשמורת עתירי מתיונין כגון:

2S Brazil nut albumin and 15, 18 & 10 kD β and δ -zeins and sunflower albumin 8
גנים אלו היוו מקור חשוב ומוצלח להעלאת הערך התזונתי של זרעים. נערכו ניסיונות להשתמש בגנים אלו גם לשיפור הערך התזונתי של החלקים הצמחים תוך שימוש בפרומטור רציף. הבעיה הייתה שחלבונים אלו נדדו לתוך החלליות הצמחיות שהם יותר ליטיות מאשר החלליות שבזרעים ולכן לא הצליחו להצטבר כלל ברקמות הצמחיות. פתרון חלקי לבעיה הזו הושג ע"י הכוונתם של חלבונים אלו להשארות בתוך הרשתית האנדופלסמטית ע"י הוספת 4 ח"א לזין-אספרטט-גלוטמט-לאוצין (KDEL) בקצה הקרבוקסילי של רצף החלבון.

מחקרים שנעשו לאחרונה הראו שגם רקמות צמחיות מייצרות חלבונים תשמורת (Vegetative

storage proteins – VSPs). חלבונים אלו יכולים, בתנאים מסוימים, להצטבר ברקמות

הצמחיות (בתוך החלליות) לרמות גבוהות של עד 45% מכלל חלבוני הרקמה. חלבונים כאלו

נמצאו במספר רב של צמחים ועליהם נמנים פטטין בתפוז"א, חלבוני α & β VSP

וליפוקסיגנאזות בסויה, ולכן הוא יכול לשמש כחלבון פוטנציאלי להעלאת רמת הליזין בצמחים.

חלבוני תשמורת של הרקמה הצמחית חלבוני ה Vegetative storage protein (S-VSPs) מסויה הם

הנחקרים ביותר. חלבונים אלו בנויים מ 2 תתי יחידות α -S-VSP ו β -S-VSP הדומים ביניהם בכ

80%, מכילים 7% ליזין ובאופן טבעי מצטברים לרמות גבוהות ברקמות הווגטיביות מ 6-15%

מכלל החלבון המסיס בעלים הצעירים ועד 45% בעלים של צמחים שעברו קיטים התרמילים

במשך מספר שבועות. תכונות אלו מראות שחלבוני ה S-VSP מסויה יכולים לשמש כמקור לגנים

פוטנציאליים לשיפור הערך התזונתי של הרקמה הצמחית. בעבודה זו בחנו את האפשרות של

שיפור ערך תזונתי של צמחי מספוא בשתי השיטות הנ"ל.

2. מטרות המחקר:

- התמרת צמחי אספסת בגנים חיידקיים המקודדים ל AK ו DHPS

- איפיון הגורמים המשפיעים על הצטברות חלבוני ה S-VSPs מסויה בצמחים הטורולוגיים.

- בחינת השפעת ביטוי ביתר של חלבוני ה S-VSPs על הערך התזונתי של צמחים.

3. תוצאות:

3.1 התמרת צמחי אספסת בגנים חיידקיים המקודדים ל AK ו DHPS

התמרנו צמחי אספסת בקונסטרוקטים הבאים (שהתקבלו מהמעבדה של פרופ' גד גלילי במכון וייצמן):

1. CaMV35S-TP-AK-ter

2. CaMV35S-TP-DHPS-ter

כאשר:

CaMV35S הוא פרומטור רציף מוירוס המוזיקה של הכרובית.
TP - טרנזיט פפטיד המכוון את חלבון ה VSP לתוך הכלורופלסט.

Ter - אוקטופין סינתאז טרמינטור.

DHPS - הגן המקודד לדיהידרודיפיקולינט סינתאז חיידקי שאינו רגיש להיזון חוזר.
AK - הגן המקודד אספרטט קינאז חיידקי שאינו רגיש להיזון חוזר.
בשני הקונסטרוקטים השתמנו בגן לסלקציה לעמידות לקנאמיצין.

3.1.1 אנליזת צמחי אספסת מותמרים בגן המקודד ל AK:

העברנו 34 צמחי אספסת עמידים לקנאמיצין לחממה. לא נמצאו הבדלים מורפולוגיים בין הצמחים המותמרים לצמחי הביקורת. מאנליזת PCR של צמחי אספסת אלו נמצא שרק 22 מהם החילו את הגן ל AK (תמונה A1). מספוג מערבי הראה שרק ב 19 קווי אספסת מותמרים, שנמצאו חיוביים ב PCR, הגן AK היה פעיל (תמונה 2). בכל הקווים שבהם הגן AK היה פעיל אובחן במספוג מערבי חלבון ה AK החיידקי בגודל של 48.5 kD ע"י נוגדנים ייחודיים שהתקבלו מהמעבדה של פרופ' גד גלילי (מכון וייצמן) (תמונה 3). רמות התראונין החופשיות אובחנו ב 8 צמחי ביקורת לא מותמרים ו 13 קווים מותמרים (לפחות שלשה חזרות מכל קו) (טבלה 1). רמות התראונין החופשיות נבחנו ב 8 צמחי ביקורת לא מותמרים ו 13 קווי אספסת מותמרים (3 חזרות מכל קו). רמות התראונין החופשיות עלו באופן מובהק ברוב הצמחים המותמרים, מרמה של 2.22 מול % בצמחי הביקורת לרמה של 5.54 מול % בקו AK24 (עליה של פי 2.5). ברוב הקווים המותמרים נמצא שהעלייה ברמת התראונין החופשי לוותה בירידה מובהקת ברמת הגלוטמט והאספרטט (פרקורסורים של תראונין) (טבלה 1). רמות התראונין הקשור בחלבונים נבחנו בשלשה קווים מותמרים שבהם רמת התראונין החופשי הייתה הגבוהה ביותר (AK24, AK21 and AK3) (טבלה 2). לשם כך הפקנו את כלל החלבונים המסיסים, המהויים כ 80% מכלל חלבוני העלון, משלשת קווים אלו ומצחי ביקורת לא מותמרים (5 חזרות כ"א). מטבלה 2 ניתן לראות שרמת התראונין הקשור עלתה באופן מובהק בשלשת הקווים הללו. כמו כן, לא נצפו שינויים מובהקים בשאר

טבלה מספר 1. הערכים היחסיים של אספרטט, גלוטמט וטראונין חופשיים שהתקבלו בצמחי ביקורת (SY) וצמחים אספסת מותמרים בגן לאספרטט קינאז חידקי (AK). הערכים מציינים ממוצע \pm שגיאת תקן שהתקבלו מלפחות שלושה צמחים לכל קו.

קו (מספר צמחים שנבחנו)	טראונין חופשי מול %	אספרטט חופשי מול %	גלוטמט חופשי מול %
SY (8)	2.22 \pm 0.16	14.9 \pm 0.62	26.7 \pm 1.00
AK1 (3)	2.57 \pm 0.39	10.7 \pm 0.70*	20.9 \pm 0.61*
AK3 (3)	4.97 \pm 0.29*	11.9 \pm 1.22*	23.3 \pm 1.74
AK5 (3)	2.66 \pm 0.19	11.9 \pm 0.56*	23.4 \pm 2.63
AK7 (3)	4.12 \pm 0.23*	11.2 \pm 0.72*	22.4 \pm 0.26
AK9 (3)	4.46 \pm 0.40*	12.4 \pm 0.19	21.9 \pm 0.41*
AK12 (3)	2.92 \pm 0.17	11.7 \pm 0.78*	21.7 \pm 0.66*
AK13 (3)	3.37 \pm 0.48*	10.1 \pm 0.15*	19.7 \pm 1.59*
AK16 (3)	2.82 \pm 0.10	11.8 \pm 0.36*	19.7 \pm 0.55*
AK21 (3)	5.11 \pm 0.11*	14.0 \pm 0.53	22.8 \pm 0.40
AK22 (3)	3.86 \pm 0.40*	12.1 \pm 1.23*	21.4 \pm 1.09*
AK24 (3)	5.57 \pm 0.83*	14.5 \pm 0.37	24.5 \pm 0.89
AK29 (3)	3.09 \pm 0.19	11.8 \pm 1.12*	20.9 \pm 0.55*
AK30 (3)	3.71 \pm 0.38*	14.2 \pm 0.43	24.0 \pm 0.37

* ערכים שונים בצורה מובהקת מהערכים שהתקבלו בצמחי הביקורת (SY) ברמה של $P < 5\%$.

אספסת לא מותמרים מהכלאה בין הזן SY והזן גלבוט. אנליזת PCR של צמחי F1 נמצא ש 4 מתוך 20 צמחי אספסת שנבחנו הראו את הבנד האופייני ל AK (תמונה B1). רמות התראונין החופשי בצמחים אלו עלו באופן מובהק מ 1.33 מול% בצמחי הביקורת ל 5.58 מול % בצמחים המותמרים (עליה של פי 4.2).

3.1.2 אנליזת צמחי אספסת מותמרים בגן המקודד ל DHPS:

תוצאות דומות התקבלו בצמחי אספסת מותמרים בגן המקודד ל DHPS. 15 צמחי אספסת שהראו בנד PCR אופייני ל DHPS הועברו לחממה. אנליזות מספוג צפוני (תמונה B2) ומערבי של צמחים אלו נמצא שרק ב 13 מהם הגן ל DHPS היה פעיל והראו את הבנד ל DHPS (תמונה B3). רמות הליזין החופשי נבחנו בעלים של 8 צמחי ביקורת לא מותמרים וב 15 קווים מותמרים (3 חזרות מכל קו). רמת הליזין החופשי ברוב הקווים עלתה באופן מובהק מרמה של 0.21 מול % בצמחי הביקורת ועד ל 3.1 מול % בקו DH310 (טבלה 4). רמת הליזין הקשור בתוך חלבונים נבחנה בקו DH310, שהראה את רמות הליזין החופשי הגבוהות ביותר, גם כאן מצאנו עלייה מובהקת רק ברמת הליזין הקשור כמו שנמצא בצמחי ה AK (טבלה 4).

טבלה מספר 2. הרכב חומצות אמינו בכלל חלבוני העלואה המסיסים בצמחי ביקורת (SY) ובשלשה צמחי אספסת מותמרים בגן לאספרטט קינאז (AK) חיידיקי.

מול % (ממוצע \pm שגיאת תקן)				
חומצות אמינו	ביקורת (SY)	AK 3	AK 21	AK 24
Asx	15.37 \pm 1.16	13.89 \pm 0.28	13.97 \pm 0.27	14.30 \pm 0.42
Ser	6.24 \pm 0.60	5.58 \pm 0.09	5.89 \pm 0.16	5.86 \pm 0.13
Glx	12.56 \pm 0.75	11.15 \pm 0.20	11.95 \pm 0.16	11.64 \pm 0.24
Gly	8.48 \pm 0.10	8.75 \pm 0.129	8.75 \pm 0.06	8.62 \pm 0.06
His	1.90 \pm 0.13	2.14 \pm 0.03	2.02 \pm 0.06	2.03 \pm 0.03
Arg	4.25 \pm 0.31	4.51 \pm 0.06	4.37 \pm 0.07	4.27 \pm 0.13
Thr	5.23 \pm 0.08	5.54 \pm 0.03*	5.61 \pm 0.02*	5.67 \pm 0.04*
Ala	8.15 \pm 0.10	8.37 \pm 0.05	8.34 \pm 0.08	8.32 \pm 0.03
Pro	5.35 \pm 0.71	7.27 \pm 0.29	6.41 \pm 0.18	6.38 \pm 0.20
Tyr	2.55 \pm 0.17	2.65 \pm 0.04	2.50 \pm 0.04	2.42 \pm 0.09
Val	6.43 \pm 0.13	6.49 \pm 0.04	6.57 \pm 0.04	6.51 \pm 0.06
Met	1.62 \pm 0.09	1.60 \pm 0.05	1.49 \pm 0.05	1.60 \pm 0.05
Lys	5.60 \pm 0.04	5.56 \pm 0.04	5.74 \pm 0.03	5.66 \pm 0.03
Ile	4.63 \pm 0.16	4.67 \pm 0.04	4.70 \pm 0.04	4.70 \pm 0.06
Leu	7.58 \pm 0.33	7.62 \pm 0.09	7.63 \pm 0.10	7.64 \pm 0.16
Phe	3.91 \pm 0.19	4.04 \pm 0.06	4.01 \pm 0.06	4.03 \pm 0.11

ערכים מציינים ממוצע \pm שגיאת תקן שהתקבלו משבעה צמחים שונים מכל קו.

Asx מציג Asp+Asn, Glx מציג Glu+Gln. ציטטאין וטריפטופן לא נמדדו.

* ערכים ששונים בצורה מובהקת מהערכים שהתקבלו בצמחי הביקורת (SY) ברמה של $P < 1\%$

טבלה מספר 3. הערכים היחסיים של אספרטט, גלוטמט וטראונין חופשיים שהתקבלו בצמחי F_1 ביקורת (SY x Gilboa) וצמחי F_1 אספסת מותמרים בגן לאספרטט קינאז חיידיקי (AK24 x Gilboa). הערכים מציינים ממוצע \pm שגיאת תקן שהתקבלו מארבע צמחים לכל קו.

קו	גלוטמט חופשי מול %	אספרטט חופשי מול %	טראונין חופשי מול %
SY x Gilboa	21.9 \pm 4.49	10.39 \pm 2.1	1.33 \pm 0.35
AK24 x Gilboa	18.32 \pm 3.23	9.03 \pm 2.1	5.88 \pm 1.71*

ערכים ששונים בצורה מובהקת מהערכים שהתקבלו בצמחי הביקורת (SY) ברמה של $P < 1\%$

טבלה מספר 4. הערכים היחסיים של אספרטט וליזין חופשיים שהתקבלו בצמחי ביקורת (SY) וצמחים אספסת מותמרים בגן לדיהידרודיפיקולינט סינתאז הייזקי (DH). הערכים מציינים ממוצע \pm שגיאת תקן שהתקבלו מלפחות שלושה צמחים לכל קו.

קו (מספר צמחים שנבחנו)	ליזין חופשי מול %	אספרטט חופשי מול %
SY (8)	0.21 \pm 0.06	14.6 \pm 0.40
DH301 (3)	0.48 \pm 0.10	12.5 \pm 1.03
DH302 (3)	0.60 \pm 0.11	12.3 \pm 1.30
DH303 (3)	1.27 \pm 0.20*	11.2 \pm 1.08*
DH304 (3)	1.09 \pm 0.35*	11.7 \pm 0.51
DH308 (3)	1.68 \pm 0.33*	10.1 \pm 0.23*
DH309 (3)	1.19 \pm 0.21*	13.6 \pm 0.79
DH310 (3)	3.15 \pm 0.12*	12.0 \pm 1.60
DH313 (3)	0.66 \pm 0.10	12.0 \pm 0.28
DH315 (3)	2.00 \pm 0.06*	9.4 \pm 0.71*
DH323 (3)	0.12 \pm 0.06	12.5 \pm 0.50
DH325 (3)	1.41 \pm 0.08*	11.3 \pm 0.65*
DH327 (3)	1.13 \pm 0.25*	12.5 \pm 0.99
DH330 (3)	1.42 \pm 0.13*	11.2 \pm 0.32*
DH332 (3)	1.30 \pm 0.17*	12.3 \pm 1.06
DH358 (3)	0.80 \pm 0.20	12.6 \pm 1.54

* ערכים ששונים בצורה מובהקת מהערכים שהתקבלו בצמחי הביקורת (SY) ברמה של $P < 5\%$

השתמשנו בנוסחה:

תראונין/ליזין (גר/ק"ג) = $1000 \times \% \text{ חלבון} \times (5\% \text{ תראונין/ליזין חופשי} + 80\% \text{ תראונין/ליזין קשור})$
 כאשר: % חלבון באספסת נא בין 20-23%; 5% מיצג את רמת החומצות אמינו החופשיות.
 כדי לחשב את שיפור הערך התזונתי של צמחי אספסת המותמרים. מצאנו בשני המקריים שהקווים הטובים ביותר הניבו כ-1 גר' תראונין או ליזין לכל ק"ג חומר יבש (רמות שמגיעות לקצה התחתון שבו ראו שיפור בניסיונות הזנה).

טבלה מספר 5. הרכב חומצות אמינו בכלל חלבוני העלוא המסיסים בצמחי ביקורת (SY) ובשלשה צמחי אספסת מותמרים בגן לדיהידרודיפיקולינט סינתאז (DH) חיידקי.

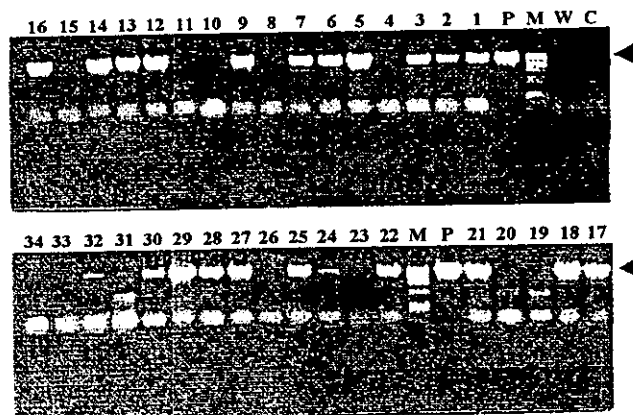
חומצות אמינו	מול % (ממוצע \pm שגיאת תקן)	
	ביקורת (SY)	DH310
Asx	15.4 \pm 1.16	12.4 \pm 0.48
Ser	6.2 \pm 0.60	5.8 \pm 0.29
Glx	12.6 \pm 0.75	11.6 \pm 0.15
Gly	8.5 \pm 0.10	8.8 \pm 0.10
His	1.9 \pm 0.13	2.1 \pm 0.13
Arg	4.3 \pm 0.31	4.6 \pm 0.29
Thr	5.2 \pm 0.08	5.4 \pm 0.10
Ala	8.2 \pm 0.10	8.4 \pm 0.13
Pro	5.4 \pm 0.71	6.3 \pm 0.41
Tyr	2.6 \pm 0.17	2.7 \pm 0.17
Val	6.4 \pm 0.13	6.8 \pm 0.08
Met	1.6 \pm 0.09	1.7 \pm 0.07
Lys	5.6 \pm 0.04	6.0 \pm 0.01*
Ile	4.6 \pm 0.16	4.9 \pm 0.07
Leu	7.6 \pm 0.33	8.0 \pm 0.19
Phe	3.9 \pm 0.19	4.3 \pm 0.10

ערכים מציינים ממוצע \pm שגיאת תקן שהתקבלו משבעה צמחים שונים מכל קו.

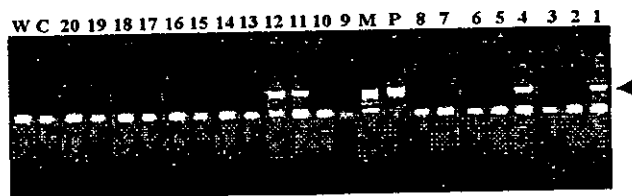
Asx מציג Asp+Asn, Glx מציג Glu+Gln. ציסטאין וטריפטופן לא נמדדו.

*ערכים ששונים בצורה מובהקת מהערכים שהתקבלו בצמחי הביקורת (SY) ברמה של

A.



B.



תמונה מספר 1. אנליזת PCR של צמחי אספסת מותמרים בגן AK. (A) צמחי מותמרים ראשוניים; (B) צמחי F_1 שהתקבלו מהכלאות בין צמחי SY x Gilboa או בין צמחי AK24 x Gilboa. C. צמחי ביקורת; המספר של הצמחים המותמרים מצוין למעלה; W ביקורת מים ללא ד.ג.א.; P ביקורת פלסמיד; M סמן משקל מולקולרי (ϕ x DNA digested with *HeaIII*). החץ מימין מסמן את המיקום המצופה של הבנד של AK החיידקי.

A**AK**

AK 1-

AK 2-

AK 3-

AK 5-

AK 6-

AK 7-

AK 7a-

SY-

AK 9-

AK 12-

AK 13-

AK 14-

AK 16-

AK 18-

AK 21-

AK 22-

AK 24-

AK 25-

AK 27-

AK 28-

AK 29-

AK 30-

AK 32-

B**DHPS**

DHPS301-

DHPS302-

DHPS303-

SY-

DHPS305-

DHPS304-

DHPS306-

DHPS307-

DHPS308-

DHPS309-

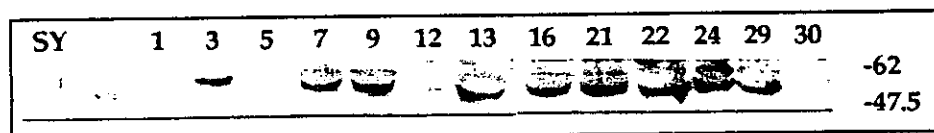
DHPS310-

DHPS311-

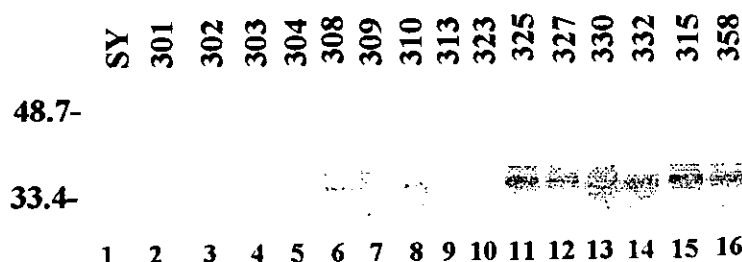
DHPS313-

תמונה מספר 2. אבחון רמות ר.ג.א. שליוח בצמחי אספסת מותמרים לנן אספרטט קינאז (A), ודיהדרודיפיקולינט סינתאז (B). 10 של ר.ג.א. כללי הוספנו על גבי ממברנת (Amersham) Hybond-N ועברו היברידיזציה עם ה-ד.ג.א. המקדד לאספרטט קינאז (A) או המקדד לדיהדרודיפיקולינט סינתאז (B). מספרי הצמחים המותמרים מצוינים משמאל. הסימון SY מציין את צמחי הביקורת.

A



B



תמונה מספר 3. מספוג מערבי של צמחי אספסת מותמרים בגן המקודד ל AK (A) ול DHPS (B). כלל החלבונים המסיסים הופקו מעלים של צמחי אספסת מותמרים והופרדו בגילים של SDS. המספרים מעל הנתיבים מציינים את מספרי קווים המותמרים. ביקורת צמח לא מותר (נתיב SY).

3.2 איפיון הגורמים המשפיעים על הצטברות חלבוני ה S-VSPs מסויה בצמחים הטרוטופיים.

3.2.1 הצטברות חלבוני תשמורת של הרקמה הצמחית בצמחים מותמרים.
בעבודה זו בחנו את הפוטנציאל של שימוש בגנים המקודדים לחלבוני תשמורת של הרקמה הצמחית מסויה ($S-VSP\alpha$ and $S-VSP\beta$) לשיפור ערך תזונתי של צמחים. בתחילה בדקנו האם חלבונים אלו יכולים להצטבר לרמות גבוהות בצמחים מותמרים. לשם כך בנינו את הקונסטרוקט הנ"ל:

1. $CaMV35S-SP-VSP\alpha-ter$

2. $CaMV35S-SP-VSP\beta-ter$

כאשר:

$CaMV35S$ הוא פרומטור רציף מוירוס המוזיקה של הכרובית.
 SP - סיגנל פפטיד המכוון את חלבון ה VSP לתוך הרשתית.
 VSP - הגן המקודד לחלבון התשמורת של הרקמה הצמחית מסויה.
 Ter - אוקטופין סינתאז טרמינטור.

התמרנו צמחי טבק (צמחי מודל) בשני הגנים הנ"ל. תמונה 4 מראה את הצטברות חלבון ה $S-VSP\alpha$ בפרקציות חלבוניות שונות. מתמונה 4 A ניתן לראות שחלבון זה הצטבר לרמות גבוהות בצמחים המותמרים. מתמונה 4 B ניתן לראות שחלבון ה $S-VSP\alpha$ נמצא בפרקציית האלבומינים כמו בצמי הסויה, כמו כן הוא נודד לאותו גובה כמו החלבון ה $S-VSP\alpha$ בצמחי הסויה עובדה המראה שהוא עובר עיבוד נכון ומצטבר בחלליות של הצמחים המותמרים. תמונה 5 מראה את השפעת גיל העלה על הצטברות חלבוני $S-VSP$ בצמחים המותמרים. מתמונה 5 ניתן לראות שבעוד חלבון ה $S-VSP\alpha$ אינו מושפע גיל העלה, חלבון ה $S-VSP\beta$ יורד באופן מובהק בעלים מבוגרים. שני החלבונים הללו הצטברו בצמחים המותמרים לרמות גבוהות גם באיברים נוספים (תמונה 6). בדקנו גם את רמת הצטברות של חלבונים אלו יחסית לחלבונים המסיסים ע"י סריקה של הגילים של ה SDS צבועים בקומסי כחול ובחינת עוצמת הבנד יחסית לכלל החלבונים (טבלה 6). מטבלה 6 ניתן לראות, כאשר משווים את הנתונים בקווים ההטרוזיגוטים ווהומוזיגוטים, שלמספר בגנים ישנה השפעה רבה על הצטברות חלבוני ה $S-VSPs$ משני הטיפוסים. כמו כן, ביטוי של שני הגנים $S-VSP\alpha$ and $S-VSP\beta$ בחלליות יצב את הרמה של חלבון ה $S-VSP\beta$ בעלים המבוקרים.

3.2.2 השפעת המידור התאי על הצטברות חלבוני תשמורת של הרקמה הצמחית בצמחים מותמרים.

לשם הכוונת החלבון $S-VSP\alpha$ למידורי תא שונים נבנו 3 קונסטרוקטים נוספים:

1. כוון לתוך הרשתית $CaMV35S-SP-VSP\alpha-HDEL-Ter$
2. כוון לתוך הכלורופלסט $CaMV35S-TP-VSP\alpha-Ter$
3. כוון לתוך המוהל התא $CaMV35S-VSP\alpha-Ter$

כאשר:

$CaMV35S$ הוא פרומטור רציף מוירוס המוזיקה של הכרובית.
 SP - סיגנל פפטיד המכוון את חלבון ה VSP לתוך הרשתית.
 TP - טרנזיט פפטיד המכוון את חלבון ה VSP לתוך הכלורופלסט.
 $HDEL$ - ארבע חומצות אמינו שהוספו בקצה הקרבוקסילי שהם סיגנל להשארות בתוך הרשתית.
 Ter - נופלין/אוקטופין סינתאז טרמינטור.

התמרנו צמחי מודל בשלשת הקונסטרוקטים הנ"ל. באנליזת חלבוני העלוח של צמחים מותמרים לא אובחנו חלבונים בכל הצמחים (למעלה 40 צמחים לכל קו) בצמחים מותמרים בהם כוון חלבון זה לתוך הרשתית האנדופלסמטית ומוהל התא (תוצאות לא מובאות). בכדי לבחון האם הגן מתבטא בצמחים אלו הפקנו את כלל הר.ג.א. של העלוח של מספר צמחים מיצגים. באנליזת RT-PCR עם פריימרים ייחודיים הראתה שברב הצמחים שנבדקו הגן ל $VSP\alpha$ פעיל אך כנראה שחלבון זה אינו יציב בחלקי התא הללו. בניגוד לשני חלקי תא האלה הכוונת חלבון זה לתוך הכלורופלסטים נמצא שהוא הצטבר לכמויות גבוהות וגם כאן לא הייתה השפעה של גיל העלה על ההצטברות (תמונה מספר A7). מתמונה מספר A7 ניתן לראות שחלבון ה $VSP\alpha$ נדד מהר יותר

בגיל יחסית לחלבון ה- $VSP\alpha$ הטבעי מסויה (נתיב S) שנובע מהעובדה שחלבון המכוון לכלרופלסטים אינו עובר גליקוזילציה ולכן משקלו המולקולרי נמוך יותר. בחנו גם את רמת הביטוי של חלבון זה באיברים שונים בשלשה קווים מותמרים שבהם החלבון הצטבר גבוהה בעלוה (קווים 217, 219 ו-248). ביטוי חזק התקבל רק בקו 219 (תמונה 87). בשני הקווים השניים כמעט ולא הובחן החלבון (תוצאות לא מבואות). בצאנו גם הכלאה בין קווים המבטאים את חלבון ה- $S-VSP\alpha$ בחלליות ובין קווים המבטאים את חלבון זה בפלסטידות במטרה לראות האם ניתן לצבור את החלבון ביותר ממידור אחד (תמונה 8). מתמונה 8 ניתן לראות שחלבון ה- $S-VSP\alpha$ הצטבר בכל עלי הצמח בשתי האורגנלות.

3.2.3 השפעת רמת הליזין החופשי על הצטברות חלבוני תשמורת של הרקמה הצמחית בצמחים מותמרים.

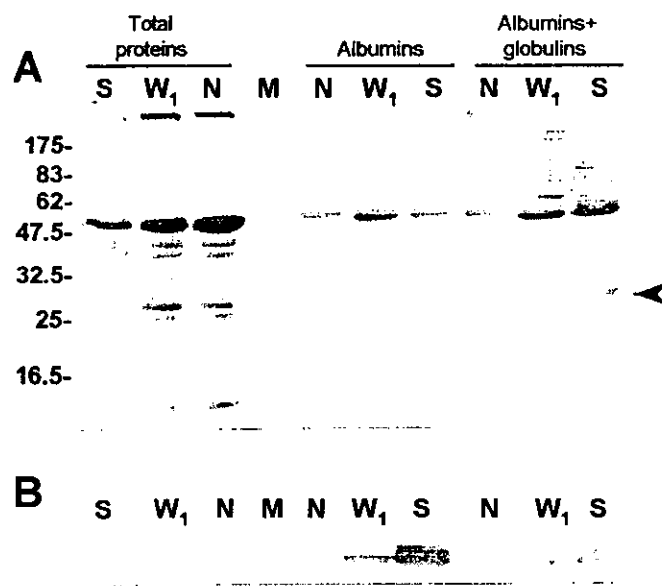
חלבוני ה- $S-VSPs$ הינם חלבונים עתירי ליזין. רצינו לבדוק האם הצטברות של חלבון עתיר ליזין מוגבלת ע"י רמת הליזין החופשי בצמח. לשם כך הכלאנו בין צמחים מותמרים בגן המקודד ל חלבון $S-VSP\beta$ ובין צמחי מותמרים בגן המקודד לחלבון ה- $DHPS$ (צמחי B15) בהם רמת הליזין החופשי גבוהה פי 15 יחסית לצמחים לא מותמרים. טבלה 6 מראה את הצטברות חלבון $S-VSP\beta$ בצמחי F1. ניתן לראות שרמת הליזין החופשי בצמחים הגבילה את רמת הביטוי של חלבון עתיר ליזין כדוגמת חלבון ה- $S-VSP\beta$. עובדה זו מחזקת את הממצאים שהתקבלו בסעיף 3.1 בהם הראנו שרמות הליזין והתראוין באספסת מותמרת מגבילה את השילוב שלהן בתוך חלבונים.

3.3 בחינת השפעת ביטוי ביתר של חלבוני ה- $S-VSPs$ על הערך התזונתי של

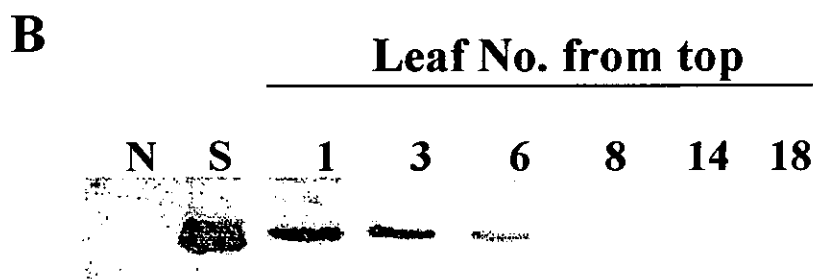
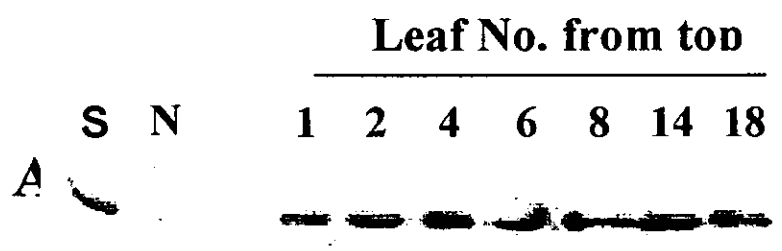
צמחים.

במבחנים ראשוניים לא מצאנו שביטוי ביתר של חלבוני ה- $S-VSPs$ בצמחים מותמרים העלתה את רמת הליזין הקשור בצמחים. זה יכול לנבוע משתי סיבות האחת שרמת הליזין החופשי בצמחי טבק לא מותמרים גבוהה (5.5 מול%) ערך קרוב יחסית לזה של חלבון ה- $S-VSP$; הסיבה הנוספת היא שרמת הליזין החופשי מהווה גורם מגביל בהצטברות חלבונים עתירי ליזין, כך שהצטברות חלבונים אלו באה על חשבון חלבונים אחרים. אנו מבצעים כרגע בדיקה של השפעת ביטוי ביתר של חלבון ה- $S-VSPs$ בצמחי הכלאה בין צמחים אלו לצמחי ה- $DHPS$ לראות האם בצמחים אלו נעלה את רמת הליזין הקשור.

כפי שצויין ברקע המדעי ישנה חשיבות רבה, בהזנת מעלי גרה, ליציבות של החלבון בכרס. בדקנו את יציבות חלבוני אלו לפרוק בכרס הפרה גם בצמחי סויה וגם בצמחים טרנסגניים. מצאנו שחלבוני ה- $S-VSPs$ בסויה היו יציבים עד ל 24 שעות בכרס (נתונים לא מובאים). לעומת זאת בצמחים המותמרים נמצאו הבדלים בין שני הטיפוסים. חלבון ה- $S-VSP\beta$ היה יציב יותר מחלבון ה- $S-VSP\alpha$ ופחות מאשר בצמחי סויה. מתוצאות אלו ניתן לומר שיציבות חלבונים אלו בכרס כנראה מושפעת מהמבנה המרחבי של החלבון. אנו בודקי כעת את היציבות של חלבונים אלו בכרס בצמחים המבטאים את שני החלבונים באותו הצמח.

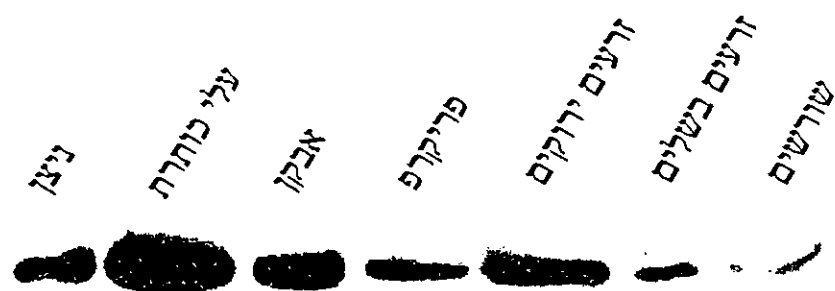


תמונה מספר 4. המצאות חלבון התשמורת של הרקמה הצמחית בפרקציות חלבוניות שונות. החלבונים הופקו מעלים צעירים של צמח מותמר קו W₁, סויה S, וטבק לא מותמר N, במלח נמוך (אלבומינים), במלח גבוה (אלבומינים וגלובולינים ובבופר דוגמא (כלל החלבונים). כל דוגמא מכילה 20 מקרוגרם חלבון שהופרדו בגלים של SDS. A מציין צביעה בקומסי כחול ו-B מציין מספוג מערבי עם נוגדנים כנגד חלבון התשמורת של הרקמה הצמחית. דוגמא M מציינת סמני גודל שגודלם מתואר בצד השמאלי של הגל. החץ מציין את מקום הנדידה של חלבון תשמורת של הרקמה הצמחית.

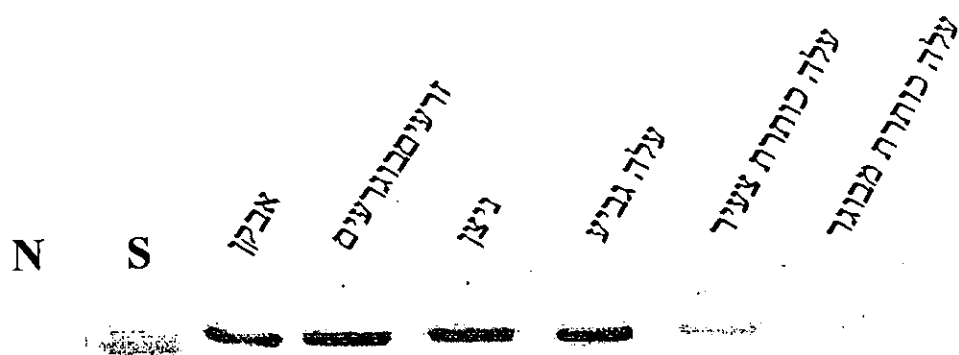


תמונה מספר 5. השפעת גיל העלה על הצבירה של חלבון התשמורת של הרקמה הצמחית בצמחים מותמרים. (A) צמחים מותמרים בגן S-VSP α ; (B) צמחים מותמרים בגן S-VSP β . כל דוגמא מכילה 20 מקרוגרם חלבון שהופרדו בגלים של SDS. S סויה, N וטבק לא מותמר. המספרים מציינים את מספר העלה כאשר 1 מציין את העלה הצעיר ביותר ו-18 את המבוגר ביותר.

A



B



תמונה מספר 6. הצטברות של חלבון התשמורת של הרקמה הצמחית באיברים שונים בצמחים מותמרים. (A) צמחים מותמרים בגן S-VSP α ; (B) צמחים מותמרים בגן S-VSP β . כל דוגמא מכילה 20 מקרוגרם חלבון שהופרדו בגלים של SDS. S סויה, N וטבק לא מותמר.

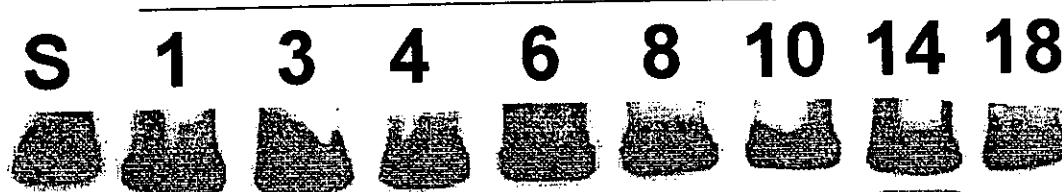
טבלה מספר 6. רמת ההצטברות של חלבוני S-VSPs מסויה בעלים של צמחים מותמרים.
הערכים מציינים את רמת ההצטברות באחוזים יחסית לכלל החלבונים המסיסים.

מספר עלה	VSP α	VSP α Hom	VSP β	VSP β Hom	VSP α	VSP β B15 ¹
1	1.874741	4.218166	1.899744	4.274423	4.039544	3.380113
2	2.030527	4.568685	1.801631	4.053669	4.002452	3.108309
3	2.06221	4.639973	1.571592	3.536081	4.064104	3.151024
4	2.6814	4.69245	1.211287	2.119752	4.051747	3.14305
6	2.660908	4.656589	0.35242	0.616736	3.994712	3.12458
8	2.702153	4.728768	0.259203	0.453606	4.143895	3.110799
10	2.612508	4.571889	0.141499	0.247623	4.002654	2.562016
14	2.557027	4.474797	0.193991	0.339484	4.009221	2.043567
18	2.18543	3.824503	0.008094	0.014165	4.030097	1.866787

1- B15 קו טבק מותמר בגן המקודד ל DHPS ומכיל רמה של פי 15 יותר ליזין חופשי יחסית לצמחי ביקורת.

A

מספר עלה מלמעלה

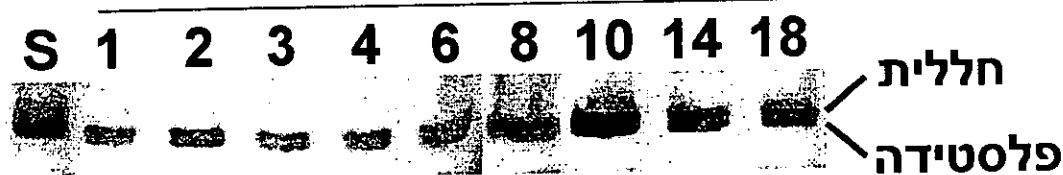


B



תמונה מספר 7. הצטברות של חלבון התשמורת של הרקמה הצמחית בפלסטידות של עלים (A) ואיברים שונים (B) בצמחים מותמרים בגן S-VSP α שכוון להצטברות בתוך הפלסטידות. כל דוגמא מכילה 20 מקרוגרם חלבון שהופרדו בגלים של SDS. S סויה.

מספר עלה מלמעלה



תמונה מספר 8. הצטברות של חלבון התשמורת של הרקמה הצמחית בפלסטידות ובחלליות של עלים בצמחי FI תוצרי הכלאה בין צמחים מותמרים בגן S-VSP α שכוון להצטברות בתוך הפלסטידות ובין צמחים המותמרים בגן S-VSP α שכוון להצטברות בתוך החלליות. כל דוגמא מכילה 20 מקרוגרם חלבון שהופרדו בגלים של SDS. S סויה.

4 מסקנות

הראנו במחקר זה שניתן לשפר ערך תזונתי של צמחים במספר שיטות. מצאנו שהגנים המקודדים לחלבוני התשמורת של הרקמה הצמחית מהווים מקור פוטנציאלי של גנים לשיפור ערך תזונתי של צמחים. אנו בוחנים כיום את האספקטים האחרונים בעבודה ובהמשך אנו מתכוונים ב"נ להתמיר צמחי אספסת בגנים הנ"ל.

5. פרסומים מעבודת המחקר

התקבל לפרסום המאמר:

Galili, S., Guenoune, D., Wininger, S., Badani, H., Schupper, A., Ben-Dor, B. and Kapulnik Y. (2000) Enhanced Levels of Free and Protein-Bound Threonine in Transgenic Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Expressing a Bacterial Feedback-Insensitive Aspartate Kinase Gene. Transgenic Res. 9:137-144.

נשלחו לפרסום או נמצאים בהכנה:

Galili, S., Guenoune, D., Wininger, S., Badani, H., Schupper, A., Ben-Dor, B. and Kapulnik Y. Enhanced Levels of Free and Protein-Bound Threonine in Transgenic Alfalfa (*Medicago sativa* L.) Expressing a Bacterial Feedback-Insensitive Dihydrdipicolinate Synthase Gene.

Dana Guenoune, Rachel Amir, Hana Badani, Shmuel Wolf and Shmuel Galili. Accumulation of a Soybean Vegetative Storage Protein (S-VSP β) in Various Organs of Transgenic Tobacco Plants

Dana Guenoune, Rachel Amir, Hana Badani, Shmuel Wolf, Shmuel Galili
In-vitro and in-situ resistance of soybean vegetative storage proteins to rumen proteolysis

1. מטרת המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה:
התמרת צמחי אספסת בגנים חידקיים המקודדים ל AK ו DHPS
איפיון הגורמים המשפיעים על הצטברות חלבוני ה S-VSPs מסויה בצמחים הטרוטופיים.
בחינת השפעת ביטוי ביתר של חלבוני ה S-VSPs על הערך התזונתי של צמחים.
2. עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח:
התמרת צמחי אספסת בגנים המקודדים ל DHPS and AK וקבלנו עליה מובהקת ברמת הליזין ו
התראוין, בהתאמה. בחנו ומצאנו שחלבוני התשמורת של הרקמה הצמחית מסויה מהווים מקור
גנים פוטנציאלי לשיפור ערך תזונתי של צמחי מספוא.
3. המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו:
שיפרנו את הערך התזונתי של צמחי אספסת. חלבון ה-VSP מסויה הינו חלבון פוטנציאלי לשיפור
הערך התזונתי של צמחים.
4. הבעיות שנוצרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים)
התייחסות המשך המחקר לגביהן.
העברת הגנים המקודדים ל AK ו DHPS לאספסת מקומית מהזן גלבע. התמרת צמחי מספוא
בגנים המקודדים לחלבוני תשמורת של הרקמה הצמחית.
5. האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים, בביליוגרפיה, פטנטים.
הפרסום על ביטוי חלבון ה-VSP התקבל ל-Plant Science. פרסום על ביטוי של AK באספסת
התקבל ל Transgenic Research. נשלח פרסום של עמידות בכרס של חלבוני ה S-VSPs ל
Br. J. of Nutrition