

דו"ח מסכם לתוכנית מחקר 261-0660-08

לימוד המשמעות של צבירת עמילן ופירוקו במהלך התפתחות גרגרי אבקה בהקשר של שמירה על איכות האבקה בתנאי עקה - כמכשיר לשיפור ההנבה בתנאי עקת חום

The role of starch metabolism in thermotolerance of tomato microspores

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

איתן פרסמן	המחלקה לירקות, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן
*נורית פירון	המחלקה לירקות, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן
רחל שקד	המחלקה לירקות, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן
שמואל שן	המחלקה לירקות, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן
לביאה אלטחן	המחלקה לירקות, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן

*Nurit Firon, Vegetable Research, ARO, P.O.B. 6 Bet Dagan. E-mail: vcfiron@agri.gov.il

יוני 2011

סיון תשע"א

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא מחקר את המיותר *

*

חתימת החוקר

תוכן עניינים

2	תקציר.....
3	מבוא.....
4	פירוט עיקרי הניסויים.....
16	דיון.....
17	ביבליוגרפיה.....
19	טופס סיכום עם שאלות מנחות.....
20	נספח א.....

תקציר

חשיפה של מגוון רחב של גידולים לטמפרטורות גבוהות גורמת לפגיעה משמעותית ביכול כשהסיבה העיקרית לכך היא הפגיעה בגרגרי האבקה המתפתחים. בעבר הראנו שבצמחי עגבנייה שנחשפו לתנאי עקת חום הירידה באיכות האבקה הייתה מלווה בירידה מוקדמת בתכולת העמילן, ובעקבותיה ברמת הסוכרים המסיסים. אולם, הקשר הישיר בין מטבוליזם סוכרים תקין והיכולת לצבור ולפרק עמילן בגרגרי אבקה מתפתחים, לבין עמידות גרגרי האבקה לתנאי עקת-חום עדיין לא הוכח. מטרות תוכנית המחקר היו: א. ביסוס הממצא שיכולת הביוסינתיזה ו/או הפירוק של עמילן הינה בעלת חשיבות בשמירת איכות האבקה בתנאי עקת-חום - תוך שימוש במוטנטים חסרי-עמילן ומוטנטים הפגומים ביכולת פירוק העמילן. ב. בחינת ההיפותזה שהשינויים ברמות הסוכרים מהווים גורם מכריע המשפיע על איכות האבקה. ג. זיהוי צמתי בקרה. תוצאות המחקר הראו שגרגרי האבקה של מינים שונים ממשפחת הסולניים (עגבנייה, פלפל, חציל) משמשים כמבלע וצוברים סוכרוז במהלך תהליך ההבשלה. כשמקור הסוכרוז הינו מפירוק העמילן שהצטבר בשלב מוקדם יותר (2-3 ימים לפני פתיחת הפרח). בגרגרי האבקה המתפתחים רואים פירוק של סוכרוז וסינתיזה מחדש, כשלאנזים סוכרוז פוספאט סינאז תפקיד מרכזי בסינתיזה ובהצטברות סוכרוז בגרגרים הבשלים. בנוסף, הראנו שהאנזים פרוקטוקינאז 2, העשוי להוות ספק של מולקולות סובסטרט לסנתיזה של סוכרוז, והאנזים אינברטאז אפופלסטי עשויים להוות צמתי בקרה נוספים. על מנת לבסס את הממצא שיכולת הביוסינתיזה של עמילן הינה בעלת חשיבות בשמירת איכות האבקה בתנאי עקת-חום, אפיינו את מטבוליזם הסוכרים ואיכות האבקה, בתנאי ביקורת ותנאי עקת-חום, בגרגרי האבקה של מוטנט חסר-עמילן של *N. sylvestris* הפגום באנזים phosphoglucosyl transferase (pgm). גרגרי האבקה המתפתחים של טיפוס הבר המצטיינים בנוכחות רמות גבוהות של עמילן גילו עמידות רבה יותר לעקת-חום (הן חשיפה קצרה לטמפרטורות גבוהות והן לחשיפה ממושכת לטמפרטורות גבוהות מתונות יחסית) בהשוואה למוטנט שאיננו צובר עמילן במהלך הבשלת האבקה בשל מוטציה באנזים phosphoglucosyl transferase. גרגרי האבקה של טיפוס הבר גם נבטו טוב יותר מגרגרי המוטנט בטמפרטורות גבוהות. שני ממצאים אלה מחזקים את ההנחה המוקדמת שנוכחות רמות גבוהות של עמילן בגרגרי האבקה המתפתחים, מקנות לגרגרים הבשלים את היכולת להתמודד עם תנאי עקת חום, הן במהלך התפתחותם והן בזמן הנביטה. על מנת לבחון את התפקיד האפשרי של מטבוליזם הסוכרים באבקה כספק של אוסמוליטים או osmoprotectants בוצעה אנליזה מטבולומית כמותית (שימוש ב-GC-MS) של מגוון מטבוליטים בגרגרי אבקה מבשילים (דרגת התפתחות A-2 – דרגת ההתפתחות שהראתה רגישות גבוהה לעקת-חום קצרה) וגרגרים בשלים של צמחי זן בר ומוטנט הפגוע באנזים פוספוגלוקומוטאז עמילופלסטי (pgm) במקביל לאנליזות סוכרים (שימוש ב-HPLC). ההבדל המשמעותי העיקרי היה ברמת הסוכרוז בגרגר הבשל שהייתה נמוכה באופן משמעותי בגרגרי האבקה של המוטנט בהשוואה לגרגרי האבקה של זן הבר. בחינת השינויים במהלך היממה (צהרים, ערב ושעות הבוקר המוקדמות) ברמת העמילן ורמת הסוכרים בגרגרי האבקה של המוטנט ושל זן הבר העלתה שהחום גרם לירידה חדה ברמת הסוכרוז באבקה הבשלה של המוטנט בכל שעות היממה. ירידה זו יכולה להסביר את הירידה באיכות האבקה של המוטנט בחום. גם בזן הבר קיימת ירידה ברמת הסוכרוז אך בממדים קטנים יותר. למולקולות הסוכרוז עשוי, אם כן, להיות תפקיד חשוב בשמירה על איכות האבקה, הן בהגנה על חלבונים וממברנות מפני פגיעה בזמן החשיפה לעקה והן באספקת האנרגיה הדרושה לנביטה.

מבוא

הטמפרטורות הגבוהות בחודשי הסתיו, האביב, ובייחוד בקיץ, פוגעות ביבול ובאיכות הפרי של גידולים רבים כמו עגבנייה, פלפל, ומלונים. בעיה זו מחריפה עם ההעברה של גידול הצמחים מהשטח הפתוח – לבתי צמיחה, בשל החשש מהינגעות בוירוסים. עקת החום אליה נחשפים הצמחים כוללת חשיפה ממושכת לטמפרטורות בטווח של כ- $30-35^{\circ}\text{C}$ ביום גם תקופות קצרות של טמפרטורות-יום קיצוניות שעלולות לעלות על 40°C . מחקרים רבים, ביניהם מחקרים שלנו [1, 2] מראים שהפגיעה בחנטה והיבול בעגבניות, וכנראה גם בגידולים אחרים, נובעת בעיקר בשל פגיעה באיכות האבקה. הפגיעה באבקה מתבטאת הן בירידה במספר הגרגרים לפרח, והן בירידה בחיוניות ובכושר הנביטה של האבקה. לאחרונה גם הראנו קורלציה בין עמידות לחום של מגוון זנים, מבחינת החנטה והיבול, לבין הכמות ואיכות האבקה שלהם [2].

לאחרונה מצטברות עדויות לחשיבותו של העמילן, הסוכרים המשתתפים בבנייתו, ותוצרי הפרוק שלו בקביעת איכות האבקה - במיוחד בתנאי עקה. בדו-פסיגיים (עגבניות), העמילן מצטבר במהלך התפתחות גרגרי האבקה אבל מתפרק לסוכרים פשוטים יותר בימים האחרונים (1-2 ימים) לפני פתיחת הפרח. כך שבשלב ההתפתחות המאוחרים של גרגרי האבקה ניתן למצוא בהם תערובת של סוכרים מסיסים ועמילן. היחסים בין פחמימות אלה מושפעים, בין השאר, ע"י תנאי הסביבה.

למטבוליזם הסוכרים בגרגרי האבקה המתפתחים והבשלים חשיבות בקביעת איכות האבקה בשל הסיבות הבאות: היותם ספק של אנרגיה לתהליכי ההתפתחות והנביטה, שימושם כאוסמוליטים המסייעים בהגנה על התאים מפני תאי עקה, וכן בשל ההשפעה של רמות סוכרים (כמו סוכרוז, לדוגמא) על רמות ביטוי של מגוון גנים. הראנו שקיים מתאם בין רמת העמילן המצטברת בגרגרי אבקה של עגבנייה 3 ימים לפני פתיחת הפרח לבין עמידות הגרגרים לתנאי עקת-חום [2]. אולם, הקשר הישיר בין מטבוליזם סוכרים תקין והיכולת לצבור ולפרק עמילן בגרגרי אבקה מתפתחים, לבין עמידות גרגרי האבקה לתנאי עקת-חום עדיין לא הוכח.

התפתחות גרגרי אבקה

גרגרי האבקה רגישים ביותר למגוון רחב של עקות סביבה, כולל עקת-חום. השלבים הרגישים הינם שלב המיזוג ושלבי ההבשלה הפוסט-מיוטיים. גרגרי האבקה מתפתחים מתאי אם האבקה, בתוך המאבק. לאחר המיזוג נוצרות גמטות הפלואידיות וניתן להבחין בטטרדות העטופות במעטה של הרב-סוכר קאלוז. לאחר עיכול הקאלוז ישחררו מיקרוספורות בודדות לתוך החלל הלוקולרי. פרק ההתפתחות משלב המיקרוספורות ועד להבשלת הגרגרים נקרא מיקרוגמטוגנזה. בשלב ההבשלה גרגרי האבקה מבודדים סימפלסטית ומקבלים את חומרי ההזנה מהנוזל הלוקולרי [3].

השפעת עקת-סביבה על איכות האבקה ומטבוליזם הסוכרים בגרגרי האבקה המתפתחים

גרגרי האבקה הינם שלב ההתפתחות הרגיש ביותר לחום, כמו גם לעקת-סביבה אחרות, במגוון רחב של גידולים [4-7]. מגוון עבודות הראה שעקות סביבה משפיעות על מטבוליזם הסוכרים באבקן ובגרגרי האבקה המתפתחים [8-10]. גם העדויות והראיות לחשיבותו של העמילן בקביעת איכות האבקה, במיוחד בתנאי עקה, מתרבות ומצטברות בשנים האחרונות [2, 11]. בדו-פסיגיים, העמילן מצטבר במהלך התפתחות גרגרי האבקה אבל מתפרק לסוכרים פשוטים יותר בימים האחרונים (1-2 ימים) לפני פתיחת הפרח. בדגניים העמילן הולך ומצטבר והוא מהווה את סוכר התשמורת בגרגרי האבקה הבשלים. מצאנו שבעגבניות אשר נחשפו לתנאי עקת חום, הירידה באיכות האבקה הייתה מלווה בירידה מוקדמת בתכולת העמילן ובעקבותיה ברמת הסוכרים

המסיסים [1]. בנוסף, מצאנו שזני עגבנייה עמידים לחום מסוגלים לאגור ולשמור על רמת עמילן גבוהה בגרגרי האבקה, גם בתנאי חום, ואיכות האבקה שלהם נשארת גבוהה וכשר החנטה טוב בתנאים אלה [2].

היפותזת העבודה שלנו הייתה: ליכולת לצבור עמילן במהלך המיקרוגמטוגנזה שני יתרונות עיקריים: א.

העלאת כושר המבלע של גרגרי האבקה המתפתחים, דבר המאפשר העלאת רמות הסוכרים המשמשים הן כאוסמוליטים בגרגר המבשיל (המתייבש בשלב ההבשלה הסופי) והן לאספקת אנרגיה לגרגר הנובט. ב. שימוש כ"בופר" לנטרול תנודות בריכוז סוכרים במהלך היממה ובתגובה לתנאי עקה. להערכתנו יש צורך ברמת-סף מסוימת של עמילן על מנת לאפשר את הבשלת גרגרי האבקה ויצירת גרגרים איכותיים, כלומר גרגרי אבקה בעלי כושר נביטה גבוה. בסולניים, שלב התפתחות גרגרי האבקה הפעיל ביותר מבחינת הצטברות עמילן נמצא בטווח שבין 4 ימים ל-2 ימים לפני פתיחת הפרח [1]. מעניין לציין ששלב זה הינו גם השלב הרגיש ביותר לעקת חום [1, 2]. היפותיזת העבודה שלנו גם כוללת קיום צמתי בקרה המגיבים לחום ושולטים על תהליך צבירת העמילן וכוללים את האינברטאז, Phosphoglucumutase (pgm), ו-AGPase.

מטרות תכנית המחקר לתקופת הדו"ח:

- א. ביסוס הממצא שליכולת האגירה של עמילן ולמטבוליזם שלו חשיבות רבה בשמירת איכות האבקה בתנאי עקת-חום - תוך שימוש במוטנטים חסרי-עמילן ומוטנטים הפגומים ביכולת פירוק העמילן.
- ב. בחינת ההיפותיזה שהשינויים/תנודות ברמות הסוכרים משפיעים במידה מכרעת על איכות האבקה.
- ג. זיהוי צמתי בקרה.

פירוט עיקרי הניסויים וכלל התוצאות שהתקבלו

א. ביסוס הממצא שליכולת האגירה של עמילן ולמטבוליזם שלו חשיבות רבה בשמירת איכות האבקה

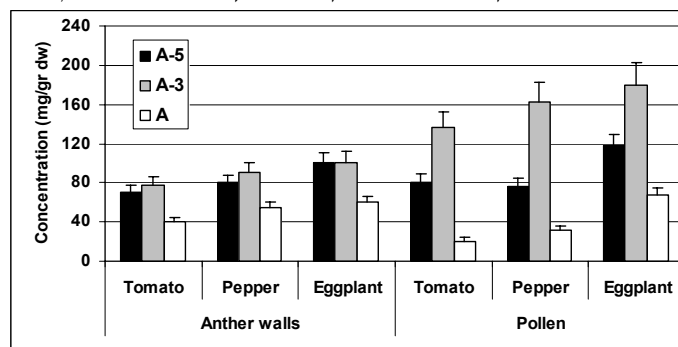
בתנאי עקת-חום - תוך שימוש במוטנטים חסרי-עמילן

השיטות והחומרים ששימשו במהלך המחקר מופיעים בנספח א. המצורף לדו"ח.

1. לימוד השינויים במשק העמילן והסוכרים בחלקי האבקן השונים, במהלך ההבשלה של האבקנים והאבקה, במינים שונים של משפחת הסולניים

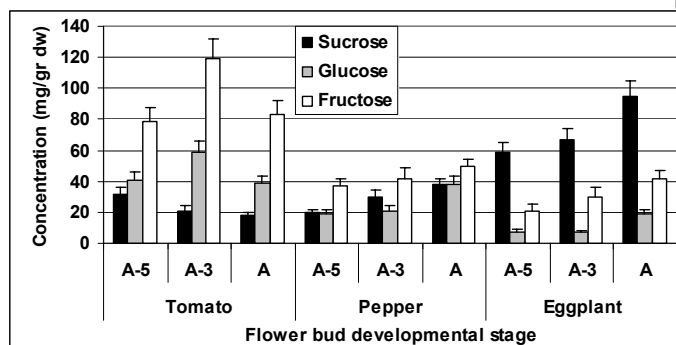
נבחנו רמות העמילן והסוכרים המסיסים ברקמות השונות של האבקן – דפנות המאבק, הנוזל הלוקולרי וגרגרי האבקה המתפתחים - במהלך הבשלת גרגרי האבקה. באיור 1 ניתן לראות שבדפנות המאבק, בשלושה מינים של משפחת הסולניים, עגבנייה, פלפל וחציל, רמת העמילן הייתה שווה 5 ו-3 ימים לפני פתיחת הפרח ובשלושתם היא קטנה לקראת פתיחת הפרח. בגרגרי האבקה ניתן להבחין באגירה של עמילן 3 ימים לפני פתיחת הפרח ובירידה חדה בתכולתו לקראת פתיחת הפרח.

איור 1: השינויים בריכוז העמילן בדפנות המאבק ובגרגרי האבקה במהלך הבשלת הפרח, בשלושה נציגים של משפחת הסולניים

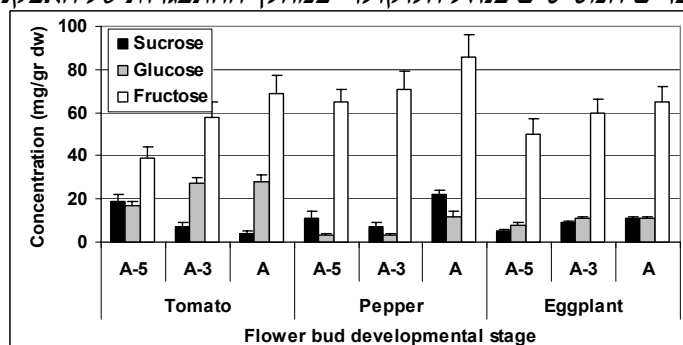


באיור 2 ניתן לראות שקיימים הבדלים בין המינים מבחינת רמת הסוכרים המסיסים במהלך ההבשלה, כאשר בעגבנייה הסוכר העיקרי היה פרוקטוז, בפלפל ריכוז שלשת הסוכרים היה דומה, ובחציל הסוכר העיקרי היה סוכרוז.

איור 2: השינויים בריכוז הסוכרים המסיסים בדפנות המאבק במהלך ההתבגרות (ההבשלה) של האבקנים בשלשה נציגים של משפחת הסולניים



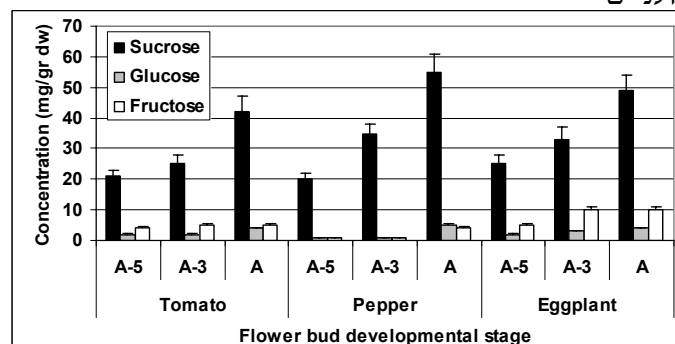
איור 3: השינויים בריכוז הסוכרים המסיסים בנוזל הלוקולרי במהלך ההתבגרות של האבקנים בשלשה נציגים של משפחת הסולניים



באיור 3 ניתן לראות שבשלושת המינים הסוכר העיקרי בנוזל הלוקולרי במהלך הבשלת האבקן היה פרוקטוז, כשרמתו גבוהה פי 3 עד 5 מרמת שני הסוכרים האחרים, ורמה זו נשמרה לאורך תקופת ההבשלה.

באיור 4 ניתן לראות שבגרעי האבקה התמונה השתנתה, והסוכר העיקרי הינו הסוכרוז, המהווה 75-80% מכלל הסוכרים, בשלושת המינים. כלומר, מתוך התוצאות המוצגות באיורים 1-5, ניתן לראות שגרעי האבקה של מיני משפחת הסולניים משמשים כמבלע וצוברים סוכרוז במהלך תהליך ההבשלה. כשמקור הסוכרוז הינו כנראה מפירוק העמילן שהצטבר בשלב מוקדם יותר (2-3 ימים לפני פתיחת הפרח).

איור 4: השינויים בריכוז הסוכרים המסיסים בגרעי האבקה במהלך הבשלת האבקנים וגרעי האבקה, בשלשה נציגים של משפחת הסולניים



2. גרגרי אבקה מבשילים של עגבנייה אינם צוברים מלטוז

בשל המידע הקיים בספרות על חשיבות מלטוז כ- osmoprotectant בתנאי עקה שונים, הייתה חשיבות לבחון האם קיימת הצטברות מלטוז בגרגרי האבקה. באנליזות סוכרים באמצעות HPLC (כמפורט ב- [1-2]) הסתבר שהפיק של סוכרוז ומלטוז חופפים. כדי להבחין בין מלטוז לסוכרוז, בוצעה האנליזה בנוכחות ובהעדר של האנזים אינברטאז. התוצאות הראו שגרגרי האבקה אינם צוברים מלטוז.

3. בחינת חשיבות צבירת העמילן במהלך הבשלת גרגרי האבקה – ע"י אפיון מוטנטים הפגומים ביכולת צבירת העמילן באבקה

עגבנייה

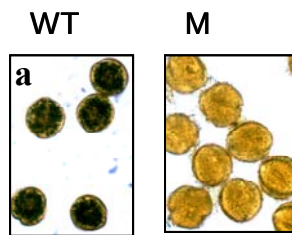
בוצעה סריקה של אוכלוסיית מוטנטים שעברו טיפול ב-EMS (התקבלו מפרופ, דני זמיר מהפקולטה לחקלאות) לחסר של עמילן בעלים ובגרגרי אבקה מתפתחים. נבחן מספר גדול של צמחים, חלקם לאחר 3-4 מחזורי סלקציה. אולם, באף אחד מהצמחים שהראו מחסור בעמילן בעלים לא נמצאו גרגרי אבקה מתפתחים עם רמות עמילן נמוכות בהשוואה לזן הבר M82.

Nicotiana sylvestris

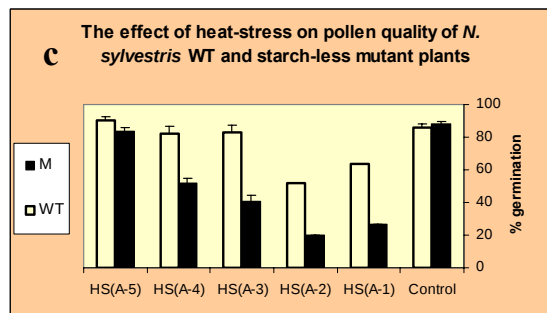
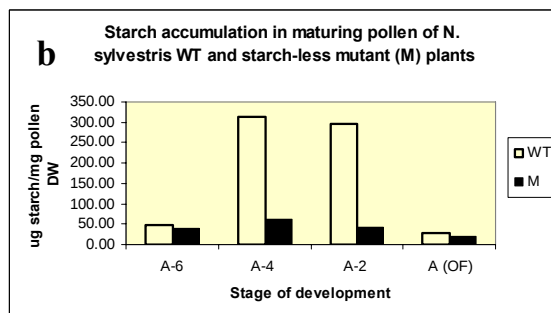
אפיינו מוטנט של טבק (*Nicotiana sylvestris*) חסר עמילן בעלים, הפגוע באנזים **phosphoglucomutase** (**pgm**) [12] ומצאנו שגם גרגרי האבקה של המוטנט אינם אוגרים עמילן (הצטברות רמות נמוכות של עמילן) במהלך ההבשלה, בעוד שטיפוס הבר (WT) אוגר עמילן בגרגרי האבקה כששיא האגירה הוא בטווח של 2-4 ימים לפני הפרח (איור 5).

השפעה של עקת-חום קצרה (acute heat-stress) על איכות אבקה ומטבוליזם הסוכרים

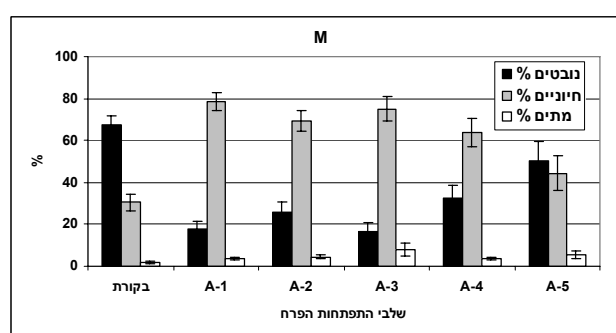
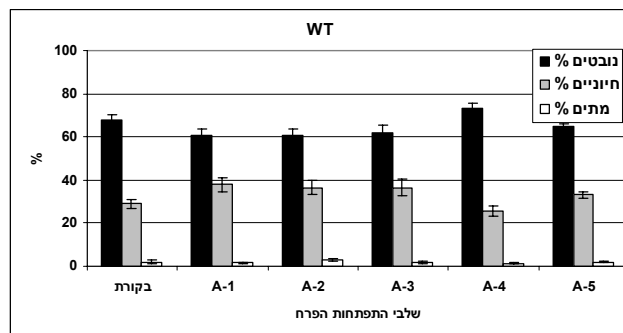
מצאנו שבתנאי טמפרטורה נוחים רמת הסוכרים המסיסים באבקה הבשלה של המוטנט כמו גם יכולת הנביטה של הגרגרים, דומים לאלה שבטיפוס הבר. אולם, בעקבות חשיפת הצמחים לחום (2.5 שעות ב- 45°C) שעורי הנביטה של גרגרי האבקה של המוטנט פחתו במידה רבה בהשוואה לאבקה של צמחי הבר (איור 5).



איור 5: הצטברות עמילן בגרגרי אבקה מתפתחים של צמחי *N. sylvestris* מוטנטיים (M) וטיפוס הבר (WT) (a, b) והשפעת עקת-חום על איכות האבקה (c). (a) מיקרוספרות בשלב של 3 ימים לפני פתיחת הפרח (A-3) צבועים לעמילן (ב- I/KI). (b) קביעת רמות עמילן באבקה המתפתחת כמתואר ב- [1]. (c) השפעת עקת-חום (חשיפה ל-45°C למשך 2.5 שעות) על שעורי הנביטה של גרגרי האבקה שנדגמו מצמחי WT וצמחי מוטנט. הפרחים נחשפו לעקת-חום בשלבי התפתחות שונים של הפרח המתאימים לשלבים הפוסט-מיוטיים של הבשלת האבקה. A – אנתזיס. A-n מסמל n ימים לפני פתיחת הפרח.



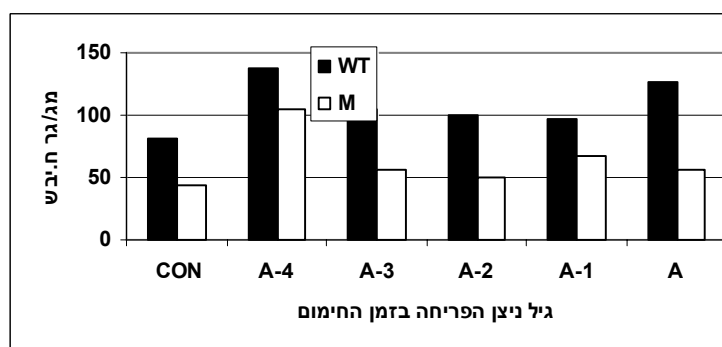
איור 6: השפעת חשיפת צמחי טבק לטמפרטורת גבוהות (45°C למשך שעותיים) על כשר נביטת האבקה בטיפוס הבר (WT), איור שמאלי ובמוטנט (M, איור ימני)



בטיפוס הבר (WT) לא הייתה השפעה לחשיפה הקצרה של הצמח לעקת-חום על יכולת הנביטה של גרגרי האבקה הבשלים. במוטנט (M), לעומת זאת, החימום גרם לירידה בכשר הנביטה בגרגרים שנחשפו לחום בגילאים של A-1 (יום לפני פתיחת הפרח) עד A-4 (4 ימים לפני פתיחת הפרח; איור 6). עם זאת אחוז הגרגרים המתים לא עלה בעקבות החימום בטיפוס הבר ובמידה מועטה בלבד המוטנט. כלומר, הפגיעה בכושר צבירת העמילן באבקה המבשילה גורמת לירידה משמעותית בכושר נביטת האבקה בעקבות חשיפתה לתנאי עקת-חום.

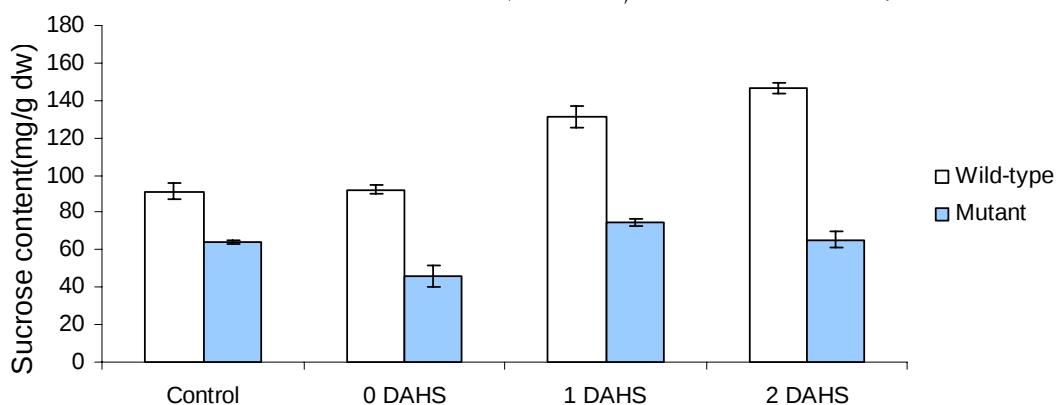
בבחינת רמות הסוכרים המסיסים בגרגרי אבקה מתפתחים של צמחי *N. sylvestris* (NS) מוטנטיים וטיפוס הבר, נמצא רק סוכרוז ברמות מדידות בשימוש ב-HPLC. ריכוזי גלוקוז ופרוקטוז היו מתחת לסף רגישות המכשיר. בגרגרי האבקה הבשלים של טיפוס הבר רמת הסוכרוז הייתה גבוהה יותר מאשר במוטנט, הן בתנאי ביקורת (CON) והן בתנאי עקת-חום (איור 7).

איור 7: השפעת החשיפה לטמפרטורות גבוהות (45°C למשך שתיים) של ניצני פריחה של טבק בגילאים שונים על ריכוז הסוכרוז בגרגרים הבשלים (A),



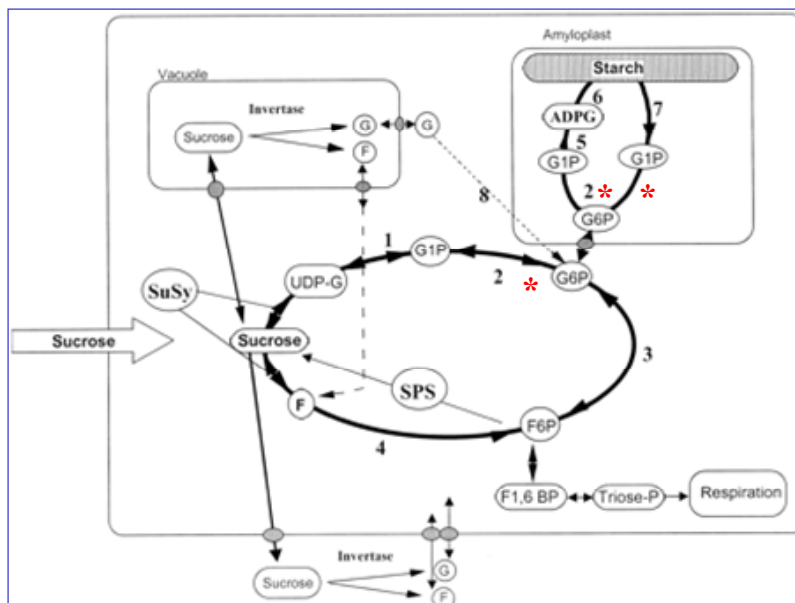
איור 8 מסכם את השפעת החימום הקצר על תכולת הסוכרוז בגרגרי האבקה הבשלים. בין הבר חימום יום או יומיים לפני פתיחת הפרח גרם לעליה בתכולת הסוכרוז בגרגרי האבקה הבשלים ואילו במוטנו הוא לא השפיע ורמות הסוכרוז היו נמוכות באופן משמעותי.

איור 8: רמת הסוכרוז בגרגרי אבקה בשלים של המוטנט וזן הבר בתנאי ביקורת ($28/22^{\circ}\text{C}$; Ccontrol) ובעקבות חשיפה לטמפרטורות גבוהות (45°C למשך שתיים) – מייד לאחר החימום (0 DAHS) או יום או יומיים לאחר החימום (1 DAHS ו-2 DAHS, בהתאמה).



כלומר, במהלך שנת המחקר הראשונה הראנו שגרגרי האבקה של טיפוס הבר גילו עמידות רבה יותר לחשיפה קצרה לטמפרטורות גבוהות, בהשוואה למוטנט, והתחלנו באפיון מטבוליזם הסוכרים בגרגרי האבקה המבשילים של המוטנט בהשוואה לזן הבר. בשנה השנייה הרחבנו את העבודה ובצענו אנליזה מטבולומית כמותית של מגוון מטבוליטים בגרגרי אבקה מבשילים (דרגת התפתחות A-2 – דרגת ההתפתחות שהראתה רגישות גבוהה לעקת-חום קצרה, איור 5) וגרגרים בשלים של צמחי WT וצמחי מוטנט הפגוע ב-pgm עמילופלסטי של NS בתנאי ביקורת וחום. זאת על מנת לבחון את התפקיד האפשרי של מטבוליזם הסוכרים באבקה המבשילה כספק של אוסמוליטים או osmoprotectants. האנליזה בוצעה ע"י ולדימיר שולאב מאוניברסיטת וירג'יניה בשיתוף עם רון מיטלר מאוניברסיטת נבדה בארה"ב. התוצאות מוצגות בטבלאות מס. 1-3 בנספח א. האנזים pgm אחראי לריאקציה ההפיכה של Glc-6-P ל-Glc-1-P. כתוצאה מכך צפוי שבמוטנט תהיה הצטברות של מולקולות Glc-6-P. בגרגרי אבקה אין כלורופלסטים ולכן אנו מניחים שהפגיעה

הינה באנזים עמילופלסטי. מולקולות Glc-6-P צפויות לעבור מהעמילופלסט לציטופלסמה ועשויות להפוך ל-Frc-6-P כתוצאה מפעילות האנזים פוספוגלוקוזאיזומראז (pgi). מולקולות Frc-6-P עשויות לשמש כסובסטרט, וגם לבקר בקרה חיובית, יצירה של סוכרוז-6-P, ע"י האנזים סוכרוז פוספאט סינתאז ובנוכחות מולקולות UDP-Glc. לא קיים מידע על רמות סוכרים ומטבוליטים אחרים באבקה מתפתחת של מוטנטים הפגועים באנזים פוספוגלוקומוטאז. לאחרונה [13] דווח שלמטבוליטים שונים כמו raffinose טרהאלוז, עשוי להיות תפקיד בהגנה מפני עקות. מתוך התוצאות המוצגות בטבלה מס. 1 ניתן לראות שבתנאי בקורת בגרגרי אבקה מבשילים ובשלים של המוטנט רמה גבוהה יותר של מגוון סוכרים, כולל סוכרים מזרחנים ואינוזיטול, יחסית לזן הבר. תוצאות אלה מתאימות למדווח בספרות. כמו כן, ניתן לראות רמות גבוהות יותר של החומצות האורגניות גלוטמית, גמה אמינו חומצה בוטירית וחומצה ציטרית, ובחומצות האמיניות פניל אלנין, ליזין, אספרגין וארגינין. כלומר, ניתן לראות שלפגיעה באנזים העמילופלסטי pgm השפעה הן על מטבוליזם



- (1) UDP-glucose pyrophosphorylase,
- (2) phosphoglucomutase
- (3) phosphoglucose isomerase,
- (4) fructokinase and hexokinase,
- (5) ADP-glucose pyrophosphorylase,
- (6) starch synthase,
- (7) starch phosphorylase and amylase,
- (8) glucokinase and hexokinase.

סכימה מס. 1. תיאור סכימתי של מטבוליזם הסוכרים בפרי מתפתח של עגבנייה.

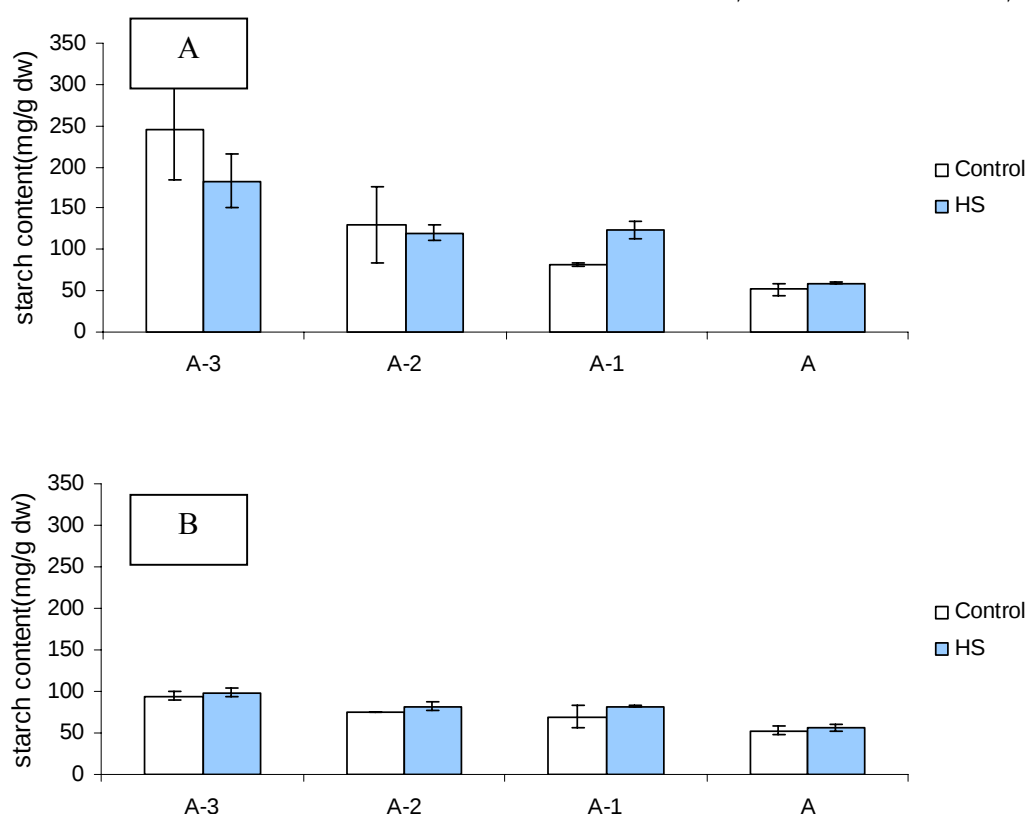
הסוכרים והן על מטבוליטים נוספים, כולל חומצות אמיניות הקשורות למטבוליזם אספרגין. חשיפת האבקה לתנאי עקת-חום (שעתיים ב-45°C) הביאה לצמצום ההבדל בין המוטנט לזן הבר מבחינת רמת המטבוליטים השונים באבקה (טבלה 2). ההבדלים שנצפו היו בעיקר כשעקת החום הופעלה על אבקה מבשילה (דרגת התפתחות A-2): בגרגרים של המוטנט נצפתה רמה גבוהה יותר של ארגינין, פרולין, וחומצה גמה אמינו בוטירית. עקת-החום גרמה לירידה באלנין, ארגינין, אספרגין, פרולין וחומצה גלוטמית ובסוכרים גלקטוז, גלוקוז ומנוז.

השפעה של עקת חום מתמשכת (mild chronic heat-stress)

בגרגרי האבקה המבשילים של *N. sylvestris*, כמו בסולניים אחרים, חלה ירידה בתכולת העמילן משלשה ימים לפני פתיחת הפרח (A-3) ועד יום הפתיחה (A). אבל אין התרוקנות מוחלטת מעמילן. בגרגרים הבשלים

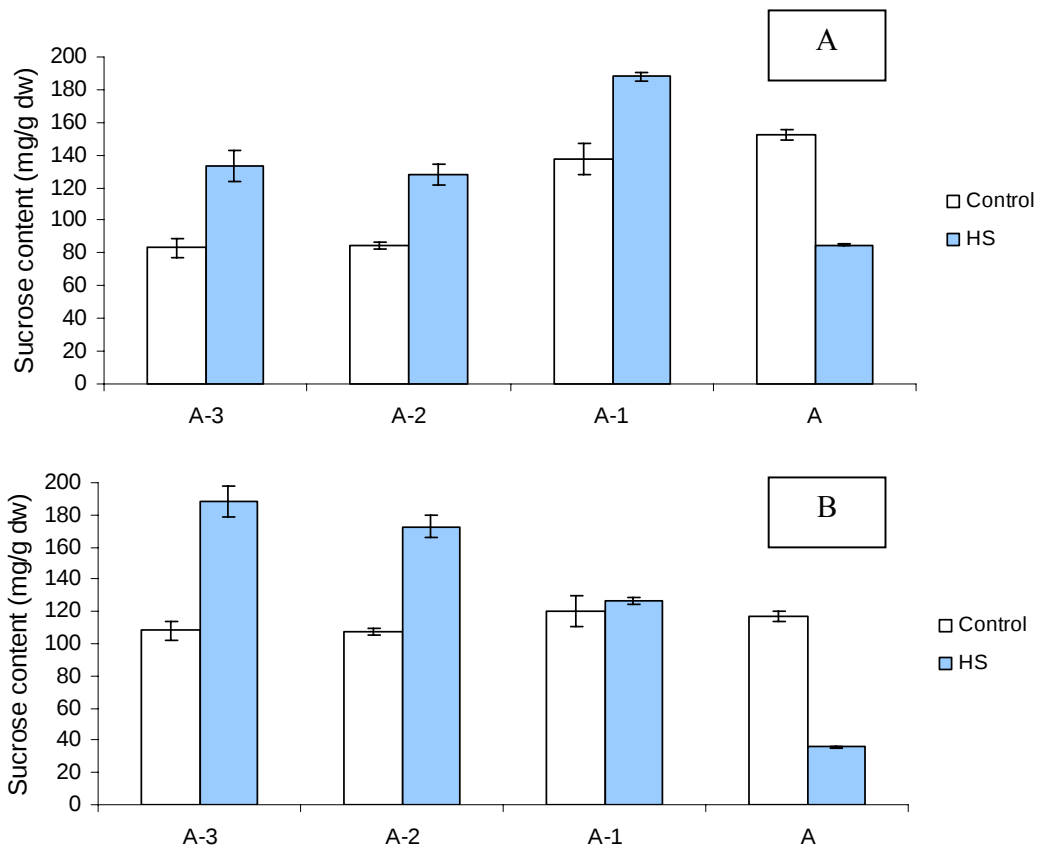
נשארת רמת עמילן של כ- 50 מג'ג' ח. יבש. טיפול החום גרם לירידה בתכולת העמילן ב-A-3 (איור 9A). במוטנט הרמה ההתחלתית של עמילן ב-A-3 הייתה נמוכה יותר (כ- 100 מג'ג' ח. יבש) ולקראת פתיחת הפרח והבשלת גרגרי האבקה נותרה מחצית מכמות זו. אך גם במוטנט נותר עמילן בריכוז של כ- 50 מג'ג' חומר יבש בגרגרים הבשלים (איור 9B). טיפול החום לא הפחית את תכולת העמילן באף אחד משלבי ההבשלה של גרגרי האבקה.

איור 9. תכולת העמילן בגרגרי אבקה מבשילים של *N. Sylvestris*, זן הבר (A) והמוטנט *pgm* (B), בתנאי ביקורת (Control) ותנאי עקת-חום (HS).

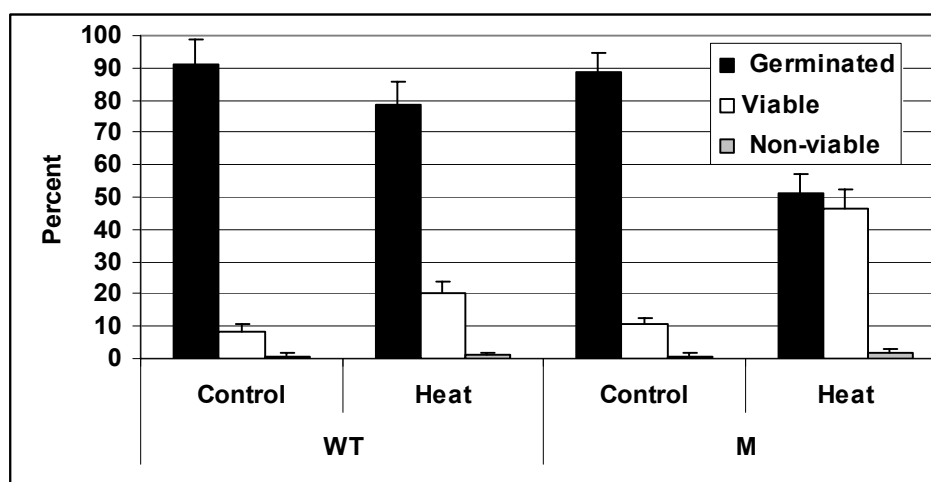


חשיפת הצמחים לעקת-חום מתונה מתמשכת גרמה לעלייה בריכוז הסוכרוז בגרגרי האבקה המתפתחים (בשלבי ההתפתחות של 3 עד 1 ימים לפני פתיחת הפרח) ולירידה ברמת הסוכרוז בגרגרים הבשלים, הן בצמחי זן הבר והן בצמחי המוטנט (איור 10 A ו-B, בהתאמה. אולם בגרגרים הבשלים (A) חלה ירידה של 50% בריכוז הסוכרוז בזן הבר ושל 70% במוטנט. כתוצאה מכך בגרגרי זן הבר היו 84 מג'ג' ח. יבש ואילו בגרגרי המוטנט רק 36 מג'ג' ח. יבש. עקת-חום מתמשכת לא השפיעה על שעורי הנביטה בזן הבר. בעוד שבמוטנט החימום גרם לירידה של כ-50% באחוזי הנביטה (איור 11). בשני הזנים החימום לא גרם לעליה בשעורי הגרגרים המתים.

איור 10. תכולת הסוכרוז בגרגרי אבקה מבשילים של *N. Sylvestris*, זן הבר (A) והמוטנט *pgm* (B), בתנאי ביקורת (Control) ותנאי עקת-חום (HS).



איור 11. השפעת עקת-חום מתונה מתמשכת על איכות גרגרי האבקה של זן הבר של *N. sylvestris* (WT) ושל מוטנט *pgm* (M). איכות גרגרי האבקה נקבעה ע"י חישוב אחוז הגרגים הנובטים, החיוניים והמתים כמפורט ב-[1,2].



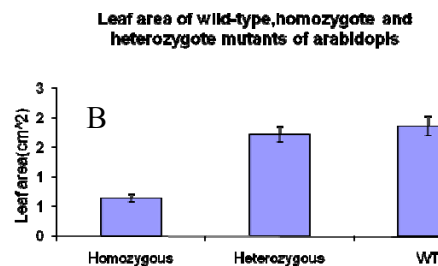
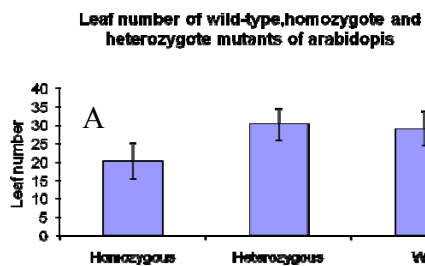
ארבידופסיס

פותחה שיטה פשוטה ויעילה לבחינת איכות האבקה בארבידופסיס. ובוצעה עבודה עם אוכלוסייה הומוזיגוטית למוטנט באנזים AGPase (*ADG1*), תת היחידה הקטנה (הקטליטית)). במצב הומוזיגוטי המוטנט *agp1* היה

פחות מפותח מזן הבר או במצבו ההטרוזיגוטי. אולם עיקר הבעיה היה בעקרותם של גרגרי האבקה שלו. מה שמנע המשך העבודה עם מוטנט זה.



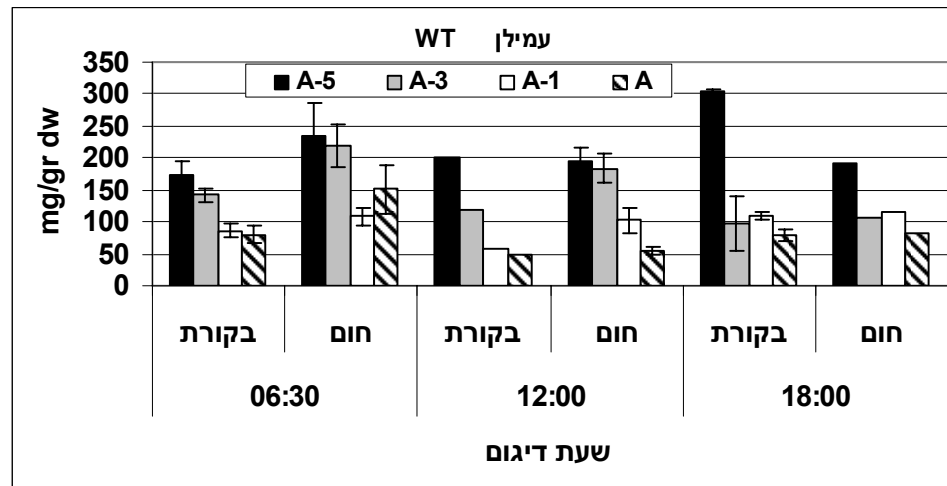
תמונה 1: המוטנט ההומיזיגוטי *agp1* (שמאל) וזן הבר (ימין) במצב פריחה. בוצעה אנליזה של מספר העלים (A) ושטחם (B).



ב. בחינת ההיפותזה שהשינויים/תנודות ברמות הסוכרים משפיעים במידה מכרעת על איכות האבקה.

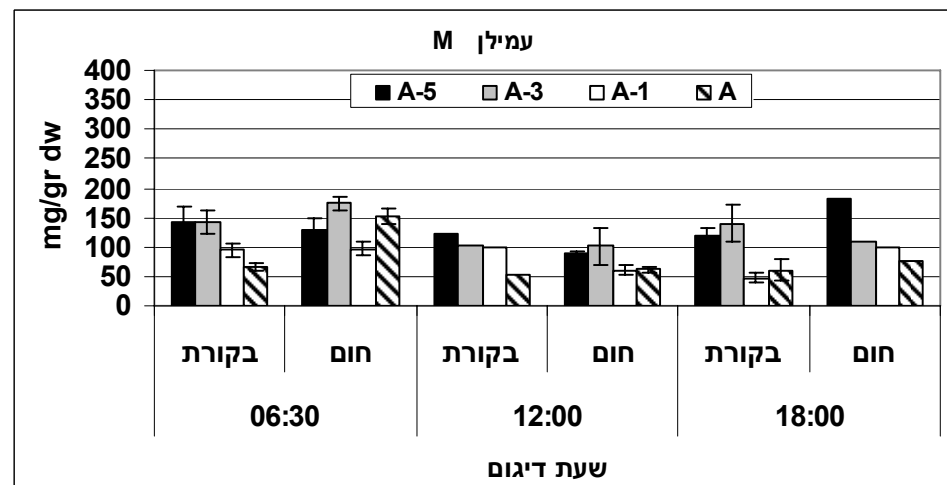
נבחנה ההנחה שהרמה הנמוכה של עמילן בגרגרי האבקה של המוטנט הפגום באנזים פוספוגלוקומוטאז עמילופלסטי גורמת למחסורים זמניים בסוכרים מסיסים במהלך הלילה. השערת העבודה הייתה שהדבר עלול לגרום לתנודות גדולות (משרעת) ברמת הסוכרים וכתוצאה מכך נפגעת איכות האבקה. בעוד שבזן הבר, ישנה הספקה רציפה של סוכרים, שמקורם מהעמילן, והם תומכים בפעילות המטבולית בלילה. לכן, נבדקו השינויים בריכוזי העמילן והסוכרוז במהלך היממה בשלבי הבשלה שונים של ניצני הפריחה בצמחי טיפוס הבר ובמוטנט של הניקוטיאנה. צמחי ניקוטיאנה (NS) מזן הבר ומוטנט עני בעמילן גדלו בחממת ביקורת, טמפרטורות $28/22^{\circ}\text{C}$ או בחממה מחוממת לטמפרטורה של $32/26^{\circ}\text{C}$ (תנאי חום). נצנים בגילאים A-5 (5 ימים לפני פתיחת הפרח) עד A (פתיחת הפרח) נדגמו 3 פעמים ביום: 06:30, 12:00 ו-18:00.

איור 12: רמת העמילן במהלך היממה בגרגרי אבקה מתפתחים של זן הבר של NS בתנאי חום וביקורת



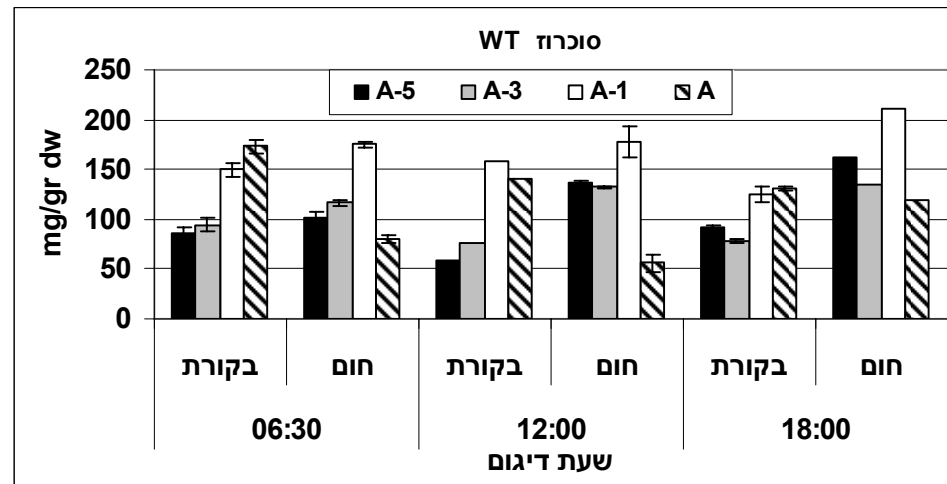
איור 12 מתאר את השינויים ברמת העמילן בגרגרי האבקה של זן הבר. בזן הבר, בכל מועדי הבדיקה, ובשני משטרי הטמפרטורה, רמת העמילן ירדה בהדרגה, עם הבשלת הפרח מדרגת התפתחות A-5 ועד ל-A. בדרגת התפתחות A-5 נצפה שרמת העמילן הייתה גבוהה פי 1.7 בשעה 6 בערב לעומת 6:30 בבוקר.

איור 13: רמת העמילן בשעות היום השונות בגרגרי אבקה מתפתחים של המוטנט של NS בתנאי חום וביקורת



באיור 13 רואים שרמת העמילן בגרגרי האבקה של המוטנט, בבדיקות שנערכו בשעות הצהריים או הערב, הייתה נמוכה מזו שבזן הבר, במיוחד בשלבי ההתפתחות הצעירים יותר, A-5 ו-A-3 (השלבים האוגרים עמילן). רמת העמילן בגרגרים המבשילים לא עלתה בשעות הערב.

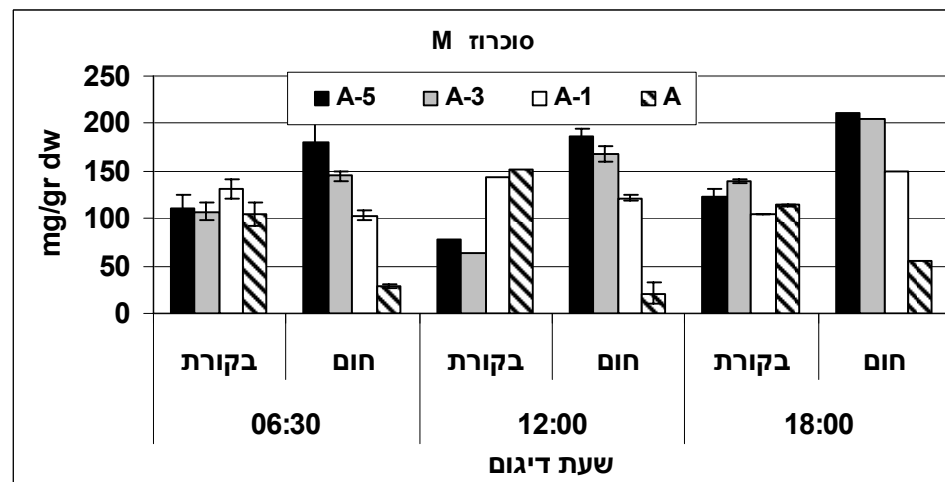
איור 14: רמת הסוכרוז בשעות היום השונות, בגרגרי אבקה מתפתחים של זן הבר של NS בתנאי חום וביקורת



באיור 14 ניתן לראות שבתנאי הביקורת רמת הסוכרוז בזן הבר עלתה בהדרגה עם הבשלת האבקה מ-100 ל-175 מג/גר חומר יבש. עליה זו הייתה דומה בשלש מועדי הדיגום. בתנאי חום נצפו רמות סוכרוז גבוהות יותר מאשר בביקורת, בדרגות ההתפתחות A-5 עד A-1. באופן מפתיע חלה ירידה חדה בריכוז הסוכרוז בגרגרים הבשלים.

במוטנט (איור 15) בשלבי ההתפתחות היותר צעירים של גרגרי האבקה (A-3, A-5) רמת הסוכרוז עולה בעקבות החשיפה לחום, בהשוואה לתנאי הביקורת. בתנאי חום, בשלושת מועדי הדיגום, חלה ירידה הדרגתית ברמת הסוכרוז לקראת ההבשלה, ובגרגרים הבשלים נמצאה רמה נמוכה פי 2 או יותר מאשר בתנאי הביקורת. רמות הסוכרוז באבקה הבשלה שנחשפה לתנאי חום מגיעות לרמות נמוכות פי 2 במוטנט בהשוואה לזן הבר.

איור 15: רמת הסוכרוז בשעות היום השונות בגרגרי אבקה מתפתחים של המוטנט (M) של NS בתנאי חום וביקורת

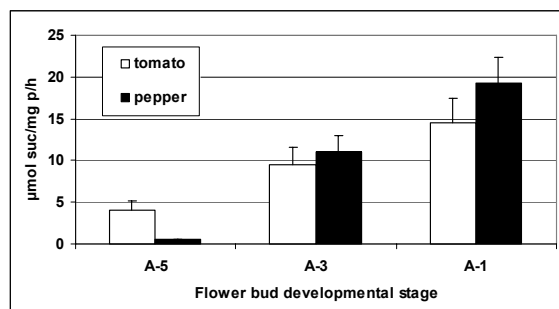


באופן כללי, נראה שאין שינויים ברמות הסוכרים בין היום ללילה בשלבי ההתפתחות השונים של גרגרי האבקה, הן בזן הבר והן במוטנט. תוצאות אלה מעמידות בספק את ההנחה שרגישות גרגרי האבקה של המוטנט לחום נובעת בשל תנודות ברמות הסוכרים.

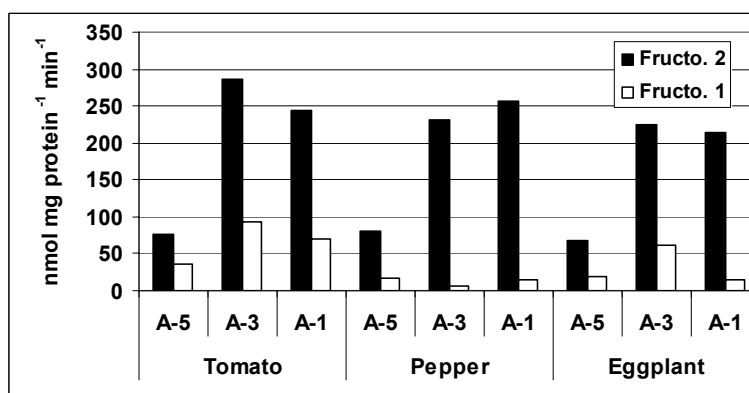
ג. זיהוי צמתי בקרה

בשנה הראשונה של תוכנית המחקר הראינו, בשלושה מינים ממשפחת הסולניים (עגבנייה, פלפל וחציל), שקיימת זיקה בין ריכוז העמילן בגרגרי האבקה בשלב 3 ימים לפני פתיחת הפרח לבין ריכוז הסוכרוז, שהוא הסוכר המסיס העיקרי בגרגרי האבקה הבשלים במשפחה זו. בגרגרי האבקה המתפתחים רואים פירוק של סוכרוז וסינתיזה מחדש, כשלאנזים סוכרוז פוספאט סינתאז (sucrose phosphate synthase; SPS) תפקיד מרכזי בסינתיזה והצטברות סוכרוז בגרגרים הבשלים (ראה איור 16). כלומר, המסקנה שלנו מהניסויים שנערכו בשנת המחקר הראשונה הייתה שהאנזים סוכרוז פוספאט סינתאז מהווה צומת בקרה. בשנת המחקר השנייה נבחנו אנזימים נוספים: פרוקטוקינאזות ואינברטאזות. התוצאות מוצגות באיורים 17-18. מתוך התוצאות ניתן לראות שהאנזים פרוקטוקינאז 2 הראה עלייה משמעותית (פי 4) בפעילות עם הבשלת גרגרי האבקה (איור 17), במקביל לעלייה בפעילות סוכרוז פוספאט סינתאז (איור X). תוצאה זו מרמזת על תפקיד אפשרי לפרוקטוקינאז באספקת סובסטרט לסינתיזה של סוכרוז. בנוסף, נראה מתוך התוצאות (איור 18) שלאינברטאז אפופלסטי (CWI-cell wall invertase) תפקיד בקרתי חשוב במהלך הבשלת גרגרי אבקה, ביצירת 'כוח מניע' לזרימה של סוכרים לגרגר המתפתח. פעילותו בגרגרים עולה עם ההבשלה, ונמצא שהיא גבוהה בהרבה מפעילות האינברטאזות האחרות.

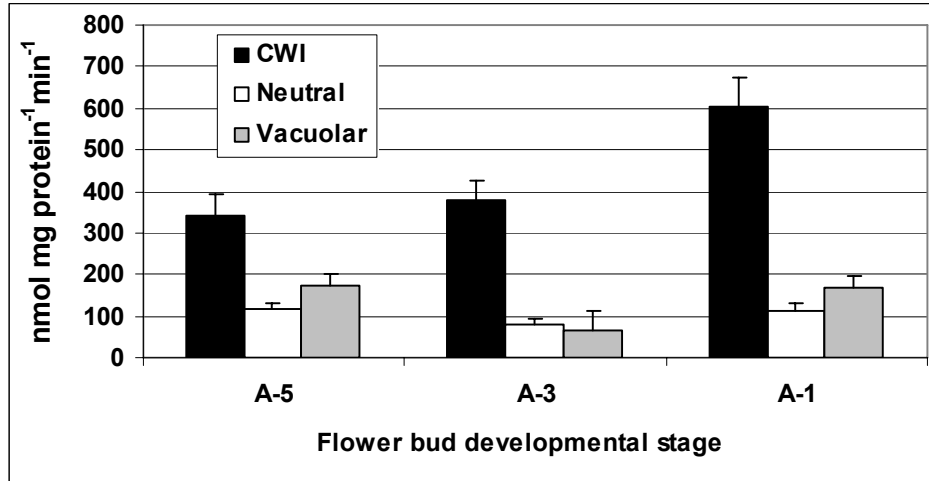
איור 16. שינויים בפעילות SPS במהלך ההבשלה של גרגרי אבקה של עגבנייה ופלפל



איור 17. שינויים בפעילות האנזימים פרוקטוקינאז 1 ופרוקטוקינאז 2 בגרגרי אבקה מתפתחים של שלושה מינים השייכים למשפחת הסולניים, עגבנייה, פלפל וחציל. הפעילות האנזימטית נבחנה באבקה בדרגות התפתחות של 1, 3, 5 ימים לפני פתיחת הפרח (A-1, A-3, A-5, בהתאמה). הנתונים מייצגים ממוצע של 3 חזרות ביוולגיות $\pm$ SE.



איור 18. שינויים בפעילות האנזימים אינברטאז אפופלאסטי (CWI), אינברטאז ניטראלי (Neutral), אינברטאז חומצי מסיס (Vacuolar) בגרגרי אבקה מתפתחים של שלושה מינים השייכים למשפחת הסולניים, עגבנייה, פלפל וחציל. הפעילות האנזימטית נבחנה באבקה בדרגות התפתחות של 1, 3, 5 ו-1 ימים לפני פתיחת הפרח (A-1, A-3, A-5, בהתאמה). הנתונים מייצגים ממוצע של 3 חזרות ביולוגיות $\pm$ SE.



דיון

במאבקים של פרחים של מספר מינים ממשפחת הסולניים ניתן לראות הצטברות ופירוק של עמילן בשתי רקמות: דפנות המאבק וגרגרי האבקה המתפתחים. ניתן לשער שבשני האתרים העמילן משמש הן כמאגר לסוכרים והן כווסת לשינויים קיצוניים בריכוז הסוכרים המסיסים. סוכרים אלה משמשים לפעילויות המטאבוליות של האבק, אבל בעיקר להזנת גרגרי האבקה המתפתחים. קיימת זיקה בין ריכוז העמילן בגרגרי האבקה בשלב 3 ימים לפני פתיחת הפרח לבין ריכוז הסוכרוז, שהוא הסוכר המסיס העיקרי בגרגרי האבקה הבשלים במשפחה זו. הסוכרוז המגיע לאבקן מתפרק באופן כמעט מיידי לגלוקוז ולפרוקטוז כבר בזיר. ניתן לראות שגרגרי האבקה של מיני משפחת הסולניים משמשים כמבלע וצוברים סוכרוז במהלך תהליך ההבשלה. כשמקור הסוכרוז הינו כנראה מפירוק העמילן שהצטבר בשלב מוקדם יותר (2-3 ימים לפני פתיחת הפרח). בגרגרי האבקה המתפתחים רואים פירוק של סוכרוז וסינתיזה מחדש, כשלאנזים סוכרוז פוספאט סינאז תפקיד מרכזי בסינתיזה ובהצטברות סוכרוז בגרגרים הבשלים. תוצאות השנה השנייה מצביעות על כך שהאנזים פרוקטוקינאז 2 (העשוי להיות ספק של מולקולות סובסטרט לסנתיזה של סוכרוז) והאנזים אינברטאז אפופלאסטי עשויים להיות צמתי בקרה נוספים.

ב- *N. sylvestris*, גרגרי האבקה המתפתחים של טיפוס הבר המצטיינים בנוכחות רמות גבוהות של עמילן גילו עמידות רבה יותר לעקת-חום (הן חשיפה קצרה לטמפרטורות גבוהות והן לחשיפה ממושכת לטמפרטורות גבוהות מתונות יחסית) בהשוואה למוטנט שאיננו צובר עמילן במהלך הבשלת האבקה בשל מוטציה באנזים phosphoglucosyltransferase. גרגרי האבקה של טיפוס הבר גם נבטו טוב יותר מגרגרי המוטנט בטמפרטורות גבוהות. שני ממצאים אלה מחזקים את ההנחה שנוכחות רמות גבוהות של עמילן בגרגרי האבקה המתפתחים, מקנות לגרגרים הבשלים את היכולת להתמודד עם תנאי עקת חום, הן במהלך התפתחותם והן בזמן הנביטה. על מנת לבחון את התפקיד האפשרי של מטבוליזם הסוכרים באבקה כספק של אוסמוליטים או osmoprotectants בוצעה אנליזה מטבולומית כמותית של מגוון מטבוליטים בגרגרי אבקה מבשילים (דרגת

התפתחות A-2 – דרגת ההתפתחות שהראתה רגישות גבוהה לעקת-חום קצרה) וגרגרים בשלים של צמחי זן בר ומוטנט הפגוע באנזים פוספוגלוקומוטאז עמילופלסטי (pgm). התוצאות שהתקבלו מראות שפגיעה באנזים העמילופלסטי pgm מביאה לעלייה ברמת הסוכרים המזורחנים ויש לה השפעה גם על מטבוליטים נוספים, כולל חומצות אמיניות הקשורות למטבוליזם אספרגין. חשיפת האבקה לתנאי עקת-חום קצרה (שעתיים ב-45°C) הביאה לצמצום ההבדל בין המוטנט לזן הבר מבחינת רמת המטבוליטים באבקה. לא נצפו הבדלים המסבירים את ההבדל ברגישות האבקה המבשילה של המוטנט לחום.

בחינת השינויים במהלך היום ברמת העמילן ורמת הסוכרים (במיוחד סוכרוז) העלתה שבמהלך היום קיימת הצטברות של עמילן בשלבי ההתפתחות הצעירים של זן הבר בתנאי ביקורת, ואילו במוטנט אין הצטברות כזו. אולם, בתנאי בקורת, בבוקר, רמת העמילן בזן הבר איננה גבוהה יותר מאשר במוטנט (איורים 12 ו-13). למרות זאת, בתנאים אלה רמת הסוכרוז בגרגרי האבקה הבשלים של זן הבר גבוהה מהרמה במוטנט (איורים 14 ו-15). חשיפה לתנאי חום מתמשך משפיעה באופן שונה בבוקר לעומת הערב. רק בשעות הערב רואים שתנאי חום גורמים לירידה משמעותית ברמות העמילן של גרגרי האבקה המתפתחים (A-5) של זן הבר בעוד שלא רואים השפעה על רמות העמילן במוטנט. נראה שקיימת רמת סף של עמילן (בסביבות 50 מ"ג/גרם חומר יבש) שנשמרת בגרגרי האבקה בכל התנאים ובשני הזנים. באופן כללי, נראה שאין במוטנט רמות עמילן נמוכות יותר בבוקר, הן בתנאי ביקורת והן בחום, כלומר לא רואים מחסור בעמילן בלילה. בנוסף, לא רואים שינויים ברמות הסוכרים המסיסים (סוכרוז הינו המרכיב הדומיננטי) בין שעות היממה (צהרים, ערב ושעות הבוקר המוקדמות). עובדות אלה מעמידות בספק את ההנחה שרגישות המוטנט לחום נובעת ממחסור בעמילן וכתוצאה מכך לתנודות גדולות ברמת הסוכרים. מעניין לציין שבמוטנט החום גורם לעליה ברמת הסוכרוז בגילאי האבקה הצעירים יותר ורק באבקה הבוגרת חלה ירידה חדה ברמת הסוכרוז בחום, בכל שעות היום (איור 15). ירידה זו יכולה להסביר את הירידה באיכות האבקה של המוטנט בחום. גם בזן הבר קיימת ירידה כזו אך בממדים קטנים יותר. למולקולות הסוכרוז עשוי להיות תפקיד חשוב בשמירה על איכות האבקה, הן בהגנה על חלבונים וממברנות מפני פגיעה בזמן החשיפה לעקה והן באספקת אנרגיה הדרושה לנביטה.

ביבליוגרפיה

1. Pressman E, Peet MM and DM Pharr, The effect of heat stress on tomato pollen characteristics is associated with changes in carbohydrate concentration in the developing anthers. *Ann Bot*, 2002. 90: 631-636.
2. Firon N, Shaked R, Peet MM, Pharr DM, Zamskic E, Rosenfeld K, Althan L and E Pressman, Pollen grains of heat tolerant tomato cultivars retain higher carbohydrate concentration under heat stress conditions. *Scient Hort*, 2006. 109: 212-217.
3. Clement C and N Audran, Anther wall layers control pollen sugar nutrition in *Lilum*. *Protoplasma*, 1995. 187: 172-181
4. Stone P, The effects of heat stress on cereal yield and quality. *Crop Responses and Adaptations to Temperature Stress*, AS Basra, editor. 2001, Binghampton, NY: Food Products Press. 243-291.
5. Schoper JB, Lambert RJ and BL Vasilas, Maize pollen viability and ear receptivity under water and high-temperature stress. *Crop Science*, 1986. 26: 1029-1033.
6. Sato S, Peet MM and JF Thomas, Determining critical pre- and post-anthesis periods and physiological processes in *Lycopersicon esculentum* Mill. exposed to moderately elevated temperatures. *J Exp Bot*, 2002. 53: 1187-95.

7. Aloni B, M Peet, M Pharr and L Karni, The effect of high temperature and high atmospheric CO₂ on carbohydrate changes in bell pepper (*Capsicum annuum*) pollen in relation to its germination. *Physiol Plant*, 2001. 112: 505-512.
8. Saini HS, Effects of water stress on male gametophyte development in plants. *Sex Plant Reprod*, 1997. 10: 67-73.
9. Dorion S, Lalonde S and HS Saini, Induction of male sterility in wheat by meiotic-stage water deficit is preceded by a decline in invertase activity and changes in carbohydrate metabolism in anthers. *Plant Physiol*, 1996. 111: 137-145.
10. Sheoran IS and HS Saini, Drought-induced male sterility in rice: changes in carbohydrate levels and enzyme activities associated with the inhibition of starch accumulation in pollen. *Sex Plant Reprod*, 1996. **9(3)**: 161-169.
11. Jain M, Prasad PV, Boote KJ, Hartwell AL Jr and PS Chourey , Effects of season-long high temperature growth conditions on sugar-to-starch metabolism in developing microspores of grain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *Planta*, 2007. Aug 7 [Epub ahead of print]
12. Hanson KR and NA McHale, A starch-less mutant of *Nicotiana sylvestris* containing a modified plastid phosphoglucomutase. *Plant Physiol*, 1988. 88: 838-844.
13. Kotak S, Larkindale J, Lee U, von Koskull-Döring P, Vierling E and KD Scharf (2007) Complexity of the heat stress response in plants. *Cur Op Pl Biol* 10: 310-316.

3. סיכום עם שאלות מנחות

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
בהתאם לתוכנית העבודה: 1. ביסוס הממצא שליכולת האגירה של עמילן ולמטבוליזם שלו חשיבות רבה בשמירת איכות האבקה בתנאי עקת-חום. 2. בחינת ההיפותזה שהשינויים/תנודות ברמות הסוכרים משפיעים במידה מכרעת על איכות האבקה. 3. זיהוי צמתי בקרה.
עיקרי הניסויים והתוצאות.
נלמד מטבוליזם הסוכרים ברקמות האבקן של 3 מינים ממשפחת הסולניים ונמצא שהאבקה המתפתחת מהווה מבלע. נמצא שחלה הצטברות רמות גבוהות של סוכרוז במהלך הבשלת גרגרי האבקה. נעשה שימוש במוטנטים חסרי-עמילן, על מנת לבחון קשר ישיר בין יכולת אגירת עמילן באבקה לבין שמירה על איכות האבקה בחום. זוהו ואופיינו מוטנט של <i>N. sylvestris</i> הפגום באנזים pgm. נמצא שהמוטציה גורמת להעלאת רגישות גרגרי האבקה לעקת-חום (הן חום קצר והן עקה מתמשכת). רמת הסוכרוז בגרגר הבשל מסתמנת כגורם העיקרי לרגישות האבקה של המוטנט בתנאי עקת-חום.
זוהו 3 צמתי בקרה: א. האנזים סוכרוז פוספאט סינתאז שהינו בעל תפקיד מרכזי בסינתיזה ובהצטברות סוכרוז בגרגרים הבשלים. 2. האנזים פרוקטוקינאז 2, העשוי להיות ספק של מולקולות סובסטרט לסינתיזה של סוכרוז והאנזים 3. אינברטאז אפופלסטי המשפיע על כושר המבלע של גרגרי האבקה.
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?
תהליך ייצור העמילן ופירוקו משפיע על משק הסוכרים בגרגרי האבקה.
גרגרי האבקה של מוטנט דל-עמילן של טבק נמצאו רגישים לחום (הן חום קצר-מועד והן עקת-חום מתמשכת) יותר מאלה של טיפוס הבר. למולקולות הסוכרוז עשוי להיות תפקיד חשוב בשמירה על איכות האבקה, הן בהגנה על חלבונים וממברנות מפני פגיעה בזמן החשיפה לעקה והן באספקת האנרגיה הדרושה לנביטה. 3 אנזימים סומנו כצומת המבקר את רמת הסוכרוז בגרגר. שמירה על פעילותם התקינה בתנאי סביבה משתנים עשויים להעלות את איכות האבקה ולהשפיע על היבול. מטרות המחקר לתקופת הדו"ח הושגו.
בעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתורה לביצוע תוכנית המחקר?
אפיון נוסף של צמתי הבקרה שזוהו, זאת ע"י יצירת צמחי עגבנייה טרנסגניים מתאימים ושימוש בפרומוטור ספציפי לאבקה או ע"י ריצוף האללים המתאימים במגוון גנוטיפים עמידים ורגישים לחום.
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - <u>ציטט</u> ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פטנטים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.
מאמר בכתובה
פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)
☐
☐ ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)
☐
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן* - לא -

*יש לענות על שאלה זו רק בדוח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדוח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש שנים

שיטות וחומרים

החומר הצמחי

צמחי עגבניה (זנים 3017 ו-3042, חברת הזרע ג'נטיקס), פלפל (זנים סליקה, פייסטה ודינמו) וחציל (זנים קלסיק ו-1726). צמחי מוטנט של *Nicotiana glauca* עם רמות עמילן נמוכות בעלים ובגרמי האבקה (ראה דו"ח שנה ראשונה) בגלל פגיעה באנזים פוספוגלוקומוטאז (pgm) וטיפול הבר שלו. צמחי עגבניות שבורר מאוכלוסייה בעקבות מוטגנזה בזן M 82 (ע"י פרופ' דגי זמיר מהפקולטה לחקלאות) והראו רמות נמוכות של עמילן בעלים. הצמחים גודלו בחממות מבוקרות אקלים בבית דגן בטמפרטורות לילה/יום של $28/22 \pm 2^0$ ונחשפו לתנאי עקת-חום כמפורט בהמשך.

אנליזה של סוכרים ועמילן בחלקי האבקון השונים

אבקנים של עגבניות (3017, 3042 ו-3018), פלפל (זנים סליקה, פייסטה ודינמו) וחציל (זנים קלסיק ו-1726) בגילאים שונים: 3, 5 ו-1 ימים לפני פתיחת הפרח (A-5, A-3 ו-A-1 בהתאמה) נדגמו מצמחים שגודלו בחממה מבוקרת-אקלים בטמפרטורה של $28/22 \pm 2^0$ C. הזירים הופרדו מהמאבקים והמאבקים נחתכו טולטלו ב-vortex והדפנות הופרדו בעזרת פד גזה. לאחר סירכוז, הופרד הנוזל הלוקולרי מגרגרי האבקה. פרוט של השיטה ניתן למצוא ב-[1, 2]. ריכוז עמילן וריכוז סוכרים מסיסים נקבע כמפורט ב-[1-2]. נוכחות עמילן נבדקה גם על ידי צביעה בIOD (I₂+KI). כשר נביטת גרגרי האבקה נבדק בתמיסת הנבטה [ראה 1, 2].

טיפול חום

א. חום מתמשך: טמפרטורות $32/26 \pm 2$ מ"צ לילה/יום. ב. טיפול חום קצר: חשיפת הצמח למשך שעותיים, בשלבי התפתחות שונים של האבקה לטמפרטורה של 45 ± 2^0 C.

טבלה 1. אנליזה כמותית של מטבוליטים באבקה מתפתחת (דרגת התפתחות יומיים לפני פתיחת הפרח - A-2) ואבקה בשלה של צמחי *Nicotiana sylvestris*, זן בר (WT) ומוטנט הפגוע באזנים פוספוגלוקומוטאז, שגדלו בתנאים אופטימליים. האנליזה בוצעה בעזרת GC-MS. הדגשה בצבע ורוד מסמנת אותם מטבוליטים שרמתם גבוהה יותר באבקה של המוטנט יחסית לזן הבר והדגשה בצבע תכול מסמנת מטבוליטים שרמתם נמוכה במוטנט.

Group	Compound	WT		Mutant	
		A	A-2	A	A-2
amino acid	alanine	1,158.47	775.61	1,393.72	966.65
amino acid	arginine	463.31	540.12	1,100.25	1,594.01
amino acid	asparagine	481.01	154.88	1,689.51	162.91
amino acid	beta-alanine	31.72	12.13	73.88	57.22
amino acid	glutamine	59.01	95.01	84.53	63.94
amino acid	glycine	102.81	.	164.44	7.83
amino acid	histidine	137.93	96.73	151.29	100.01
amino acid	homoserine	26.83	25.74	33.28	27.69
amino acid	isoleucine	146.07	112.98	193.39	165.71
amino acid	leucine	78.93	26.42	92.12	32.03
amino acid	lysine	65.72	31.08	134.63	43.98
amino acid	methionine	53.50	38.96	79.80	59.47
amino acid	ornithine	1.41	3.25	3.81	3.83
amino acid	phenylalanine	75.66	50.59	149.51	85.42
amino acid	proline	6,070.00	6,698.12	6,687.66	8,780.30
amino acid	serine	158.79	98.84	223.18	152.98
amino acid	threonine	59.30	46.39	124.42	82.11
amino acid	tryptophan	48.21	46.66	87.98	48.72
amino acid	tyrosine	64.12	43.13	160.87	75.06
amino acid	valine	123.47	41.67	156.77	75.15
organic acid	alpha-aminobutyric acid	2.46	0.78	1.99	2.66
organic acid	alpha-ketoglutaric acid	33.23	.	.	34.62
organic acid	aspartic acid	40.25	27.71	79.79	44.63
organic acid	citric acid	150.01	19.50	489.99	62.36
organic acid	isocitric acid	6.98	.	23.86	.
organic acid	fumaric acid	31.17	7.90	42.16	24.75
organic acid	gamma-aminobutyric acid	48.57	18.10	91.50	119.19
organic acid	gluconic acid	36.65	18.95	65.53	27.10
organic acid	glutamic acid	365.78	479.75	631.57	1,059.10
organic acid	glyceric acid	23.98	11.77	43.57	23.96
organic acid	lactic acid	7.28	4.27	12.20	7.21
organic acid	malic acid	234.34	112.40	351.27	207.44
organic acid	pyruvic acid	45.14	21.88	31.70	51.92
organic acid	salicylic acid	0.94	0.40	1.55	0.88
organic acid	shikimic acid	0.65	.	1.49	0.80
organic acid	succinic acid	110.44	84.51	84.34	180.63
sugar	fructose	52.97	19.13	48.91	27.55
sugar	galactose	697.20	356.80	938.18	599.50
sugar	glucose	523.78	266.33	706.05	449.89
sugar	maltose	.	37.15	.	20.84
sugar	mannose	482.72	254.63	800.56	511.28
sugar	psicose	60.79	9.33	.	.
sugar	raffinose	.	.	.	.
sugar	ribose	14.76	13.67	15.59	14.88
sugar	sedoheptulose	31.82	14.27	27.00	15.38
sugar	sucrose	44,100.16	25,591.50	37,797.53	36,808.49
sugar	trehalose	.	11.41	.	10.32
sugar	xylose	4.99	4.20	9.81	.
sugar alcohol	arabinose	8.20	5.14	9.94	6.29
sugar alcohol	arabitol	11.34	10.38	39.85	5.57
sugar alcohol	galactitol	45.59	33.88	54.63	39.63
sugar alcohol	inositol	59.32	51.87	107.97	77.59
sugar alcohol	mannitol	2.43	5.52	2.29	5.75
sugar alcohol	sorbitol	1.90	2.71	3.34	2.45
sugar phosphate	fructose 6-phosphate	9.24	3.97	24.16	14.61
sugar phosphate	glucose 6-phosphate	12.97	2.87	47.34	25.79
sugar phosphate	mannose 6-phosphate	16.33	5.47	81.07	49.35
sugar phosphate	sucrose 6-phosphate	.	.	15.76	11.61

טבלה מס. 2. אנליזה כמותית של מטבוליטים באבקה מתפתחת (דרגת התפתחות A-2) ואבקה בשלה של צמחי *Nicotiana glauca* (WT) ומוטנט הפגוע באנזים פוספוגלוקומוטאז שנחשפו לעקת-חום (שעתיים ב-45°C). האנליזה בוצעה בעזרת GC-MS. הדגשה בצבע ורוד מסמנת אותם מטבוליטים שרמתם גבוהה יותר באבקה של המוטנט יחסית לזן הבר.

Group	Compound	WT		Mutant	
		A	A-2	A	A-2
amino acid	alanine	1,086.57	346.08	799.89	563.62
amino acid	arginine	513.10	669.74	500.25	1,419.58
amino acid	asparagine	545.30	236.05	739.44	227.44
amino acid	beta-alanine	40.07	4.80	41.75	22.23
amino acid	glutamine	61.02	64.05	56.34	60.55
amino acid	glycine	70.04		83.73	6.87
amino acid	histidine	123.73	90.95	154.31	94.93
amino acid	homoserine	27.58	24.80	28.57	26.63
amino acid	isoleucine	123.41	65.41	125.19	159.55
amino acid	leucine	81.49	23.96	95.17	32.66
amino acid	lysine	89.34	45.50	140.67	52.30
amino acid	methionine	56.19	47.31	68.77	45.58
amino acid	ornithine	1.37	3.49	3.92	
amino acid	phenylalanine	94.31	45.06	120.69	74.34
amino acid	proline	4,217.45	4,181.45	3,791.20	7,898.14
amino acid	serine	177.37	64.68	149.11	118.58
amino acid	threonine	62.24	43.72	81.15	111.94
amino acid	tryptophan	58.77	59.75	69.44	56.58
amino acid	tyrosine	103.32	81.08	140.22	140.25
amino acid	valine	91.59	34.17	150.35	79.04
organic acid	alpha-aminobutyric acid	1.17	0.30	2.51	1.69
organic acid	alpha-ketoglutaric acid	37.88	27.79	32.55	42.26
organic acid	aspartic acid	56.32	31.45	59.59	50.64
organic acid	citric acid	305.12	37.75	361.13	107.28
organic acid	isocitric acid	21.20	1.17	24.40	3.54
organic acid	fumaric acid	35.82	7.48	28.74	21.92
organic acid	gamma-aminobutyric acid	72.32	47.00	70.13	135.65
organic acid	gluconic acid	44.64	17.60	61.11	20.40
organic acid	glutamic acid	445.09	444.30	316.12	777.36
organic acid	glyceric acid	37.57	9.52	62.60	27.57
organic acid	lactic acid	7.01	14.33	5.06	37.23
organic acid	malic acid	301.74	128.22	246.81	352.35
organic acid	pyruvic acid	37.66	14.71	21.45	31.64
organic acid	salicylic acid	1.20	0.49		1.59
organic acid	shikimic acid	0.83		1.44	0.72
organic acid	succinic acid	97.71	32.00	55.88	117.11
sugar	fructose	51.60	5.66	59.91	14.15
sugar	galactose	782.36	191.13	1,044.77	299.20
sugar	glucose	588.20	141.02	786.66	222.76
sugar	maltose		17.61		9.84
sugar	mannose	618.45	142.03	913.10	255.35
sugar	psicose				38.55
sugar	raffinose	6.99		37.07	
sugar	ribose	15.92	13.98	15.51	15.20
sugar	sedoheptulose	23.64	6.79	24.93	8.86
sugar	sucrose	38,243.83	29,213.80	29,776.17	39,609.81
sugar	trehalose		5.98		5.62
sugar	xylose	8.91	1.56	4.16	5.76
sugar alcohol	arabinose	8.75	1.86	11.20	3.33
sugar alcohol	arabitol	23.64	42.36	43.85	26.04
sugar alcohol	galactitol	59.84	29.10	78.63	41.44
sugar alcohol	inositol	87.05	94.87	130.65	118.13
sugar alcohol	mannitol	2.23	4.81	2.94	1.38
sugar alcohol	sorbitol	4.82	1.93	6.29	3.27
sugar phosphate	fructose 6-phosphate	20.24		25.46	15.58
sugar phosphate	glucose 6-phosphate	33.06	0.41	28.49	22.69
sugar phosphate	mannose 6-phosphate	38.64		40.10	
sugar phosphate	sucrose 6-phosphate			17.79	

טבלה מס. 3. השפעת עקת-חום (שעתיים ב-45°C) על מטבוליטים באבקה מתפתחת (דרגת התפתחות A-2) ואבקה בשלה (A) של צמחי *Nicotiana sylvestris*, זן בר (WT) ומוטנט הפגוע באנזים פוספוגלוקומוטאז. האנליזה בוצעה בעזרת GC-MS. לגבי כל גנוטיפ, הדגשה בצבע ורוד מסמנת אותם מטבוליטים שרמתם עלתה בעקבות העקה והדגשה בצבע תכול מסמנת מטבוליטים שרמתם ירדה.

Group	Compound	WT				Mutant			
		Control		Heat stress		Control		Heat stress	
		A	A-2	A	A-2	A	A-2	A	A-2
amino acid	alanine	1,158.47	775.61	1,086.57	346.08	1,393.72	966.65	799.89	563.62
amino acid	arginine	463.31	540.12	513.10	669.74	1,100.25	1,594.01	500.25	1,419.58
amino acid	asparagine	481.01	154.88	545.30	236.05	1,689.51	162.91	739.44	227.44
amino acid	beta-alanine	31.72	12.13	40.07	4.80	73.88	57.22	41.75	22.23
amino acid	glutamine	59.01	95.01	61.02	64.05	84.53	63.94	56.34	60.55
amino acid	glycine	102.81		70.04		164.44	7.83	83.73	6.87
amino acid	histidine	137.93	96.73	123.73	90.95	151.29	100.01	154.31	94.93
amino acid	homoserine	26.83	25.74	27.58	24.80	33.28	27.69	28.57	26.63
amino acid	isoleucine	146.07	112.98	123.41	65.41	193.39	165.71	125.19	159.55
amino acid	leucine	78.93	26.42	81.49	23.96	92.12	32.03	95.17	32.66
amino acid	lysine	65.72	31.08	89.34	45.50	134.63	43.98	140.67	52.30
amino acid	methionine	53.50	38.96	56.19	47.31	79.80	59.47	68.77	45.58
amino acid	ornithine	1.41	3.25	1.37	3.49	3.81	3.83	3.92	
amino acid	phenylalanine	75.66	50.59	94.31	45.06	149.51	85.42	120.69	74.34
amino acid	proline	6,070.00	6,698.12	4,217.45	4,181.45	6,687.66	8,780.30	3,791.20	7,898.14
amino acid	serine	158.79	98.84	177.37	64.68	223.18	152.98	149.11	118.58
amino acid	threonine	59.30	46.39	62.24	43.72	124.42	82.11	81.15	111.94
amino acid	tryptophan	48.21	46.66	58.77	59.75	87.98	48.72	69.44	56.58
amino acid	tyrosine	64.12	43.13	103.32	81.08	160.87	75.06	140.22	140.25
amino acid	valine	123.47	41.67	91.59	34.17	156.77	75.15	150.35	79.04
organic acid	alpha-aminobutyric acid	2.46	0.78	1.17	0.30	1.99	2.66	2.51	1.69
organic acid	alpha-ketoglutaric acid	33.23		37.88	27.79		34.62	32.55	42.26
organic acid	aspartic acid	40.25	27.71	56.32	31.45	79.79	44.63	59.59	50.64
organic acid	citric acid	150.01	19.50	305.12	37.75	489.99	62.36	361.13	107.28
organic acid	isocitric acid	6.98		21.20	1.17	23.86		24.40	3.54
organic acid	fumaric acid	31.17	7.90	35.82	7.48	42.16	24.75	28.74	21.92
organic acid	gamma-aminobutyric acid	48.57	18.10	72.32	47.00	91.50	119.19	70.13	135.65
organic acid	gluconic acid	36.65	18.95	44.64	17.60	65.53	27.10	61.11	20.40
organic acid	glutamic acid	365.78	479.75	445.09	444.30	631.57	1,059.10	316.12	777.36
organic acid	glyceric acid	23.98	11.77	37.57	9.52	43.57	23.96	62.60	27.57
organic acid	lactic acid	7.28	4.27	7.01	14.33	12.20	7.21	5.06	37.23
organic acid	malic acid	234.34	112.40	301.74	128.22	351.27	207.44	246.81	352.35
organic acid	pyruvic acid	45.14	21.88	37.66	14.71	31.70	51.92	21.45	31.64
organic acid	salicylic acid	0.94	0.40	1.20	0.49	1.55	0.88		1.59
organic acid	shikimic acid	0.65		0.83		1.49	0.80	1.44	0.72
organic acid	succinic acid	110.44	84.51	97.71	32.00	84.34	180.63	55.88	117.11
sugar	fructose	52.97	19.13	51.60	5.66	48.91	27.55	59.91	14.15
sugar	galactose	697.20	356.80	782.36	191.13	938.18	599.50	1,044.77	299.20
sugar	glucose	523.78	266.33	588.20	141.02	706.05	449.89	786.66	222.76
sugar	maltose		37.15		17.61		20.84		9.84
sugar	mannose	482.72	254.63	618.45	142.03	800.56	511.28	913.10	255.35
sugar	psicose	60.79	9.33						38.55
sugar	raffinose			6.99				37.07	
sugar	ribose	14.76	13.67	15.92	13.98	15.59	14.88	15.51	15.20
sugar	sedoheptulose	31.82	14.27	23.64	6.79	27.00	15.38	24.93	8.86
sugar	sucrose	44,100.16	25,591.50	38,243.83	29,213.80	37,797.53	36,808.49	29,776.17	39,609.81
sugar	trehalose		11.41		5.98		10.32		5.62
sugar	xylose	4.99	4.20	8.91	1.56	9.81		4.16	5.76
sugar alcohol	arabinose	8.20	5.14	8.75	1.86	9.94	6.29	11.20	3.33
sugar alcohol	arabitol	11.34	10.38	23.64	42.36	39.85	5.57	43.85	26.04
sugar alcohol	galactitol	45.59	33.88	59.84	29.10	54.63	39.63	78.63	41.44
sugar alcohol	inositol	59.32	51.87	87.05	94.87	107.97	77.59	130.65	118.13
sugar alcohol	mannitol	2.43	5.52	2.23	4.81	2.29	5.75	2.94	1.38
sugar alcohol	sorbitol	1.90	2.71	4.82	1.93	3.34	2.45	6.29	3.27
sugar phosphate	fructose 6-phosphate	9.24	3.97	20.24		24.16	14.61	25.46	15.58
sugar phosphate	glucose 6-phosphate	12.97	2.87	33.06	0.41	47.34	25.79	28.49	22.69
sugar phosphate	mannose 6-phosphate	16.33	5.47	38.64		81.07	49.35	40.10	
sugar phosphate	sucrose 6-phosphate					15.76	11.61	17.79	