

אפיון מעורבות גנים בלתי ידועים, ייחודיים לאבקה, בהתמודדות גרגרי האבקה עם עקת-חום

Characterize the involvement of novel and pollen-specific genes in coping with heat-stress condition

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

צוות הגוי : מחקרי היתכנות (02-6382)

ע"י:

חקר ירקות, מדעי הצמח, מינהל המחקר החקלאי

נורית פירון

חקר ירקות, מדעי הצמח, מינהל המחקר החקלאי

אלטחן לביאה

Nurit Firon, Plant Sciences, ARO, POB 6, Bet Dagan, 50250. E-mail: vcfiron@volcani.agri.gov.il

Levia Althan, Plant Sciences, ARO, P.O.B. 6, Bet Dagan, 50250.

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא



חתימת החוקר

רשימת פרסומים

תוכן עניינים

3	תקציר
4	מבוא
5	מטרות המחקר
5	פירוט עיקרי הניסויים
13	דיון
15	שאלון

הצגת הבעיה: טמפרטורות גבוהות פוגעות ביבול של גידולים רבים כמו עגבנייה, פלפל, ומלונים. מחקרים רבים, ביניהם שלנו, מראים שהפגיעה בחנטה והיבול בעגבניות נובעת בעיקר בשל פגיעה באבקה; הראנו מתאם בין עמידות-לחום של מגוון זנים, מבחינת החנטה והיבול, לבין הכמות ואיכות האבקה שלהם. אולם, חסר מידע על מנגנוני עמידות לחום באבקה. על מנת לזהות מנגנונים כאלה בגרגרי אבקה מתפתחים של עגבנייה, השתמשנו ב-2 שיטות טרנסקריפטומיות ובחנו אילו גנים מופעלים מייד עם החשיפה לעקת-חום. התוצאות, המסוכמות במאמר שפרסמנו (Frank et al. 2009), הצביעו על מספר גנים, בעלי הומולוגיה לרצפי גנים של ארבידובסיס, שדווח לגביהם על ביטוי ייחודי באבקה. גנים אלה היוו קנדידאטים חדשים, ייחודיים לאבקה, למעורבות בתגובה והתמודדות גרגרי אבקה עם תנאי עקת-חום. המטרה העיקרית של תוכנית היתכנות זו הייתה קבלת מידע ראשוני על מעורבות מספר גנים חדשים שתפקידם/מעורבותם בהתמודדות גרגרי אבקה עם עקת-חום איננו ידוע. שיטות ותוצאות עיקריות: בשנת המחקר הראשונה בחנו באם הביטוי של גנים אלה הינו ייחודי לגרגרי אבקה של עגבנייה. התוצאות שהתקבלו הראו שגנים אלה מתבטאים ברמה גבוהה יחסית באברים שונים של צמח העגבנייה ואינם ייחודיים לאבקה. לפיכך, היה קיים צורך להרחיב את מאגר הגנים הייחודיים לאבקה תוך שימוש בשיטות מתקדמות שלא היו בשימוש נרחב כשבצענו את העבודה המוקדמת ובזמן הגשת תוכנית המחקר. לשם כך, ביצענו ריצוף בנפח גבוה ברמת ה-cDNA תוך שימוש בשיטת ILLUMINA וייצרנו מאגר מידע רחב של גנים המתבטאים באופן ייחודי באבקה של עגבנייה בתנאים שונים (תנאי-גידול אופטימאליים ותנאי חום). מסקנות: המאגר שהתקבל כולל אחוז גבוה (מעל 50%) של גנים שאינם מאופיינים כשחלקם מראה שינוי משמעותי ברמת הביטוי בתנאים המשרים עמידות נרכשת לחום (acquired thermotolerance) ומהווים לכך קנדידאטים מעניינים לשמש במגוון-י עמידות גרגרי אבקה לחום. בנוסף, מצביעות התוצאות על גנים המעורבים בבקרת הומיאוסטאזיס של חלבונים, הומיאוסטאזיס של יונים ותנועת שלפוחיות כגנים העשויים לתרום לעמידות גרגרי האבקה לחום. אנו מתכננים להגיש תוכנית המשך כדי לאפיין השתתפות גנים אלה בעמידות גרגרי אבקה של עגבנייה לחום.

מבוא

הטמפרטורות הגבוהות 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 כמו 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 באבקה. 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]. אולם חסר מידע על מנגנוני עמידות לחום באבקה [3].

התפתחות גרגרי אבקה. גרגרי האבקה הינם מערכת ביולוגית ייחודית המראה רגישות לטמפרטורות גבוהות בשלבי ההתפתחות השונים ובמהלך הנביטה. גרגרי האבקה מתפתחים בתוך המאבק מתאי-אם האבקה, שעוברים תהליך מיוזה ויוצרים טראדות העטופות בשכבת קאלוז. בעקבות פירוק שכבת הקאלוז משתחררות המיקרוספורות מהטראדות. שלב זה של התפתחות המיקרוספורות מכונה מיקרוספורוגנזה. שלב ההתפתחות הבא – ממיקרוספורות לגרגרי אבקה בשלים – מכונה מיקרוגמטוגנזה. במהלך המיקרוגמטוגנזה יחול תהליך מיטוזה (אחד או שניים תלוי במין), ביוגנזה של הוקואולה, שינויים מטבוליים הכוללים ביוסינתיזה והצטברות זמנית של עמילן, ותהליך התייבשות (דהידרציה) הגרגר [4]. גרגרי האבקה רגישים לעקת-חום הן במהלך המיקרוספורוגנזה והן במהלך המיקרוגמטוגנזה, כמו גם בשלב הנביטה [3]. אולם, המידע הקיים על מערכות ההגנה העשויות להקנות לגרגרי האבקה הגנה מעקות בכלל, ומנזקי עקת-חום בפרט, הינו מוגבל ביותר [3]. למיטב ידיעתנו, אחד המנגנונים היחידים הידועים באבקה הינו הצטברות סוכרים, ובעיקר סוכרוז, המשמשים בהגנה על החלבונים וממברנות הגרגר במהלך הרגיל של ההתפתחות כולל במהלך תהליך ההבשלה וההתייבשות של גרגרי האבקה [3, 5]. ואכן, מצאנו לאחרונה מתאם בין עמידות לחום של גרגרי אבקה מתפתחים של עגבנייה, לבין יכולתם לשמור על רמת-סף של סוכרוז במהלך תהליך הבשלתם כמו גם בגרגרי האבקה הבשלים [2]. רמות הסוכרוז נמצאו בהתאמה עם הצטברות שיא של עמילן בגרגרי האבקה בשלב התפתחות של 3 ימים לפני פתיחת הפרח.

מנגנוני עמידות לעקת-חום-ברמה הוגטטיבית. בצמחים, ברמה הוגטטיבית, קיים מידע על מגוון מנגנוני התמודדות עם עקת-חום המאפשרים להם למזער את הנזק. מנגנוני התמודדות אלה מופעלים עם החשיפה לעקה. אחד המנגנונים השמורים במהלך האבולוציה להגנה על חלבוני התא מפני שינויים הרסניים במבנה המרחבי שלהם ובתפקודם (כולל הגנה על תפקוד אנזימים בתא), הוא עלייה בהצטברות של חלבוני עקת חום (חע"ח). העלייה ברמת הביטוי של חע"ח בעקבות החשיפה לעקת-חום מבוקרת ע"י פקטורי השעותוק Heat stress factors (Hsfs) [6]. לאחרונה דווח על מנגנונים וגנים נוספים שעשויים להגן על הצמח מפני עקת-חום, הכוללים, לדוגמא, יכולת התמודדות עם עקה חמצונית הנלווית לעקת-החום, ומעורבות הורמונים [6]. נמצא שמנגנוני התמודדות אלה מופעלים עם החשיפה לעקה. אולם, מערכות ההגנה מפני עקות מופעלות במקרים רבים מאוחר מדי או בעוצמה שאיננה מספקת, ולכן תהיה העמידות לחום מותנית ביכולת להפעיל את מנגנוני ההגנה עוד לפני החשיפה של התאים/הצמחים לטמפרטורות הגבוהות. למשל, ע"י ביטוי-יתר של גורם בקרה המפעיל גן-ים התורמים לעמידות, כפי שדווח במספר מערכות צמחיות [6]. הדבר חשוב במיוחד במערכות המראות רגישות מיוחדת, כמו במקרה של גרגרי אבקה מתפתחים.

מנגנוני עמידות לעקת-חום-בגררי האבקה. כאמור, כל הנתונים על מערכות ההגנה בעבודות המפורטות למעלה מתייחסים לחלקים וגטטיביים של הצמח. ככלל, לגבי גרגרי אבקה, המידע הקיים על מערכות ההגנה העשויות להקנות הגנה מנזקי עקת-חום הינו מוגבל ביותר [3]. זיהוי ואפיון מנגנונים כאלה יאפשר שיפור איכות האבקה בתנאי עקת-חום והעלאת היבול. זאת ע"י שימוש באמצעים טרנסגניים או שימוש במידע לסריקה של חומר גנטי לעמידות לחום. על מנת לזהות מנגנונים להתמודדות עם עקת-חום בגרגרי אבקה מתפתחים של עגבנייה, השתמשנו ב-2 שיטות טרנסקריפטומיות: cDNA-AFLP, ו- Tomato Genome Affymetrix GeneChip® Array, ובחנו אילו גנים מופעלים מייד עם החשיפה לעקת-חום ומגיבים בשינוי ברמת הביטוי [7]. לצורך עבודות אלה כייילנו את תנאי עקת-החום כך שתהווה עקת-סף והתמקדנו במספר דרגות התפתחות במהלך המיקרוגמטוגנזה של גרגרי האבקה. השימוש בשיטת cDNA-AFLP אפשר לזהות ולבודד גנים ייחודיים לאבקה שאינם מופיעים על גבי ה-Tomato Genome Array [7]. מתוך התוצאות שהתקבלו תוך שימוש בשתי השיטות ניתן לראות הפעלה, בעקבות חשיפה לחום, של מספר גנים בלתי ידועים ובלתי מאופיינים המראים הומולוגיה לרצפי גנים של ארבידובסיס המתבטאים ברמה גבוהה יחסית או באופן ייחודי באבקה (7) (וטבלה 1). בתוכנית המחקר המוצעת שמשו גנים אלה כקנדידאטים לגנים המתבטאים באופן ייחודי בגרגרי אבקה של עגבנייה וקשורים בתגובה והתמודדות גרגרי האבקה עם תנאי עקת-חום.

מטרות המחקר

המטרה העיקרית של תוכנית היתכנות זו היא קבלת מידע ראשוני על מעורבות מספר גנים חדשים שתפקידם/מעורבותם בהתמודדות גרגרי אבקה עם עקת-חום איננו ידוע, כשהמטרה ארוכת-הטווח היא לזהות ולאפיין גן-ים שיאפשרו שיפור איכות האבקה בחום. המטרות הספציפיות:

1. אפיון מעורבות/תפקיד הגנים הקנדידאטים, הייחודיים לאבקה, במהלך הרגיל של התפתחות האבקה בארבידובסיס, ובשמירה על איכות האבקה בתנאי עקת-חום.
2. אפיון ביטוי הגנים הקנדידאטים, הייחודיים לאבקה, בגרגרי אבקה של קווי/זני עגבנייה עמידים לחום בהשוואה לקוויים/זנים רגישים.

פירוט עיקרי הניסויים

בחינת ביטוי ייחודי באבקה של עגבנייה של גנים בלתי ידועים - קנדידאטים למעורבות בתגובה והתמודדות עם עקת-חום

תוכנית המחקר התבססה על זיהוי של מספר גנים בלתי ידועים ובלתי מאופיינים שהראו הומולוגיה לרצפי גנים של ארבידובסיס המתבטאים ברמה גבוהה יחסית או באופן ייחודי באבקה (טבלה 1). בשלב ראשון, היה צורך לבחון באם הביטוי של גנים אלה הינו ייחודי לגרגרי אבקה, מתפתחים ובשלים, של עגבנייה.

בידוד גרגרי אבקה מתפתחים ובשלים, מיצוי RNA וסינתזה של cDNA

אבקנים של עגבניות (מהזן cv. 3017), מפקעי פריחה בדרגות התפתחות שונות: 3 ו-1 ימים לפני פתיחת הפרח, ופרח פתוח (A-1, A-3, ו-A) בהתאמה) נדגמו מצמחים שגודלו בחממה מבוקרת-אקלים בטמפרטורה של 28/22 °C ±. הזירים הופרדו מהמאבקים, והמאבקים נחתכו טולטלו בתמיסת הנבטה ללא תוספת סוכרוז תוך שימוש

ב- vortex, ודפנות המאבקים הופרדו מגרגרי האבקה בעזרת פד גזה. לאחר סרכוז, רוכזו והופרדו גרגרי האבקה. פרוט של השיטה ניתן למצוא ב- [2, 7]. בוצע מיצוי של RNA תוך שימוש ב- Tri-reagent כמפורט ב- [7]. עיכול שאריות DNA בעזרת טיפול ב- DNase וסינתזת cDNA בוצעו כמפורט ב- [7]. במקביל, בודדו גרגרי אבקה מפקעי פריחה מנותקים, בדרגות התפתחות שונות (A-1, A-3 ו-A), שנחשפו במשך שעותיים לתנאי ביקורת (C ; 25°C) או לתנאי עקת-חום (HS ; 45°C). דוגמאות האבקה חולקו ל: (1) "אבקה בשלה" (Anthesis-A) – שהופקה מכ-30-50 פרחים (2) ולמאגר (POOL) של גרגרי אבקה מתפתחים (צירוף מיקרוספורות/גרגרים משלבים A-1 ו-A-3) – שהופקו מסה"כ כ-60-90 פרחים.

טבלה 1. רשימת רצפי עגבנייה והאורתולוגים שלהם בארבידובסיס, המהווים גנים קנדיזאטים לגנים יחודיים לאבקה בעגבנייה

רצף הגן הקנדיזאט	האורתולוג בארבידובסיס	תאור	ביטוי בארבידובסיס
TDF18.1	AT2G32670	Vesicle-associated membrane protein 725 (AtVAMP725); <i>A. thaliana</i>	מתבטא באבקה.
TDF17.2	AT1G04760	Vesicle-associated membrane protein 726 (AtVAMP726); <i>A. thaliana</i>	מתבטא באבקה. רמת ביטוי נמוכה יותר בשורש.
TDF31	AT1G35670	Calcium and calmodulin-dependent protein kinase 2 (AtCDPK2); <i>A. thaliana</i>	מתבטא באבקה. רמת ביטוי נמוכה יותר בזרע ובשורש.
Les.5292.1.S1_at	AT3G27330	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein; <i>A. thaliana</i>	מתבטא באבקה, תרבויות תאים זרע.
Les.3766.1.S1_at	AT2G46140	Ethylene-responsive late embryogenesis-like protein (ER5); <i>S. lycopersicum</i>	מתבטא באבקה וזרע.

מיצוי RNA מאברים שונים של צמחי עגבנייה

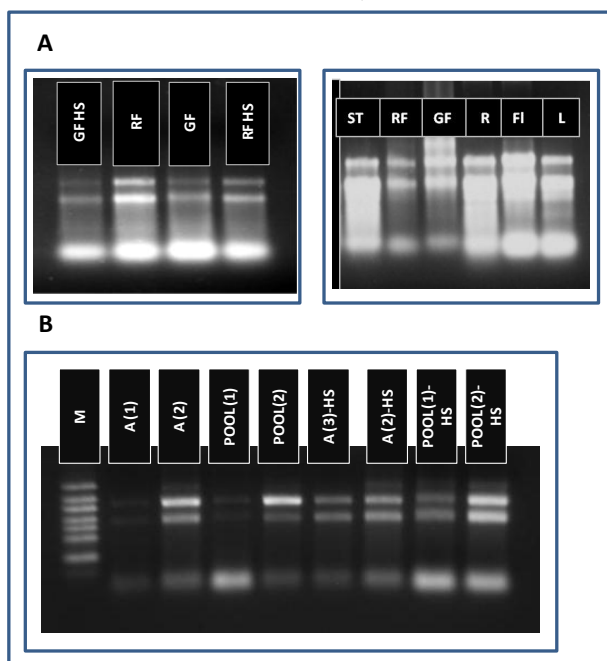
בוצע מיצוי של RNA תוך שימוש ב- Tri-reagent מאברים שונים של צמחי עגבנייה מהזן cv. 3017. שורשים, גבעולים, עלים, פרי ירוק ופרי בשל ופרחים. נעשה שימוש ברקמות מצמחים שנחשפו לתנאי ביקורת (C ; 25°C) או לתנאי עקת-חום (HS ; 45°C). עיכול שאריות DNA בעזרת טיפול ב- DNase וסינתזת cDNA בוצעו כמפורט למעלה לגבי גרגרי אבקה.

בחינת ביטוי גנים: תכנון פריימרים וביצוע אנליזות PCR-RT כמותי (qRT-PCR)

תוכננו תחלים (פריימרים) לגנים AtCDPK2, AtVAMP725, Zinc finger (C3HC4-type RING finger), ethylene-responsive late embryogenesis (ER5) (ראה טבלה 1) כמפורט ב- [1], ובוצעה אנליזת RT-PCR כמותי תוך שימוש ב- 18 S rRNA כגן ייחוס. נעשה שימוש ב- SYBR Green PCR Master Mix המכיל AmpliTaq Gold DNA polymerase ובמכשיר Rotor Gene. רמת הביטוי של כל גן חושבה יחסית לרמת 18 S rRNA בדוגמה בשיטת ΔC_T [1]. כל בדיקה בוצעה ב-3 חזרות ביולוגיות לפחות.

בתמונה 1 מוצגות דוגמאות מיצוי RNA (חלק מהחזרות הביולוגיות) מרקמות שונות של הצמח (A) ומגררי

אבקה (B).



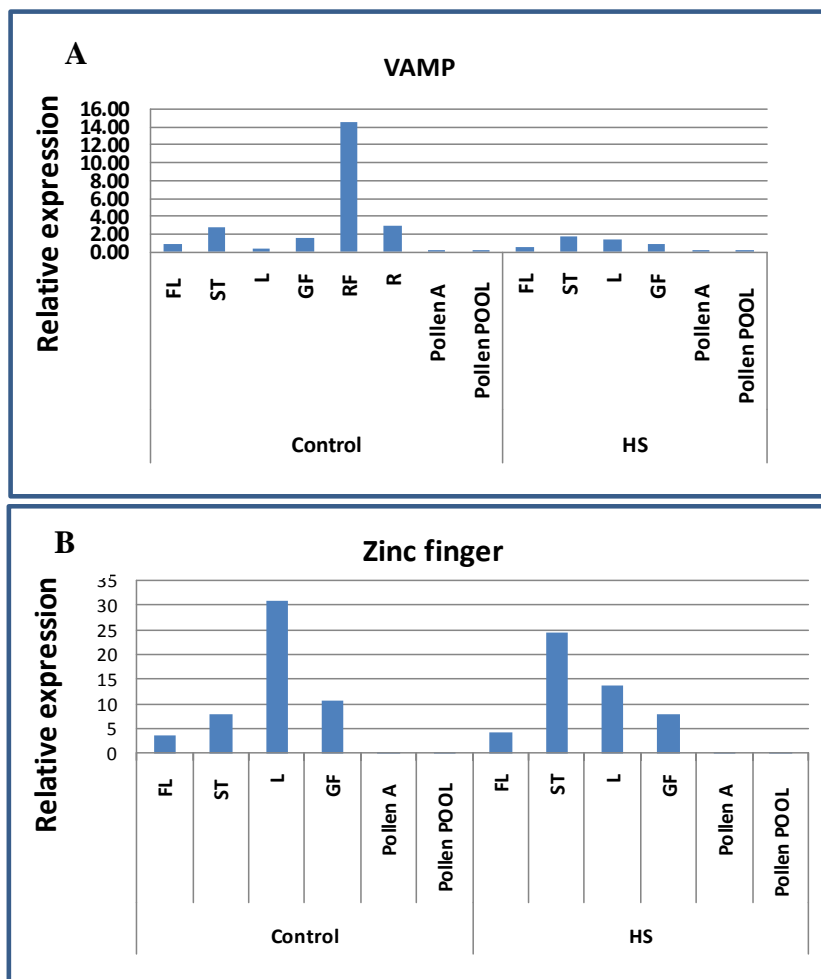
תמונה 1. דוגמאות מיצוי RNA (אחרי DNase)

מרקמות שונות של צמח העגבנייה (A) ומגררי אבקה (B). מיצוי RNA בוצע כמפורט בתיאור הניסוי. GF – פרי ירוק; RF – פרי בשל; R – שורשים; ST – גבעול; L – עלים; FL – פרחים; A – גרגרי אבקה בשלה; POOL – גרגרי אבקה מתפתחים שהופקו מפקעי פריחה בדרגות התפתחות של 1-3 ימים לפני פתיחת הפרח. HS – חשיפה למשך שעותיים ל-45°C.

בתמונה 2 מוצגות תוצאות מייצגות של ביטוי הגנים AtVAMP725 (Zinc finger (C3HC4-type RING

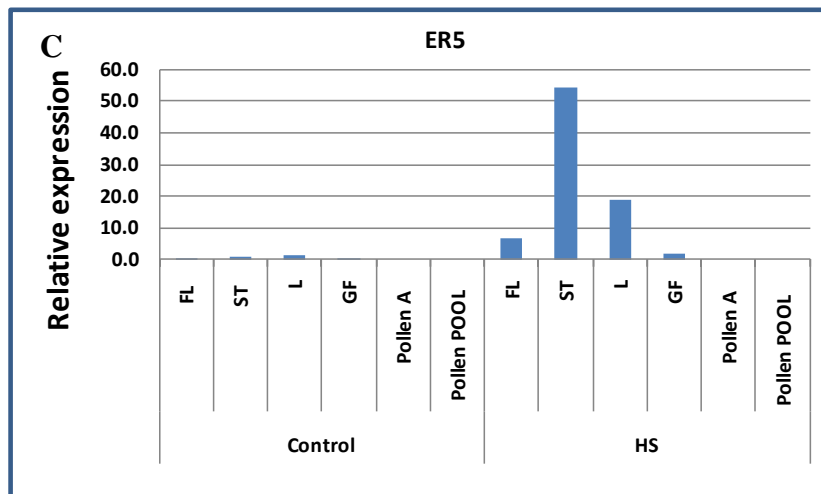
), ו- ethylene-responsive late embryogenesis (ER5), בהתאמה, ברקמות השונות, כולל גרגרי אבקה

מתפתחים ובשלים, של צמח העגבנייה cv. 3017.



תמונה 2. רמת ביטוי הגנים Zinc finger (A) AtVAMP725 (C3HC4-type RING finger) ו- ethylene-responsive late embryogenesis (ER5) (B) (C)

בגרגרי אבקה וברקמות הוגשטיביות של צמח העגבנייה cv. 3017. רמת הביטוי חושבה יחסית לביטוי גן הייחוס 18 S rRNA. GF – פרי ירוק; RF – פרי בשל; R – שורשים; ST – גבעול; L – עלים; FL – פרחים; A – גרגרי אבקה בשלה; POOL – גרגרי אבקה מתפתחים שהופקו מפקעי פריחה בדרגות התפתחות של 1-3 ימים לפני פתיחת הפרח. HS – חשיפה למשך שעותיים ל-45°C.



מתוך התוצאות המוצגות בתמונה 2, ניתן לראות, לגבי כל הגנים הנבדקים, ביטוי במגוון רקמות הצמח (עלים, שורשים, גבעול, פרי) וביטוי נמוך יחסית בגרגרי אבקה מתפתחים ובשלים. הגנים נבדלים מבחינת השפעת החשיפה לעקת-חום על רמות הביטוי; כשרמת הביטוי של ER5 עולה באופן משמעותי בחום בעוד ש-VAMP אינו מראה תגובה לחום ברקמות שנבדקו ו-Zinc finger מראה עלייה ברמת הביטוי בחום בגבעול וירידה בעלים. נבדקה גם רמת הביטוי של הגן CDPK2, תוך שימוש ב-PCR שאיננו כמותי (תוצאות לא מוצגות), והתקבלה רמת ביטוי גבוהה בגבעול ובשורש בנוסף לביטוי בגרגרי אבקה מתפתחים.

לסיכום: התוצאות שהתקבלו מראות שהגנים המסוכמים בטבלה 1, שנחשבו כייחודיים לאבקה (על סמך הומולוגיה לגנים של ארבידובסיס – כמפורט למעלה) אינם ייחודיים, ומתבטאים גם ברקמות אחרות. לפיכך, היה צורך להרחיב את מאגר הגנים הייחודיים לאבקה תוך שימוש בשיטות מתקדמות שלא היו בשימוש נרחב כשבצענו את העבודה המוקדמת ובזמן הגשת תוכנית המחקר. לצורך זה הכנו דוגמאות RNA מאבקה מתפתחת ואבקה בשלה, כמו גם ממגוון רקמות וגטטיביות (גבעול, שורשים, פירות, עלים ופרחים ללא אבקנים – שהופקו מצמחים/ענפים פורחים שנחשפו לתנאי ביקורת ותנאי עקת-חום), ובוצע ריצוף בנפח גבוה ברמת ה-cDNA תוך שימוש בשיטת ILLUMINA.

הרחבת מאגר הגנים הייחודיים לאבקה – תוך שימוש בריצוף בנפח גבוה ברמת ה-cDNA – שיטת

ILLUMINA

לאחרונה התקבלו תוצאות הריצוף בנפח גבוה ובוצעה אנאליזה ביואינפורמטית התחלתית של התוצאות. הריצוף בוצע מאזור ה-3'. האנוטציה בוצעה על סמך השוואת הרצפים שהתקבלו לרצף גנום העגבנייה. בוצעה השוואה של הקריאות שהתקבלו ('רמת הביטוי') לגבי רצפי הגנים השונים בדוגמאות הבאות (כל דוגמא מייצגת לפחות 50 צמחים):

- (1) אבקה בשלה שנחשפה לתנאי ביקורת – בהשוואה למאגר רקמות וגטטיביות שנחשפו לתנאי ביקורת.
- (2) מאגר של אבקה מבשילה (POOL), שנלקח מ-3 דרגות התפתחות אבקה: יום, יומיים ו-3 ימים לפני פתיחת הפרח) שנחשפה לתנאי ביקורת – בהשוואה למאגר רקמות וגטטיביות שנחשפו לתנאי ביקורת.
- (3) אבקה בשלה שנחשפה לתנאי חום (38 מ"צ למשך שעה) – בהשוואה למאגר רקמות וגטטיביות שנחשפו לתנאי חום (38 מ"צ למשך שעה).

4) מאגר של אבקה מבשילה (POOL), שנלקח מ-3 דרגות התפתחות אבקה: יום, יומיים ו-3 ימים לפני פתיחת הפרח) שנחשפה לתנאי חום (38 מ"צ למשך שעה) – בהשוואה למאגר רקמות וגטיביבות שנחשפו לתנאי חום (38 מ"צ למשך שעה).

על מנת לזהות גנים המתבטאים באופן ייחודי באבקה, בוצע סינון של התוצאות ואנו מתייחסים רק לאותם הגנים שלא הראו כל ביטוי במכלול הרקמות הוגטיביבות (אפס ביטוי).

בהשוואת הגנים המתבטאים באבקה בשלה (MPGs-C) לרקמות וגטיביבות (Veget-C) שהופקו מצמחים שגדלו בתנאי ביקורת – התקבלו סה"כ 799 טרנסקריפטים שלא הראו כל ביטוי ברקמות הוגטיביבות והראו לפחות 10 קריאות (READS) באבקה. התקבלו 182 טרנסקריפטים שלא הראו ביטוי ברקמות הוגטיביבות ולפחות 10 קריאות "מנורמלות" (tpm) באבקה. מתוכם 58.8% (107 גנים) הינם גנים שאינם ידועים/מאופיינים. מתוך הגנים הידועים בולטים גנים המעורבים בתפקוד גרגרי האבקה: התפתחות ואוריינטציה של נחשון הנביטה (פקטאט ליאז), הציטוסקלטון, גנים הקשורים למטבוליזם (כמו אינברטאז – LIN7), טרנספורטים, מספר הומולוגים של פרוטאין קינאז ועוד. בטבלה 2 מוצגים, כדוגמא, 50 הגנים שהראו את הביטוי הגבוה ביותר באבקה ולא הראו כל ביטוי במכלול הרקמות הוגטיביבות.

בהשוואת הגנים המתבטאים באבקה בשלה (MPGs-HT) לרקמות וגטיביבות (Veget-HT) שהופקה מצמחים שנחשפו לחום – 38 מ"צ למשך שעה – התקבלו סה"כ 1205 טרנסקריפטים שלא הראו ביטוי כלל ברקמות הוגטיביבות ולפחות 10 קריאות (READS) באבקה. התקבלו 119 טרנסקריפטים שלא הראו ביטוי ברקמות הוגטיביבות ולפחות 10 קריאות "מנורמלות" (tpm) באבקה. מתוכם 53.3% (64 גנים) הינם גנים שאינם ידועים/מאופיינים. מתוך הגנים הידועים בולטים גנים המעורבים בתנועת שלפוחיות (כמו synthaxin), בבקרת דופן התא (כמו expansin), בתגובה לעקות (chaperone, peroxidase), ועוד. בטבלה 3 מוצגים, כדוגמא, 50 הגנים שהראו את הביטוי הגבוה ביותר באבקה ולא הראו כל ביטוי במכלול הרקמות הוגטיביבות. זוהו גנים המעורבים בבקרה, כמו לדוגמא RING-H2 finger protein ATL29 המעורב בבקרת פירוק חלבונים. גן זה כמו גם גנים אחרים (כמו לדוגמא synthaxin) שזוהו על ידינו במסגרת תוכנית מחקר זו מראים עלייה משמעותית בביטוי בתגובה לתנאי טמפרטורה גבוהה המקנים עמידות ברמת איכות האבקה ומהווים לכן קנדידאטים לגנים המעורבים בהקניית עמידות לחום לגרגרי אבקה. מעניין לציין שחלקם מראים עלייה ברמת הביטוי בתנאים המשרים עמידות נרכשת לחום גם בגרגרי אבקה מתפתחים.

בהשוואת הגנים המתבטאים באבקה מתפתחת (MMs-HT) לרקמות וגטיביבות (Veget-HT) שהופקו מצמחים שנחשפו לחום – 38 מ"צ למשך שעה – התקבלו סה"כ 1205 טרנסקריפטים שלא הראו ביטוי כלל ברקמות הוגטיביבות ולפחות 10 קריאות (READS) באבקה. התקבלו 218 טרנסקריפטים שלא הראו ביטוי ברקמות הוגטיביבות ולפחות 10 קריאות "מנורמלות" (tpm) באבקה. מתוכם 74.3% (162 גנים) הינם גנים שאינם ידועים/מאופיינים. מתוך הגנים הידועים בולטים גנים המעורבים בהומיאוסטאזיס של יונים ובקרת ה-pH (כמו vacuolar H(+)-ATPase ו-translation initiation factor eIF-1), בהתאמה, גנים הקשורים בתגובה והגנה מפני עקות וגנים המבקרים שעתוק. בטבלה 4 מוצגים, כדוגמא, 50 הגנים שהראו את הביטוי הגבוה ביותר באבקה ולא הראו כל ביטוי במכלול הרקמות הוגטיביבות.

יש לציין את הקבוצה הגדולה של הגנים שאינם מאופיינים. נכללים בקבוצה זו גנים בעלי רמת ביטוי גבוהה באבקה המראים שינוי משמעותי ברמת הביטוי עם החשיפה לחום. בטבלה מס. 5 מוצגת דוגמא של מספר גנים כאלה ורמת הביטוי שלהם באבקה מתפתחת ובשלה בתנאי ביקורת ותנאי חום.

טבלה 2. זיהוי גנים המתבטאים באופן ייחודי בגרגרי אבקה בשלה של עגבנייה. מוצגים 50 גנים המראים רמת ביטוי גבוהה. MGS-C – אבקה בשלה הופקה מצמחים שנחשפו לתנאי ביקורת. Veget-C – מכלול חלקים וגטיביים של הצמח (שורשים, גבעולים, עלים, פירות, פרחים ללא אבקה) שנלקחו מצמחים שנחשפו לתנאי ביקורת.

Database_id	Description	MPGs-C	Veget-C	p-value	Fold change log(2)
Solyc05g05416.0.1.1	Uncharacterized protein	526.4	0	0	13.4
Solyc07g00504.0.2.1	ATPase 6, plasma membrane-type	385.5	0	0	12.9
SL2.40ch06_258582_258647	SL2.40ch06_258582_258647	382.8	0	0	12.9
SL2.40ch05_7480329_748183	SL2.40ch05_7480329_748183	330.4	0	0	12.7
Solyc12g09601.0.1.1	Receptor-like protein kinase. U-box domain-containing protein 35	201.3	0	0	12.0
SL2.40ch09_2613294_2613672	SL2.40ch09_2613294_2613672	151.5	0	1.25E-293	11.6
Solyc05g04989.0.1.1	Early nodulin-20	150.6	0	8.34E-292	11.6
SL2.40ch09_4227911_4227912	SL2.40ch09_4227911_4227912	109.1	0	1.41E-211	11.1
SL2.40ch05_57795241_57795917	SL2.40ch05_57795241_57795917	89.1	0	6.41E-173	10.8
Solyc09g09085.0.2.1	Universal stress protein family protein. Uncharacterized protein	80.4	0	3.82E-156	10.7
SL2.40ch07_5840259_584154	Uncharacterized protein	79.6	0	1.10E-154	10.6
SL2.40ch09_56280292_56280778	SL2.40ch09_56280292_56280778	76.4	0	1.74E-148	10.6
Solyc09g09048.0.2.1	Uncharacterized protein	75.5	0	1.16E-146	10.6
SL2.40ch05_55937970_55938278	SL2.40ch05_55937970_55938278	75.3	0	2.68E-146	10.6
SL2.40ch12_40184450_40185303	SL2.40ch12_40184450_40185303	73.4	0	1.19E-142	10.5
SL2.40ch04_19954577_19955	Lipid phosphate phosphatase 2	72.5	0	7.92E-141	10.5
SL2.40ch03_45051733_45053245	SL2.40ch03_45051733_45053245	68.5	0	3.61E-133	10.4
Solyc06g05399.0.1.1	Uncharacterized protein	63.0	0	1.36E-122	10.3
SL2.40ch03_4644470_46445	Protein kinase	62.1	0	9.04E-121	10.3
SL2.40ch05_3664437_36645350	SL2.40ch05_3664437_36645350	60.6	0	7.48E-118	10.2
SL2.40ch07_61399533_61400520	SL2.40ch07_61399533_61400520	58.1	0	4.12E-113	10.2
Solyc09g00595.0.2.1	Pathogenesis-related protein 1A	54.9	0	6.52E-107	10.1
SL2.40ch05_40243742_40244486	SL2.40ch05_40243742_40244486	54.2	0	1.87E-105	10.1
SL2.40ch08_27192881_27193	Uncharacterized protein	52.1	0	1.92E-101	10.0
SL2.40ch05_1664958_166632	Probable pectate lyase 6	51.3	0	5.54E-100	10.0
Solyc10g08643.0.1.1	WD-40 repeat family protein. Protein Mut1 1	49.6	0	1.06E-96	10.0
SL2.40ch12_203580_205987	PREDICTED: protein notum homolog	49.4	0	2.45E-96	9.9
Solyc06g06282.0.2.1	Receptor-like protein kinase. U-box domain-containing protein 35	45.5	0	1.12E-88	9.8
SL2.40ch12_3073891_307473	SL2.40ch12_3073891_307473	45.3	0	2.59E-88	9.8
SL2.40ch04_62508146_62508825	SL2.40ch04_62508146_62508825	45.3	0	2.59E-88	9.8
SL2.40ch01_1808763_180956	Hin1 like protein	43.8	0	2.14E-85	9.8
SL2.40ch11_36049703_36050	Pollen-specific protein SF3	43.2	0	2.66E-84	9.8
SL2.40ch11_46702688_46704	ATP synthase subunit alpha	43.0	0	6.15E-84	9.7
SL2.40ch08_16595001_16596059	SL2.40ch08_16595001_16596059	42.8	0	1.42E-83	9.7
SL2.40ch07_2412197_241245	Protein kinase	41.5	0	5.09E-81	9.7
SL2.40ch12_6439004_6439893	SL2.40ch12_6439004_6439893	41.5	0	5.09E-81	9.7
Solyc10g00657.0.2.1	Uncharacterized protein	40.6	0	3.39E-79	9.7
SL2.40ch08_62062756_62063489	SL2.40ch08_62062756_62063489	40.4	0	7.85E-79	9.7
Solyc02g06334.0.1.1	Calmodulin 4. Polcalcin Nic t 2	38.5	0	3.48E-75	9.6
SL2.40ch11_15600954_15602543	SL2.40ch11_15600954_15602543	37.7	0	1.00E-73	9.6
SL2.40ch02_13316628_13316767	SL2.40ch02_13316628_13316767	37.4	0	5.36E-73	9.5
SL2.40ch00_10972850_10973	Endochitinase A	35.7	0	1.03E-69	9.5
SL2.40ch12_64044129_64044679	SL2.40ch12_64044129_64044679	35.1	0	1.28E-68	9.5
SL2.40ch06_32361689_32361	Hypothetical protein	34.9	0	2.95E-68	9.4
gij1771153 embx X91391.1	Invertase (LIN7). Beta-fructofuranosidase, insoluble isoenzyme 1	34.7	0	6.84E-68	9.4
Solyc12g00928.0.1.1	Auxin-induced protein-like. Indole-3-acetic acid-induced protein ARG7	33.2	0	5.66E-65	9.4
gij225314622 dbj AK327971.1	Calmodulin-like protein 5	32.3	0	3.77E-63	9.3
SL2.40ch06_38123710_38125284	SL2.40ch06_38123710_38125284	32.1	0	8.72E-63	9.3
SL2.40ch10_34448544_34449621	SL2.40ch10_34448544_34449621	32.1	0	8.72E-63	9.3
Solyc09g08318.0.2.1	Unknown Protein	31.7	0	4.68E-62	9.3

טבלה 3. זיהוי גנים המתבטאים באופן ייחודי בגרגרי אבקה בשלה של עגבנייה שנחשפו לחום. מוצגים 50 גנים המראים רמת ביטוי גבוהה. MGS-HT – אבקה בשלה הופקה מצמחים שנחשפו לתנאי חום (HT - 38 מ"צ למשך שעה). Veget-HT – מכלול חלקים וגטטיביים של הצמח (שורשים, גבעולים, עלים, פירות, פרחים ללא אבקה) שנלקחו מצמחים שנחשפו לתנאי חום.

Database_id	Description	MPGs-HT		p-value	Fold_change log(2)
SL2.40ch05_58795196_5	Uncharacterized protein	2127.8	0	0	15.4
Solyc08g044540.1.1	Uncharacterized protein	212.2	0	0	12.1
Solyc01g007240.2.1	Putative syntaxin-24	188.6	0	0	11.9
Solyc05g054160.1.1	Uncharacterized protein	156.9	0	0	11.6
SL2.40ch01_1347850_13	Predicted protein	87.8	0	1.27E-226	10.8
Solyc03g121220.2.1	Uncharacterized protein	84.9	0	3.33E-219	10.7
SL2.40ch12_40184450_4	SL2.40ch12_40184450_40185303	79.0	0	3.75E-204	10.6
SL2.40ch01_1808763_18	Hin1 like protein	74.0	0	3.20E-191	10.5
Solyc01g110320.2.1	Uncharacterized protein	72.4	0	5.56E-187	10.5
SL2.40ch11_7564180_75	SL2.40ch11_7564180_7565993	66.1	0	7.19E-171	10.4
Solyc10g085960.1.1	Pathogenesis-related protein PRMS	63.7	0	1.01E-164	10.3
SL2.40ch06_35928628_3	SL2.40ch06_35928628_35929433	63.5	0	4.37E-164	10.3
SL2.40ch01_372098_373	PGPS/NH22	58.4	0	6.09E-151	10.2
SL2.40ch11_7403717_74	SL2.40ch11_7403717_7404743	52.8	0	1.59E-136	10.0
SL2.40ch07_61402031_6	Uncharacterized protein	46.8	0	2.91E-121	9.9
SL2.40ch08_2445326_24	Pollen-specific protein SF3	43.9	0	1.25E-113	9.8
SL2.40ch05_8828980_88	Unknown protein	42.7	0	1.16E-110	9.7
SL2.40ch10_41139151_4	Putative polyprotein, identical	42.2	0	2.17E-109	9.7
SL2.40ch07_5840259_58	Uncharacterized protein	37.1	0	4.91E-96	9.5
SL2.40ch04_63384931_6	Protein RALF-like 5	35.0	0	9.80E-91	9.5
Solyc03g006530.2.1	Uncharacterized protein	34.2	0	1.29E-88	9.4
Solyc12g006080.1.1	RPM1-interacting protein 4	33.7	0	2.42E-87	9.4
SL2.40ch02_41339051_4	Putative uncharacterized protein	33.5	0	6.41E-87	9.4
SL2.40ch03_57464302_5	SL2.40ch03_57464302_57464982	32.6	0	1.38E-84	9.3
SL2.40ch09_42277941_4	SL2.40ch09_42277941_42279128	31.9	0	6.84E-83	9.3
SL2.40ch05_19648282_1	SL2.40ch05_19648282_19649487	31.3	0	3.40E-81	9.3
SL2.40ch08_2675804_26	SL2.40ch08_2675804_2676940	31.1	0	9.01E-81	9.3
SL2.40ch08_61590946_6	Uncharacterized protein	30.9	0	3.90E-80	9.3
Solyc08g076940.1.1	Uncharacterized protein	30.5	0	2.75E-79	9.3
SL2.40ch06_39155883_3	Probable ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein AGD11	30.0	0	8.37E-78	9.2
Solyc01g010890.2.1	Expansin-A15	29.8	0	2.22E-77	9.2
SL2.40ch05_50271038_5	Gag/pol polyprotein, 3'-partial, putative	29.7	0	3.62E-77	9.2
Solyc10g008920.1.1	Contains Interpro domain(s) IPR012337 Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H fold.	29.4	0	2.55E-76	9.2
Solyc04g049400.2.1	Receptor-like protein kinase. U-box domain-containing protein 35	29.2	0	6.77E-76	9.2
SL2.40ch01_42768959_4	Uncharacterized protein	27.8	0	2.72E-72	9.1
Solyc05g006230.1.1	Peroxidase 6	27.0	0	3.59E-70	9.1
SL2.40ch10_53146235_5	Benzoate carboxyl methyltransferase	26.7	0	2.53E-69	9.1
Solyc05g055710.2.1	L-ascorbate oxidase homolog	26.3	0	2.90E-68	9.0
SL2.40ch03_45051733_4	SL2.40ch03_45051733_45053245	25.9	0	3.33E-67	9.0
SL2.40ch06_32649020_3	Probable ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein AGD11	25.0	0	4.39E-65	9.0
SL2.40ch10_1853584_18	SL2.40ch10_1853584_1855290	24.8	0	1.90E-64	9.0
SL2.40ch03_4644470_4	Protein kinase	24.5	0	1.34E-63	8.9
SL2.40ch11_37675752_3	Uncharacterized protein	23.6	0	1.76E-61	8.9
SL2.40ch12_3076742_30	SL2.40ch12_3076742_3077440	23.5	0	2.87E-61	8.9
Solyc12g096640.1.1	La-related protein 7. Uncharacterized protein	22.9	0	1.43E-59	8.8
SL2.40ch12_64748199_6	Uncharacterized protein ycf68	22.8	0	2.32E-59	8.8
Solyc00g075030.2.1	Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon TNT 1-94	22.4	0	2.67E-58	8.8
Solyc06g062820.2.1	Receptor-like protein kinase. U-box domain-containing protein 35	22.3	0	4.35E-58	8.8
Solyc05g025920.2.1	Auxin-induced protein 15A	20.9	0	1.75E-54	8.7
SL2.40ch05_62178944_6	MuDR family transposase containing protein	20.9	0	1.75E-54	8.7

טבלה 4. זיהוי גנים המתבטאים באופן ייחודי בגרגרי אבקה מתפתחים של עגבנייה שנחשפו לחום. מוצגים 50 גנים המראים רמת ביטוי גבוהה. MMs-HT – אבקה מתפתחת (שלבי התפתחות של יום, יומיים ושלושה ימים לפני פתיחת הפרח – שלבי ההבשלה של המיקרוספורות) שהופקה מצמחים שנחשפו לתנאי חום (HT - 38 מ"צ למשך שעה). Veget-HT – מכלול חלקים וגטיביים של הצמח (שורשים, גבעלים, עלים, פירות, פרחים ללא אבקה) שנלקחו מצמחים שנחשפו לתנאי חום.

Database_id	Description	MMs-HT	Veget-HT	p-value	Fold change log(2)
SL2.40ch05_5 8795196_587	Uncharacterized protein	425.5	0	0	13.1
SL2.40ch11_7 564180_7565	SL2.40ch11_7564180_7565993	153.4	0	0	11.6
SL2.40ch11_7 403717_7404	SL2.40ch11_7403717_7404743	143.0	0	0	11.5
SL2.40ch02_9 318725_9319	SL2.40ch02_9318725_9319028	107.3	0	0.00E+00	11.1
SL2.40ch10_1 8147831_181	SL2.40ch10_18147831_18148321	80.5	0	2.52E-232	10.7
Solyc10g0180 60.1.1	Elicitor-responsive protein 3. C2 domain-containing protein At1g63220	76.8	0	1.03E-221	10.6
SL2.40ch12_4 0184450_401	SL2.40ch12_40184450_40185303	73.5	0	3.47E-212	10.5
SL2.40ch07_5 7849575_578	SL2.40ch07_57849575_57850340	73.2	0	1.84E-211	10.5
Solyc08g0768 00.2.1	RING-H2 finger protein ATL29	72.9	0	1.70E-210	10.5
SL2.40ch06_3 5928628_359	SL2.40ch06_35928628_35929433	70.5	0	1.67E-203	10.5
SL2.40ch01_5 0613344_506	SL2.40ch01_50613344_50614157	66.2	0	2.53E-191	10.4
SL2.40ch03_2 0638150_206	SL2.40ch03_20638150_20639650	55.7	0	4.70E-161	10.1
SL2.40ch05_6 0751759_607	SL2.40ch05_60751759_60752635	50.3	0	1.69E-145	10.0
Solyc12g0064 00.1.1	Uncharacterized protein	50.1	0	6.78E-145	10.0
SL2.40ch05_5 5084799_550	GDSL esterase/lipase A4g26790	48.8	0	3.71E-141	9.9
SL2.40ch06_4 3570235_435	Unknown	48.3	0	1.04E-139	9.9
SL2.40ch07_2 5891388_258	SL2.40ch07_25891388_25891732	47.8	0	2.91E-138	9.9
SL2.40ch02_5 53879_55428	SL2.40ch02_553879_554287	45.1	0	1.52E-130	9.8
SL2.40ch11_7 296936_7297	SL2.40ch11_7296936_7297629	44.3	0	3.92E-128	9.8
SL2.40ch10_4 4557828_445	SL2.40ch10_44557828_44558504	44.1	0	2.08E-127	9.8
SL2.40ch07_6 3534885_635	SL2.40ch07_63534885_63535809	43.6	0	5.81E-126	9.8
SL2.40ch04_3 1843506_318	SL2.40ch04_31843506_31844310	41.7	0	1.18E-120	9.7
SL2.40ch02_4 1339051_413	Uncharacterized protein	40.4	0	6.44E-117	9.7
SL2.40ch08_2 9338732_293	Gag-pol polyprotein, putative	40.4	0	8.50E-117	9.7
SL2.40ch03_9 158972_9160	Unknown [Arabidopsis thaliana] e-value: 4e-06 blast score: 53.9	39.6	0	1.66E-114	9.6
SL2.40ch06_1 4938482_149	SL2.40ch06_14938482_14938639 #orf	39.1	0	3.53E-113	9.6
SL2.40ch05_1 9648282_196	SL2.40ch05_9648282_19649487	36.9	0	8.68E-107	9.5
SL2.40ch06_2 717149_2717	SL2.40ch06_2717149_2717934	36.6	0	8.00E-106	9.5
Solyc01g0072 40.2.1	Putative syntaxin-24	35.9	0	5.15E-104	9.5
SL2.40ch05_6 2178944_621	MuDR family transposase containing protein	35.5	0	1.09E-102	9.5
Solyc08g0445 40.1.1	Uncharacterized protein	34.5	0	4.92E-100	9.4
SL2.40ch11_2 3626383_236	SL2.40ch11_23626383_23626896	34.1	0	1.04E-98	9.4
SL2.40ch10_4 198770_4199	SL2.40ch10_4198770_4199485	33.9	0	3.17E-98	9.4
SL2.40ch10_4 9590279_495	SL2.40ch10_49590279_49591756	33.8	0	9.62E-98	9.4
Solyc02g0671 50.2.1	Pro-resilin. Uncharacterized protein At5g39570	33.3	0	2.69E-96	9.4
Solyc06g0664 10.2.1	Profilin-1	31.2	0	1.65E-90	9.3
SL2.40ch06_3 9896275_398	SL2.40ch06_39896275_39897566	29.8	0	2.75E-86	9.2
Solyc01g1103 20.2.1	Coiled-coil domain-containing protein 90B mitochondrial. Uncharacterized protein	29.7	0	3.63E-86	9.2
Solyc12g0981 40.1.1	Uncharacterized protein At4g13230	29.6	0	1.10E-85	9.2
SL2.40ch10_4 3896573_438	SL2.40ch10_43896573_43896910	29.3	0	7.70E-85	9.2
SL2.40ch10_5 3604018_536	SL2.40ch10_53604018_53604397	29.0	0	4.07E-84	9.2
SL2.40ch03_5 4175091_541	Uncharacterized protein	29.0	0	5.38E-84	9.2
SL2.40ch05_3 8379818_383	SL2.40ch05_38379818_38380544	28.8	0	2.16E-83	9.2
SL2.40ch10_5 3146235_531	Benzoate carboxyl methyltransferase	27.8	0	1.28E-80	9.1
SL2.40ch01_7 2795502_727	Uncharacterized protein	27.0	0	2.50E-78	9.1
SL2.40ch09_2 0164554_201	SL2.40ch09_20164554_20164980	27.0	0	3.30E-78	9.1
Solyc02g0929 60.1.1	Uncharacterized protein	26.9	0	4.36E-78	9.1
SL2.40ch05_5 5443180_554	SL2.40ch05_5443180_54444170	26.8	0	1.32E-77	9.1
SL2.40ch05_6 0225606_602	Heat stress transcription factor A-1a	26.5	0	7.01E-77	9.1
Solyc09g0489 90.2.1	V-type proton ATPase subunit E2	26.5	0	9.25E-77	9.0

טבלה 5. מופע הביטוי של גנים בלתי ידועים המתבטאים באופן ייחודי בגרגרי אבקה בתגובה לחום.

Database_id	Description	MMs-C	MPGs-C	MMs-HT	MPGs-HT	Veget-C	Veget-HT
SL2.40ch05_58795196_58796656	Uncharacterized protein	211.9	823.6	425.5	2127.8129	0.3	0
SL2.40ch11_7564180_7565993	SL2.40ch11_7564180_7565993	44.7	67.7	153.4	66.1	1.1	0
SL2.40ch11_7403717_7404743	SL2.40ch11_7403717_7404743	123.1	34.1	143.0	52.8	0.3	0
Solyc08g044540.1.1	Uncharacterized protein	70.5	431.9	34.6	212.2	0.6	0

מתוך התוצאות המוצגות בטבלה 5, ניתן לראות מופע ביטוי שונה של הגנים, במהלך התפתחות גרגרי האבקה ובתגובה לחום. לגבי גן SL2.40ch05_58795196_58796656, לדוגמא, רואים עלייה משמעותית ברמת הביטוי בתגובה לחום, הן בגרגרי האבקה המתפתחים (MMs-HT) והן בגרגרים הבשלים (MPGs-HT). לגבי גן Solyc08g044540.1.1, ניתן לראות עלייה ברמת הביטוי עם ההבשלה וירידה ברמת הביטוי בתגובה לחום.

דין

גרגרי האבקה הינם מערכת ביולוגית ייחודית המראה רגישות לטמפרטורות גבוהות בשלבי ההתפתחות השונים ובמהלך הנביטה. המידע הקיים על מערכות ההגנה העשויות להקנות לגרגרי האבקה הגנה מעקות בכלל, ומנוזקי עקת-חום בפרט, הינו מוגבל ביותר. השערת העבודה שלנו היא שלגרגרי אבקה מנגנונים ייחודיים העשויים לשמש להגנה מפני עקות סביבה, ואפיון מנגנונים אלה יאפשר שימוש במידע ל"בניית עמידות משופרת" שתהיה מבוססת על חיבור/צירוף מספר מנגנונים. אנו משערים גם שמנגנונים שונים מופעלים באופן שונה בשלבי ההתפתחות השונים של גרגרי האבקה וביחד הם מהווים מערכת הגנה שלמה. לדוגמא: גרגרי האבקה של עגבנייה עוברים תהליך התייבשות בזמן הבשלתם (במהלך 3 ימים עד ליום פתיחת הפרח), תהליך המצריך אקטיבציה של מנגנונים שיגנו על מרכיבי התא (ממברנות, חלבונים וכו') והשערתנו היא שאקטיב צייה מוקדמת של מנגנונים אלה עשויה לשפר את איכות האבקה בתנאי סביבה שאינם מיטביים. מטרת תוכנית המחקר הנוכחית הייתה, אם כן, לזהות ולאפיין גנים ייחודיים לאבקה שעשויים להיות מעורבים בהגנה. בשלב ראשון, בחנו מספר גנים, שעל פי מידע ראשוני [7] ועל סמך הומולוגיה לרצפים מארבידובסיס, היו אמורים להראות ביטוי ספציפי לגרגרי אבקה של עגבנייה. התוצאות המסוכמות בטבלה 1 מראות שגנים אלה מתבטאים ברמה גבוהה יחסית באברים שונים של צמח העגבנייה ואינם ייחודיים לאבקה. לפיכך, היה קיים צורך להרחיב את מאגר הגנים הייחודיים לאבקה תוך שימוש בשיטות מתקדמות שלא היו בשימוש נרחב כשבצענו את העבודה המוקדמת ובזמן הגשת תוכנית המחקר. לשם כך, בשנת המחקר השנייה והאחרונה ביצענו ריצוף בנפח גבוה ברמת ה-cDNA תוך שימוש בשיטת ILLUMINA וייצרנו מאגר מידע רחב של גנים המתבטאים באופן ייחודי באבקה של עגבנייה בתנאים שונים (תנאי-גידול אופטימאליים ותנאי חום). מאגר זה כולל אחוז גבוה (מעל 50%) של גנים שאינם מאופיינים כשחלקם מראה שינוי משמעותי ברמת הביטוי בתנאים המשרים עמידות נרכשת לחום (acquired thermotolerance) ומהווים לכן קנדידאטים מעניינים לשמש במנגנון-י עמידות גרגרי אבקה לחום. בנוסף, מצביעות התוצאות על גנים המעורבים בבקרת הומיאוסטאזיס של חלבונים, הומיאוסטאזיס של יונים ותנועת שלפוחיות כגנים העשויים לתרום לעמידות גרגרי האבקה לחום.

1. Pressman E, Harel D, Zamski E, Shaked R, Althan L, Rosenfeld K and N Firon (2006) The effect of high temperatures on the expression and activity of sucrose cleaving enzymes during tomato (*Lycopersicon esculentum*) anther development. *J Hort Sci Biotechnol* 81: 341-348.
2. Firon N, Peet MM, Pharr DM, Zamski E, Rosenfeld K, Althan L and E Pressman (2006) Pollen grains of heat tolerant tomato cultivars retain higher carbohydrate concentration under heat stress conditions. *Scient Hort* 109: 212-217.
3. Pressman E, Shaked R and N Firon (2008) Tomato Response to Heat Stress: Focus on Pollen Grains. *Plant Stress* 1: 216-227.
4. Firon N, Nepi M and Pacini E (2012) Water status and associated processes mark critical stages in pollen development and functioning. *Annal Bot* 109: 1201-1214.
5. Pacini E, Guarnieri M, and M Nepi (2006) Pollen carbohydrates and water content during development, presentation, and dispersal: a short review. *Protoplasma* (2006) 228: 73-77
6. 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.
7. Frank G, Pressman E, Ophir R, Althan L, Shaked R, Freedman M, Shen S and N Firon (2009) Transcriptional profiling of maturing tomato (*Solanum lycopersicum* L.) microspores reveals the involvement of heat shock proteins, ROS scavengers, hormones, and sugars in the heat stress response. *J Exp Bot* 60: 3891-3908.

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
תוכנית העבודה התבססה על זיהוי מוקדם של מספר גנים שהראו הומולוגיה לרצפי גנים של ארבידובסיס המתבטאים ברמה גבוהה יחסית או באופן ייחודי באבקה, במטרה לזהות ולאפיין גנים שיאפשרו שיפור איכות האבקה בחום בצמחי עגבנייה.
עיקרי התוצאות.
התוצאות שהתקבלו מראות שהגנים AtVAMP725, Zinc finger (C3HC4-type RING finger), ו-ethylene responsive late embryogenesis (ER5), מתבטאים ברמה גבוהה יחסית באברים שונים של צמח העגבנייה ואינם ייחודיים לאבקה. לפיכך היה צורך להרחיב את מאגר הגנים הייחודיים לאבקה תוך שימוש בשיטות מתקדמות שלא היו בשימוש נרחב בזמן הגשת תוכנית המחקר. ביצענו ריצוף בנפח גבוה ברמת ה- cDNA תוך שימוש בשיטת ILLUMINA וייצרנו מאגר מידע רחב של גנים המתבטאים באופן ייחודי באבקה של עגבנייה בתנאים שונים (תנאי-גידול אופטימאליים ותנאי חום). מאגר זה כולל אחוז גבוה (מעל 50%) של גנים שאינם מאופיינים כשחלקם מראה שינוי משמעותי ברמת הביטוי בתנאים המשרים עמידות נרכשת לחום (acquired thermotolerance) ומהווים לכן קנדידאטים מעניינים לשמש במנגנון-י עמידות גרגרי אבקה לחום. בנוסף, מצביעות התוצאות על גנים המעורבים בבקרת הומיאוסטאזיס של חלבונים, הומיאוסטאזיס של יונים ותנועת שלפוחיות כגנים העשויים לתרום לעמידות גרגרי האבקה לחום.
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?
המטרות לתקופת הדו"ח הושגו וקיים בידינו מאגר גדול של גנים ייחודיים לאבקה של עגבנייה. בהתבסס על התוצאות שהושגו, יש להמשיך את המחקר ולאפיין גנים קנדידאטים מעניינים בהקשר של תגובה ועמידות לחום של גרגרי האבקה.
בעיות שונות לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר המשך אפיון גנים ייחודיים לאבקה של עגבנייה שזוהו במהלך המחקר הנוכחי.
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטט 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.
פרסום הדוח
ללא הגבלה - (בספריות ובאינטרנט)
חסוי - לא לפרסם
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי ? כן