

**בחינת מעורבות חלבוני עקת חום במנגנון המניעה של  
נזקי טמפרטורות לילה נמוכות בפלפל על ידי העלאת  
טמפרטורת היום**

**עבודת-גמר מוגשת לפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות  
הסביבה של האוניברסיטה העברית בירושלים לשם קבלת  
תואר 'מוסמך למדעי החקלאות'**

**מאת: שרית כהן מיכאל**

**סיוון, תשס"ח**

**רחובות**

**יוני, 2008**

**עבודה זו נעשתה בהדרכתם של ד"ר איתן פרסמן וד"ר נורית  
פירון מן המחלקה לגידולי שדה במכון הוולקני, ובהדרכתו של  
פרופ' אליעזר זמסקי מן המכון למדעי הצמח בפקולטה  
לחקלאות של האוניברסיטה העברית בירושלים**

**ברצוני להודות לד"ר רון פורת מן המחלקה לאחסון במכון  
הוולקני, ולצוות המעבדה שלו על האירוח הנדיב במעבדתו**

**תודה מיוחדת לשמואל שן על העזרה בהעמדת הניסויים,  
ולביאה אלטחן על הסיוע הרב בעבודה עם החלבונים ולרחל  
שקד על העזרה הרבה באיסוף והפקת החומר הצמחי**

**תודה רבה לצוותי המעבדות של החוקרים במחלקה לגנטיקה  
וירקות על הייעוץ האדיב והאירוח הנדיב במעבדותיהם**

**ברצוני להודות מקרב לב לבני משפחתי, שתמכו בי לאורך כל  
הדרך**

## תקציר

הפלפל הוא מין רגיש לטמפרטורות לילה נמוכות הפוגעות בהתפתחות הוגטיבית והפרודוקטיבית שלו. טיפולי הקומפנסציה, המהווים את בסיס העבודה, מתבססים על הרעיון שחשיפת הצמחים לעקת חום מתונה ביום תפעיל מערכת הגנה מפני טמפרטורות הלילה הנמוכות של החורף.

האבקה היא האיבר הרגיש ביותר בצמחים לפגיעה מעקות אביוטיות. מעט מאוד ידוע על מנגנוני ההגנה של אבקה מתפתחת מפני עקה. חע"ח קשורים בשמירה על המבנה המרחבי ומניעת שקיעה וצבירה של חלבונים שעברו שינויים מבניים בעקבות חשיפה לעקת חום או עקות אחרות, ועשויים להיות מעורבים גם במנגנון ההגנה מפני עקה הקיים באבקה.

ע"מ ללמוד על מעורבות חע"ח במערכת ההגנה מפני קור בפלפל, נבדק פרופיל הביטוי שלהם בעלים של צמחים צעירים בעקבות החשיפה לחום. כמו כן, נבדק ביטוי חע"ח בעלים ובאבקה מתפתחת של צמחי פלפל בוגרים אשר נחשפו לטמפרטורות יום גבוהות. כטיפול ביקורת, צמחים נחשפו לתנאים אופטימאליים (טמפרטורות לילה גבוהות) או ללא חימום ביום או בלילה. בניגוד לדעה המקובלת, לפיה אבקה הנה חסרת תגובת חע"ח או בעלת תגובה חלקית, תוצאות מחקר זה מצביעות על אינדוקציה של חע"ח ממשפחות sHsp's באורגנלות שונות (ציטופלסמה, מיטוכונדריה ופלסטידות), וכן חלבונים ממשפחת Hsp70 ו- Hsp60 בעקבות החשיפה של האבקה לתנאי החום במהלך טיפולי הקומפנסציה.

בעלים נצפתה אינדוקציה של חע"ח ממשפחות sHsp's באורגנלות שונות (ציטופלסמה וכלורופלסט) וכן חלבונים ממשפחת Hsp60 בעקבות החשיפה לתנאי הקומפנסציה. נצפו הבדלים בהתנהגותם של עלים צעירים בין בצמחים צעירים ובין בצמחים בוגרים. דוגמאות לכך הן אינדוקציה של נציג ממשפחת Hsp70 בעקבות חשיפה לחום שמתרחשת בצמחים הצעירים אך לא בבוגרים, והעדר ביטוי החלבון sHsp Class I הציטופלסמטי בצמחים הבוגרים, אשר מתבטא בצמחים הצעירים.

נצפתה קורלציה בין ביטוי חע"ח בעלים ובאבקה, לבין ההשפעות החיוביות של תנאי הקומפנסציה על הצמחים, שיכולה להעיד על מעורבות אפשרית של החלבונים במנגנון זה, אך לא באופן חד משמעי. מארג התגובה לחום בתא הוא מורכב מאוד, ובעתיד יהיה מעניין ללמוד על גורמים נוספים המעורבים במנגנון. כדאי יהיה לבדוק את רמות הביטוי של הורמונים צמחיים, Hsf's ו- APX, מכיוון שקיים דו-שיח בין עקות אביוטיות שונות.

| עמוד      | תוכן עניינים                          |
|-----------|---------------------------------------|
| 1         | א. רשימת קיצורים שכיחים וראשי תיבות   |
| <b>1</b>  | <b>ב. מבוא</b>                        |
| 1         | 1. תיאור כללי                         |
| 2         | 2. תיאור אנטומי של הפרח               |
| 3         | 3. תהליך יצירת האבקה                  |
| 5         | 4. השפעת עקה על התפתחות אבקה          |
| 6         | 5. מעורבות סוכרים בייצור אבקה ואיכותה |
| 7         | 6. ביטוי חעי"ח כתגובה לעקה            |
| 9         | 7. חלוקת חעי"ח למשפחות                |
| 9         | א. Hsp100/Clp                         |
| 10        | ב. Hsp90                              |
| 11        | ג. Hsp70                              |
| 12        | ד. Hsp60/chaperonins                  |
| 13        | ה. sHsp's                             |
| 17        | 8. ביטוי חלבוני עקת חום באבקה מתפתחת  |
| 19        | 9. הקומפנסציה (פיצוי)                 |
| <b>19</b> | <b>ג. מטרת העבודה</b>                 |
| <b>20</b> | <b>ד. חומרים ושיטות</b>               |
| 20        | 1. רשימת חומרים                       |
| 21        | 2. חומר צמחי                          |
| 21        | 3. גידול הצמחים לניסוי                |
| 22        | 4. בדיקת חיוניות האבקה כמדד לאיכותה   |
| 22        | 5. איסוף חומר צמחי                    |
| 23        | 6. בידוד אבקנים והפרדת אבקה מאבקנים   |
| 23        | 7. קטיף פירות                         |
| 23        | 8. הפקת RNA וטיפול ב - Dnase          |
| 25        | 9. סינתזת cDNA                        |
| 25        | 10. ריאקצית Semi Quantitative PCR     |

|    |                           |
|----|---------------------------|
| 26 | 11. רשימת תחלים (Primers) |
| 26 | 12. ריצוף תוצרי PCR       |
| 27 | 13. הפקת חלבון            |
| 27 | 14. אנליזת WESTERN BLOT   |

## ה. תוצאות 29

|    |   |
|----|---|
| 29 | 1. השפעות פיסיולוגיות של תנאי הגידול על הצמחים  |
|    | 2. ביטוי חלבוני עקת חום ברמת ה - RNA בעלים של צמחים צעירים בתגובה לעקת חום קצרת מועד (ניסוי דעיכה)                        |
| 32 | 3. ביטוי חלבוני עקת חום ברמת החלבון בעלים של צמחים צעירים בתגובה לעקת חום קצרת מועד (ניסוי דעיכה)                         |
| 34 | 4. ביטוי חלבוני עקת חום ברמת ה - RNA בעלים של צמחים בוגרים בתנאי חממה, המשלבים חשיפה לתנאי קור בלילה ולתנאי חום ביום      |
| 36 | 5. ביטוי חלבוני עקת חום ברמת ה - RNA באבקה של צמחים בוגרים בתנאי חממה, המשלבים חשיפה לתנאי קור בלילה ולתנאי חום ביום      |
| 40 | 6. ביטוי חלבוני עקת חום ברמת החלבון בעלים ואבקה של צמחים בוגרים בתנאי חממה, המשלבים חשיפה לתנאי קור בלילה ולתנאי חום ביום |
| 43 |   |

## ו. דיון ומסקנות 47

### ז. ביבליוגרפיה 52

### ח. נספחים 61

61 נספח א' - הרחבה לפרק "חומרים ושיטות"

67 נספח ב' - תוצאות גולמיות של ריצוף תוצרי PCR המקודדים לחע"ח

## II Summary

## א. רשימת קיצורים שכיחים וראשי תיבות

|  |
|--|
| ג"א = גרגר(י) אבקה                                   |
| חע"ח = חלבון(י) עקת חום                              |
| טמפי = טמפרטורה                                      |
| n = A - n ימים לפני אנטזיס                           |
| Ascorbate PeroXidase = APX                           |
| Chloroplast = CP                                     |
| Double Distilled Water = DDW                         |
| Dehydration - Responsive Element Binding = DREB      |
| Endoplasmic Reticulum = ER                           |
| Expressed Sequence Tags = Est                        |
| Heat Shock Cognate = Hsc                             |
| Heat Shock Factor = Hsf                              |
| Heat Shock Granules = HSG                            |
| Heat Shock Protein = Hsp                             |
| Low Molecular Weight = LMW                           |
| Mitochondria = MT                                    |
| National Center for Biotechnology Information = NCBI |
| Tentative Consensus = TC                             |
| The Institute for Genomic Research = TIGR            |

## ב. מבוא

### 1. תיאור כללי

הפלפל (*Capsicum annuum*) הוא צמח עשבוני ממשפחת הסולניים (Solanaceae). המין *Capsicum annuum* הוא לרוב חד - שנתי והוא מגיע לגובה ממוצע של מטר אחד, אך ניתן לגדל אותו גם כרב - שנתי ולהביאו לגובה רב יותר. מין זה מכיל מגוון רחב של זנים בעלי פירות חריפים או מתוקים, בשלל צבעים וצורות. פרי הפלפל הוא מרכיב חשוב במזונו של האדם. הוא נאכל טרי או מבושל, ומעובד בתעשיית המזון. מקור מיני הבר והמינים התרבותיים של הסוג *Capsicum* הוא אמריקה הדרומית והמרכזית. פירות יבשים של צמח זה נתגלו בקברים מהאלף השמיני לפנה"ס במקסיקו ומהאלף השני לפנה"ס בפרו. גידולו של הפלפל באמריקה היה נרחב והוא היווה מאכל חשוב בתפריטם של ילידי המקום. לאחר גילוי אמריקה ב - 1492 העביר קולומבוס זרעי פלפל לספרד. משם נפוץ הגידול (בסוף המאה ה - 16) לארצות אחרות ברחבי אירופה. הפלפל החריף הגיע לאירופה לפני הפלפל המתוק, ומאירופה הוא הגיע לארצות

הברית וגם לארץ. הפלפל הגיע לאפריקה, ולמזרח הרחוק דרך הודו, ע"י הפורטוגזים שהעבירו לפלפל מברזיל. בסוף המאה ה-17, הפלפל הגיע לסין.

גבעולי צמח הפלפל עגולים והוא בעל עלים תמימים. במהלך התפתחותו, הצמח מפתח גבעול יחיד בעל 8 עד 15 עלים, המסיים את צמיחתו בפרח קודקודי ראשון. מס' העלים עד להופעת הפרח הראשון, משתנה בזנים שונים, אך הוא מושפע גם ע"י הטמפ'. עם התפתחות ניצן הפרח הראשון, מסתעף קודקוד הצמיחה של הגבעול ל-2 או 3 ענפים (מין מסיים - Determinate). כל אחד מן הענפים מפתח פרח אחרי עלה אחד או שניים, ליצירת מזלג דו-קרני (dichasium). כל פרח גורם להיווצרות הסתעפויות נוספות של הגבעול, עד ליצירתו של פרח נוסף בקודקוד, וחוזר חלילה. במקרים מסוימים, צורת ההסתעפויות נוטה ל-*sympodium*. מצב זה מתרחש כאשר אחד משני הענפים בהתפצלות - בייחוד מהקומה השלישית ומעלה - אינו מתפתח (Picken et al, 1984).

המין פלפל הוא בעל 24 כרומוזומים וצמחו אינם מכילים תפרחות. הפרחים הם אנדרוגיניים (אבקנים ועליים באותו הפרח) וצבעם לבן. תהליך ההאבקה הינו עצמי בעיקר אך תיתכן האבקה זרה ע"י חרקים או באמצעות הרוח. פרי הפלפל הוא ענבה בעלת דפנות מעובות וחלל במרכז. בזנים בעלי פרי אדום, כמו זן הסליקה שעליו מתבצע מחקר זה, הכלורופיל הירוק מתפרק עם ההבשלה. צבעו האדום של הפרי נוצר עקב סינתזה של קארוטנואידים (פיגמנטים טבעיים) בכרומופלסטים. הקארוטנואידים העיקריים שאחראים לצבע בפירות פלפל אדומים הם capsorubin, capsanthin ו-cryptoxanthin (Wien, 1997). בנוסף לקארוטנואידים (פרו - ויטמין A) שתורמים לערכו התזונתי של הפלפל, הפרי עשיר גם בוויטמין C, בהשוואה לירקות אחרים, ובוויטמינים מקבוצה B ו-E.

## **2. תיאור אנטומי של הפרח**

פרח הפלפל הוא רב סימטרי (פרח נכון) והוא אנדרוגיני. הפרח בעל שחלה עילית וקוטרו בין 10 ל-20 מ"מ. הגביע בנוי מ-7 - 5 עלים ירוקים משוננים בעלי איחוי מלא או חלקי. הכותרת בנויה מ-7 - 5 עלים לבנים מאוחים. לפרח 7 - 5 אבקנים הנישאים על זירים שאורכם 3.5 - 1.8 מ"מ. לכל אבקן 2 לשכות שצבען כחול עד סגול והן נפתחות לאורכן באנטזיס (יום פתיחת הפרח).

פרח פורה מייצר 1.5 - 1 מ"ג אבקה. צורת הגרגירים היא אליפטית וקוטרם (כשהם יבשים) הוא 20 - 17  $\mu\text{m}$ . כאשר גרגירי האבקה סופחים מים הם מתנפחים ומגיעים לקוטר של 33 - 27  $\mu\text{m}$  (Quagliotti, 1979). מס' גרגירי האבקה משתנה בפרחים של זנים מסוימים אך הוא גדול מאוד: קיימים זנים שמכילים 11,000 - 18,000 גרגירי אבקה במאבקן יחיד (Picken et al, 1984).

בדומה למינים אחרים, גרגר אבקה של פלפל מורכב מתא וגטטיבי ותא גנרטיבי ובכל תא גרעין אחד. בנוסף לכך, גרגר האבקה עשיר בסוכרים. כ-4 ימים לפני האנטזיס, מתחילה ביו סינתזה של עמילן בגרגר האבקה של פלפל. כמות העמילן מקסימאלית כיומיים לפני האנטזיס אך הגרגר הבוגר משוחרר מהאבקן ללא עמילן. כמו כן, מתחילה הצטברות של סוכרוז כיומיים לפני האנטזיס, שמגיעה לשיאה באנטזיס עצמו. כיום לאחר האנטזיס נצפתה ירידה בריכוז הסוכרוז (Aloni et al, 2001).

אברי הרבייה הנקביים מורכבים משחלה בעלת 2 עד 4 מגורות שאורכה 5 - 2 מ"מ ורוחבה 1.5 - 1 מ"מ. אורך עמוד העלי הוא 6.5 - 3.5 מ"מ והצללקת היא בעלת פטמיות (papillae) ומחולקת לאונות. קוטרה גדול במקצת מזה של עמוד העלי. הצלקות בפרחי פלפל מעובות ומכוסות בנוזל צמיג, המופרש משערות



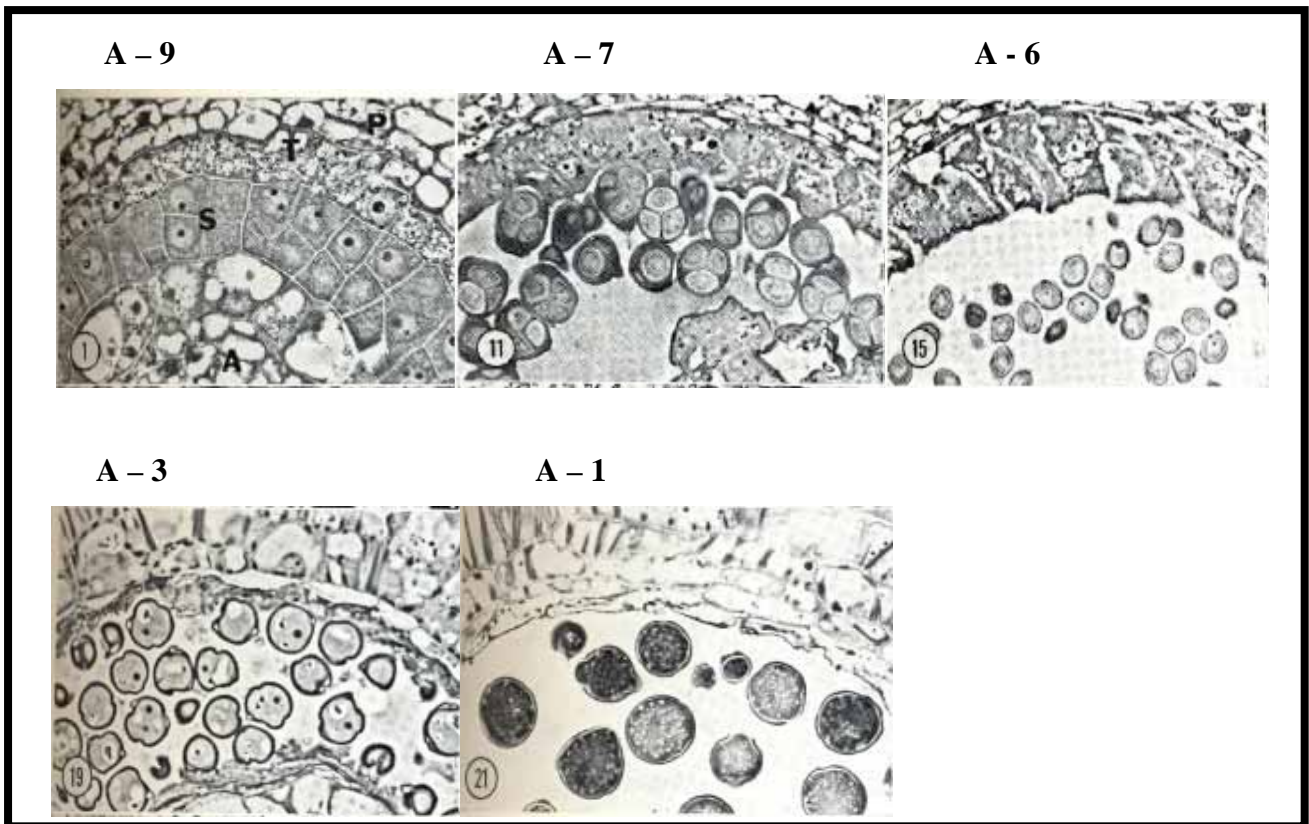
בלוטיות. הצלקות בשלות לקלוט אבקה לפני פתיחת המאבק והן יכולות לחיות במשך 4 ימים, עד להבשלת האבקה וקליטתה. מרגע הבשלתם, גרגירי האבקה יכולים לחיות במשך 48 - 24 שעות. כשהם מגיעים לצלקת הם נובטים מהר וכ- 6 שעות לאחר ההאבקה, חודרים הנחשונים לתוך השחלה. פרחי פלפל מזנים שונים הם בעלי מבנה דומה אך כמו בסולניים אחרים, יכול עמוד העלי להיות ארוך מהאבקנים, במפלס אחד איתם או קצר מהם. מבנה הפרח הוא תלוי זן והוא משפיע על מידת ההאבקה. פרחים בעלי עמוד עלי קצר, מואבקים ביתר הצלחה. גם נטיית הפרח כלפי מעלה או מטה, משפיעה על מידת ההאבקה (Quagliotti, 1979).

### **3. תהליך יצירת האבקה**

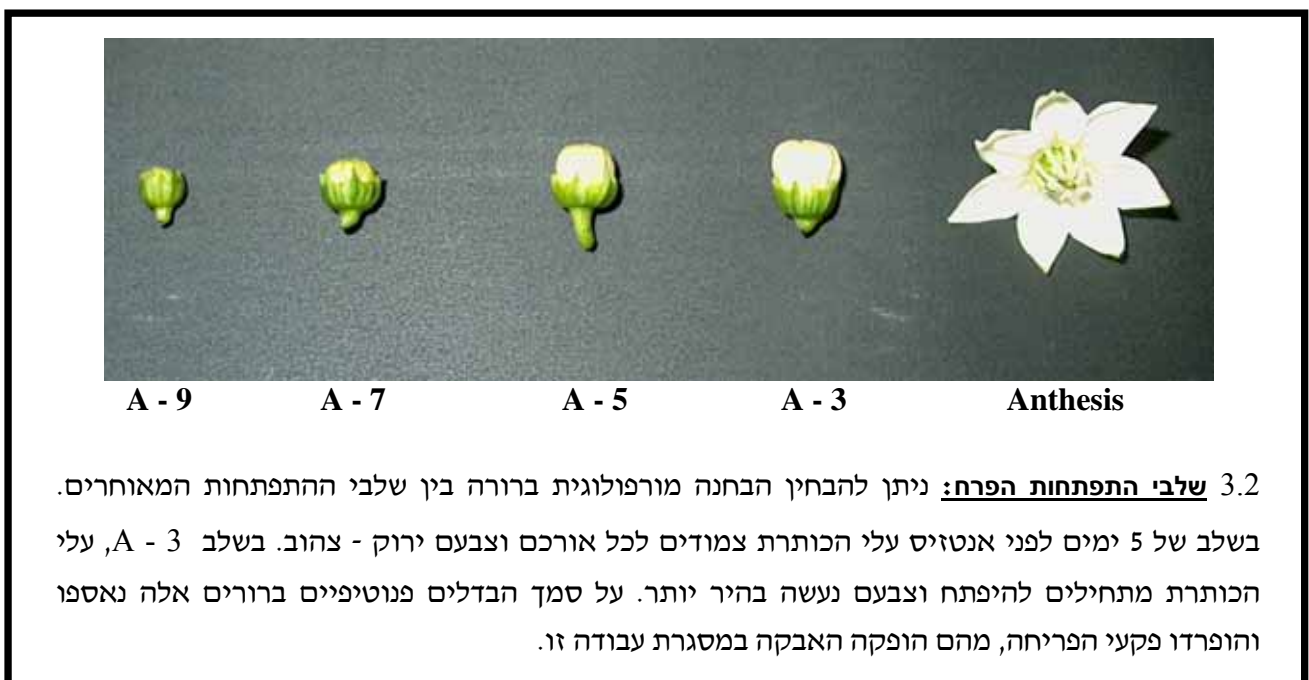
תהליך יצירת האבקה בצמח הפלפל תואר ע"י Novak & Betlach (1970) ו- Horner & Rogers (1974) ע"פ השלבים הבאים:

- (1) 9 - 10 ימים לפני אנטזיס (A - 9, A - 10): המאבקים מורכבים מאפידרמיס חד שכבתי חיצוני, 2 - 3 שכבות דופן (P) ושכבת טפטום (T) המקיפה את הרקמה הספורוגנית (S). כמו - כן ניתן לראות רקמת קונקטיב (A). הרקמה הספורוגנית בנויה משכבה אחת או שתיים של תאים. רקמה זו היא המקור למיקרוספורות שמהן יתפתחו גרגירי האבקה. היא מורכבת מתאי האם של המיקרוספורות, המשובצים בקלוז. בשלב זה, שכבת הטפטום המזינה היא חד גרעינית דיפלואידית (לקראת חלוקה) והיא מכילה וקואלות קטנות.
- (2) 7 - 8 ימים לפני אנטזיס (A - 7, A - 8): בשלב זה המאבקים גדלים, מתרחשת מיוזה וניתן לראות טטרדות מוקפות בקלוז. תאי הטפטום מכילים 2 - 3 גרעינים.
- (3) 6 ימים לפני אנטזיס (A - 6): המיקרוספורות נפרדו ורוב הקלוז התמוסס. חלק משכבות הביניים של תאי הטפטום נעלמו ותוכן התאים מתחיל לזלוג לתוך החלל שבשק המאבק.
- (4) 4 - 5 ימים לפני אנטזיס (A - 4, A - 5): במיקרוספורות (גרגירי האבקה) נוצרות וקואלות, מתחיל ריבוד של שכבת אקסינה על הדופן החיצונית והן גדלות. כמו - כן, מתחילה צבירה של עמילן בגרגירי האבקה. שכבת הטפטום ממשיכה להתפרק אך התאים הנותרים מתחילים לייצר ולאגור ספורופולנין על שטח הפנים שלהם.
- (5) 3 ימים לפני אנטזיס (A - 3): המיקרוספורות עוברות תהליך של מיטוזה והן מכילות שני תאים (גנרטיבי ווגטטיבי). ציטופלסמת המיקרוספורות עשירה בוקואלות ושכבות האקסינה והאינטינה מפותחות היטב. התנוונות הטפטום כמעט ומסתיימת וציטופלסמת התאים אינה מאורגנת עקב פירוק האורגנלות.
- (6) 1 - 2 ימים לפני אנטזיס (A - 1, A - 2): גרגירי האבקה חסרי וקואלות והם בעלי ציטופלסמה דחוסה, עשירה בעמילופלסטים. בנוסף לכך, מתחילים להיווצר פתחי נביטה. משכבת הטפטום נשארו שרידי דופן בלבד.
- (7) אנטזיס (A): גרגירי האבקה בשלים והם בעלי פתחי נביטה ברורים. לשכות המאבקים נפתחות בתפר שלאורכן וגרגירי האבקה הבוגרים נפוצים לכל עבר. לאחר האנטזיס, דפנות המאבקים יבשות ורקמות הקונקטיב גם הן מנוונות. גם לאחר האנטזיס, נותרים שרידי הדופן של הטפטום.

תמונה 3.1 - חתכים מיקרוסקופיים באבקה מתפתחת של פלפל:



תמונה 3.2 - שלבים שונים של התפתחות הפרח בפלפל:



#### 4. השפעת עקה על התפתחות אבקה

עקות אביוטיות הן גורם מאיים מרכזי על החקלאות בארץ ובעולם. הן הגורמים העיקריים להפסדי יבול בעולם, ועשויות לגרום עד 50% אובדן בעונת גידול. התחממות גלובלית ושינויים אקלימיים ההולכים ומתהווים מביאים להדגשת הצורך בגילוי, פיתוח וטיפול זנים עמידים יותר של גידולים חקלאיים מרכזיים, ובבידוד הגורמים המרכזיים המשפיעים ותורמים לעמידות הצמח. מערכות חישה ותגובה לתנאי סביבה משתנים קיימות בכל האורגניזמים בעולם החי. מערכות מורכבות במיוחד קיימות אצל צמחים, שהיותם ניחים מגבילה את היכולת הפיסית שלהם להגן על עצמם בתגובה לעקות סביבה. צמחים גם חשופים לשינויים בטמפרטורה במשך היממה, כאשר שינוי קל בזווית האור כבר גורם שינוי בעוצמת ההארה/הצללה ומחייב תגובה מתאימה, וכן הם חשופים לשינויים במשך עונות השנה. כמו כן, היות והם מורכבים מאוד מבחינה התמיינותית, לכל רקמה תגובה משתנה לעקות. לעקות שונות כגון יובש, הצפה, דישון לא יעיל, טמפרטורות גבוהות או נמוכות, חמצון והרעבה לנוטריינטים שונים, וכן נוכחות רעלנים או גורמי מחלה, השפעה ישירה על התפתחות אברי הפרח ובמיוחד האבקנים והאבקה. עקות שונות עלולות לגרום למערך נזקים דומה בתא, ולעורר הפעלת מערכות תגובה דומות. יובש לדוגמא, וכן מליחות, קור ונזקי חמצון כולם גורמים לעקה אוסמוטית ופוגעים בהומיאוסטזיס ומאזן היונים בתא, בין היתר (Wang et al, 2003). כמו כן, עקת יובש פוגעת במטבוליזם הסוכרים בגרגר האבקה ופוגעת בצבירת עמילן בגרגר, בדומה לפגיעה המתרחשת בעקבות עקת חום (Sheoran & Sainai 1996). עקב כך, בצמחים היה הכרח להתפתחות אבולוציונית של מערכות תאיות ופיסיולוגיות של הגנה לשמירת קיומם בזמני עקה. החנטה והתפתחות הפרי, בצמחים רבים, תלויים במספר רב של תהליכים: החל מפטוסינתזה ועד להתמיינות פרחים ולהאבקה. כל אחד מן הגורמים הללו עלול להיפגע בעקבות גידול צמחים בתנאים לא אופטימליים (חשיפה לתנאי עקה). העקה האביוטית נחקרת ביותר, בהקשר של התפתחות אבקה, היא חשיפה לטמפי גבוהות (עקת חום). הפגיעה באבקה מתבטאת בשתי אופנים:

#### I. ירידה במספר גרגירי האבקה לפרח:

כבר בשנת 1936, Nakamura מצא שחשיפת צמח בשמת הגינה (*Impatiens balsamina*) לטמפי גבוהות (מעל 32°C), הביאה לפגיעה בתהליך המיוזה בתאי האם של האבקה. תאי האם לא הראו רגישות לחום בשלב הפרופאזה, אך בשלבים המאוחרים יותר נצפתה רגישות גבוהה מאוד. Iwahory (1965) הראה כי בצמחי עגבנייה שגודלו בטמפי של 20°C ונחשפו לטמפי של 40°C למשך שלושה פרקי זמן, בני 3 שעות בכל פעם, נפגעה ההתפתחות הנורמאלית של ג"א. ע"פ הממצאים בניסוי זה הסיק החוקר כי החום פוגע באחד משלבי המיוזה בתאי האם של ג"א, כמו גם בשלבים המוקדמים של הבשלת המיקרוספורות. Vara Prasad et al (1999) ערכו ניסוי שבו נחשפו אגוזי אדמה (*Arachis hypogaea*) לטמפי יום/לילה גבוהות למשך פרקי זמן קצרים של מס' שעות. טיפול זה הוריד את מס' ג"א שנוצרו ב - 50% לערך, ואת מספר הגרגירים החיוניים ב - 49% - 40.

בעבר נהוג היה לחשוב שתופעה זו מושפעת בעיקר מטמפי' הלילה. בעגבניות לדוגמא, נקבעה טמפי' לילה של 26°C כטמפי' הגבולית עבור הגידול. כיום ידוע שהטמפי' הממוצעת של היממה היא קריטית יותר מאשר טמפי' הלילה. נקבע שטמפי' יממה ממוצעת של 29°C מהווה את הסף הקריטי להפחתה בכושר הנבת הפרי, גודלו ומס' הזרעים לפרי בשל הפגיעה באיכות האבקה (Peet et al, 1998).

בשנים האחרונות נחקרה השפעתן של עקות אביוטיות נוספות על התפתחות אבקה במינים שונים של צמחים. נמצא שצמחי חיטה שנחשפו לעקת יובש במהלך החלוקה המיוטית היו בעלי שחלות נורמאליות אך נפגעה בהם התפתחות האבקנים והג"א. נמצאו פחות ג"א חיים ופוריים. פוריות האבקה הושפעה יותר מחייתה בעקבות חשיפה לעקת יובש (Mohammady et al, 2006).

השפעת עקת יובש נבדקה גם על אבקה של צמחים דו פסיגיים, וכך גם השפעה של עודף מים. עצי מקדמיה הם עצים הגדלים בתנאים של לחות גבוהה בקרקע. כאשר חשפו שלושה זני מקדמיה לתנאי לחות משתנים נמצאה השפעה של משק המים בצמח על שיעורי נביטת האבקה. בתנאים אופטימאליים, אחוז הנביטה בשלושת הזנים היה מקסימאלי. כאשר התבצעה השקיה בעודף אחוז הנביטה היה נמוך יותר בהשוואה לחוסר בהשקיה. כאשר לא בוצעה השקיה כלל, אחוז נביטת גרגירי האבקה היה מינימאלי (JianFu et al, 2003).

נבדקה גם השפעה של עקת מלח על צמחי שעורה, הרגישים לעקה זו. כאשר השוו בין זנים שונים נמצא שיותר ממחציתם היו בעלי ג"א שקופים וקטנים (חסרי ציטופלסמה) בעקבות החשיפה לעקה. בנוסף לכך, זנים שהאבקה שלהם נפגעה בעקבות החשיפה לעקה, היו בעלי מס' נמוך מאוד של זרעים (Rehman et al, 2004).

בעצי אורן (*Pinus sylvestris*) נבדקה השפעתה של חשיפה למזהמים על התפתחות האבקה. נצפתה ירידה בנביטתם של ג"א מעצים שנחשפו לזיהום. כאשר הגרגירים שנחשפו לזיהום בכל זאת נבטו, נחשון הנביטה שלהם היה קצר יותר. מכאן ניתן להסיק שג"א של אורן רגישים לעקה שנובעת בעקבות חשיפה למזהמים (Tretyakova & Noskova, 2004).

## **5. מעורבות סוכרים בייצור אבקה ואיכותה**

תהליכי התפתחות והפצת גרגירי האבקה מלווים בתהליכים מטבוליים רבים התלויים בקליטה, אגירה, פירוק וניצול של סוכרים שונים.

(Clement et al (1994) שערכו מחקרים בצמחי שושן, הגדירו שני שלבים עיקריים בהתפתחות האבקה, בהקשר של שינויים בתכולת הסוכרים: שלב הגדילה שבו גרגר האבקה חסר עמילן וניתן למצוא בו חלליות רבות, ושלב ההבשלה שבו התפתחותם של האבקן ושל גרגר האבקה מואטת ובמקביל מתרחש שיא של יצירת עמילן. בשלב הראשון משפיעה אגירת העמילן על מספר גרגירי האבקה וחיוניותם, ובשלב השני על כושר הנביטה (Pacini et al, 1996).

העמילן הוא חומר התשמורת הנפוץ ביותר בגרגירי אבקה של צמחים. מתחילת יצירת גרגירי האבקה ועד גמר הבשלתם יכול העמילן להאגר פעם או פעמיים (Pacini and Franchi, 1988). במקרים בהם יש שיא

אחד של אגירת עמילן, האגירה מתרחשת לאחר המיטוזה בשלב הדו - תאי. בגרגירי אבקה בהם מתרחשים שני שיאי אגירת עמילן השיא הראשון יהיה לאחר התפרקות הטטרדות, והשני באמצע השלב הדו - תאי (Pacini, 1996). במקרים כאלו, יותר עמילן נאגר בשיא השני מאשר בראשון (Pacini and Franchi, 1988).

בניסויים שנערכו בפלפל (Aloni et al, 2001), נמצא שבגרגירי אבקה מתפתחים חלה הצטברות זמנית של עמילן יומיים לפני פתיחת הפרח (Anthesis) ואח"כ הוא מתמעט מאוד. במקביל עם הבשלת גרגר האבקה חלה גם הצטברות של סוכרים מחזרים (84% סוכרוז, 9% גלוקוז ו - 6% פרוקטוז). נמצאו תנודות בריכוז הסוכרים המחזרים במהלך התפתחות האבקה. העלייה בריכוז הסוכרים היא ככל הנראה תוצאה של פירוק העמילן שנאגר.

במהלך התפתחות גרגירי אבקה, סוכרים מסיסים שמקורם ברקמות צמח האם יכולים להיצרך מיד, לעבור פולימריזציה לעמילן ע"מ להיאגר או להתפרק עקב צרכים אנרגטיים. רמת העמילן באבקה מתפתחת עשויה להעיד על איכות האבקה הבשלה ועל מידת הפגיעה כתוצאה מחשיפה לעקת קור. (Shaked et al (2004) הראו שטמפי' נמוכה גורמת לפגיעה ניכרת בכושר החנטה של פלפלים. פגיעה זו נבעה מירידה במספר הכללי של גרגירי האבקה, בחיוניותם, ובעיקר מחוסר הנביטה שלהם. כמו כן, נמצא קשר ישיר בין רמת העמילן בגרגירי האבקה המתפתחים בשלב 4 - A לבין כושר הנביטה שלהם. התוצאות הללו מצביעות על כך שלתכולת הסוכרים באבקה מתפתחת של פלפל תפקיד חשוב בקביעת איכות האבקה.

## **6. ביטוי חע"ח כתגובה לעקה**

המנגנון המולקולארי של עמידות בפני עקות אביוטיות מבוסס על בקרת ביטוי של גנים ספציפיים הכרוכים בתגובה והגנה מפני העקה, וחיוניים להישרדות התא והאורגניזם. גנים אלו מעורבים בכל מערך התגובה לעקה הכולל לדוגמא, העברת סיגנלים, אקטיבציה של גנים שונים, הגנה על חלבונים וממבראנות ולכידת רדיקלים חופשיים או תרכובות רעילות. התגובה לעקות היא אוניברסאלית במקרים רבים, ותהליכי הולכת הסיגנל ואקטיבציה של גנים ספציפיים, משותפים לחלק מהעקות (Wang et al 2003, Kaplan et al 2004).

ככלל, מחולקת התגובה לעקות לארבע קטגוריות: גנים המעורבים בהעברת סיגנלים ובקרת שעתוק, גנים המעורבים בקליטה ומעבר של מים ויונים שונים, גנים המעורבים במסלולי היצירה של מטבוליטים שניוניים ושלישוניים הנוצרים בעקבות העקה והגנה ושמירה על ממבראנות וחלבונים בתא. חלבונים הנקראים חלבוני עקת חום (Hsp's / חע"ח) נמצאים במרכזה של מערכת התגובה לעקה בכל עולם החי, ובצמחים בפרט. אחת התגובות לתנאי סביבה שנחקרה ותועדה ביותר בצמחים היא התגובה לתנאי טמפי' גבוהה. כאשר צמחים נחשפים לחום של חמש מעלות צלזיוס או יותר, מעל לטמפרטורת האופטימום לגידול, סינתזת רוב החלבונים בתא ו - mRNA מעוכבת ברובה, ומתחיל שעתוק ותרגום של חלבוני עקת חום (Nover et al, 1984).

תגובה זו אינה ייחודית לצמחים, היא התגלתה לראשונה בדרוזופילה ותוארה גם באורגניזמים נוספים כגון חיידקי *Escherichia coli*, שמרים (*Saccharomyces cerevisia*) ובני אדם (Vierling, 1991).

כאשר משווים תגובה לעקת חום באורגניזמים שונים, ניתן לראות שהיא שמורה ברמה גבוהה בשני אופנים עיקריים: (א) המנגנון המולקולארי של אינדוקציה בחום לביטוי גנים ספציפיים דומה מאוד בין אאוקריוטים מרוחקים. (ב) חלבוני עקת החום העיקריים שמורים אף הם בהומולוגיה גבוהה בין אאוקריוטים, ובמקרים מסוימים נתגלו חלבונים הומולוגיים גם בפרוקריוטים. השימור האבולוציוני של חע"ח הוא עדות למידת החיוניות והחשיבות של התגובה (Lindquist & Craig 1988, Vierling 1991, Maestri et al 2002, Sun & MacRae 2005).

עדויות נרחבות בצמחים מצביעות על חשיבותם של חע"ח להישרדות הצמח בתנאים לא אופטימאליים. תופעה זו היא בעלת חשיבות רבה בפיתוח סבילות לחום (Thermo tolerance) של צמחים - צמחים מסוגלים לעמוד בתנאי טמפרטורה קשים שבמצב נורמאלי היו לטאליים לצמח, אם נחשפו קודם לכן לתנאי טמפרטורה גבוהה אך לא לטאלית. לפעולה ולהצטברות של חע"ח, תפקיד מפתח בהקניית סבילות לחום. דוגמא לכך היא אפיון סוגי מוטנטים בארבידופסיס, הפגועים ביצירת חע"ח ממשפחת Hsp100, הראה כי הם איבדו את היכולת לפתח סבילות לחום (Queitsch et al, 2000). חע"ח נוספים בארבידופסיס כגון Hsp70 ו-sHsp's מעורבים בפיתוח סבילות לחום. נמצא שלצורך כך, דרוש תפקוד תקין של המיטוכונדריה מכיוון שבהעדורו, מתרחשת ירידה בביטוי חע"ח, גם אם יש חשיפה לעקת חום (Rikhvanov et al, 2007).

אחת ההשפעות של עקת טמפי על התא היא שינוי קונפורמציה של חלבונים כתוצאה מפגיעת חום. בעקבות איבוד המבנה המרחבי פעילות החלבון נפגעת, ולעיתים נחשפים אזורים הידרופוביים בחלבון ועקב כך החלבונים נצמדים זה לזה ושוקעים בתא. המשותף לכל חע"ח הוא פעולתם על חלבונים שאיבדו את המבנה המרחבי התקין עקב פגיעה ע"י חום, חע"ח מונעים את השקיעה או שהם משחררים את החלבונים ששקעו ולאחר מכן הם מקפלים אותם מחדש או מכוונים אותם לדגדגציה. מספר משפחות של חע"ח הוגדרו באאוקריוטים, ובכללם צמחים. המשפחות מוגדרות לפי המשקל המולקולארי של החלבון ביחידות kDa. הסיווג כיום נעשה לפי החלוקה למשפחות הבאות: Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100 ועוד משפחה מגוונת של חלבונים בעלי משקל מולקולארי נמוך בטווח של 15 - 40 kDa הנקראים sHsp's / LMW Hsp. בנוסף לכך, החלבונים מסווגים לפי המדור בתא, בו הם מתבטאים. לכמה ממשפחות חע"ח נציגים באורגנלות שונות כגון מיטוכונדריה, כלורופלסטים וכן ב-ER ובדופן התא.

כל החלבונים הללו מתאימים להגדרה הבסיסית של חע"ח - כולם עוברים אינדוקציה בעקבות עקת חום ברוב סוגי התאים בטווח רחב מאוד של אורגניזמים. בפרוקריוטים נחקרה פעילות Hsp60, Hsp70 ו-Hsp90 ב-*E. coli* ואף דווח על חלבון מסוג sHsp בחיידק מסוג *Mycobacterium* (Vierling, 1991). היות ומידת השימור באופי התגובה לעקה ובתפקוד החלבון היא גדולה, ניתן לרוב להסיק מסקנות על פי תפקודם באורגניזם אחד, על תפקודם המשוער באורגניזמים אחרים. בניסויי in Vitro הראו את תפקיד חע"ח בייצוב, מניעת אגרציה והחזרה לפעילות של חלבונים שעברו דנטורציה (Lee et al 1995, Low et al 2000, Smykal et al 2000, Shono et al 2002). מחקרים אחרים הראו אובדן עמידות או סבילות לחום, של מוטנטים ברצף המקודד לחע"ח. מכאן ניתן להסיק על חשיבות פעילותם לקיום האורגניזם (Sanchez & Lindquist 1990, Parsell and Lindquist 1993, Queitsch et al 2000).

חשיבותם של חע"ח רבה ואינה מסתכמת רק בהגנה מפני תנאי סביבה קיצוניים וקיימים תהליכים רבים בהם משתתפים חע"ח. קיימות עדויות רבות לביטוי חע"ח גם בתנאים נורמאליים במהלך שלבים שונים של חלוקת התא ובשלבי התפתחות עוברים. בנוסף, אחדים מחלבוני התא הומולוגיים במידה מרובה לחע"ח ממשפחות שונות אולם אלו אינם מתבטאים ביתר בעקבות עקות. אותם חלבונים השייכים למשפחת חע"ח אך מתבטאים גם בהעדר עקה נקראים גם HSC = Hsp Cognate (Vierling, 1991). חע"ח אינם מתבטאים רק בעקבות עקת חום. ביטוי חע"ח תועד גם בעקבות עקות כגון קור, עקת חמצון, נוכחות מתכות כבדות, רעלים ואנאלוגים לחומצות אמיניות והרעבה לגלוקוז (Edelman et al 1988, Vierling 1991). במקרים אלו רק אחדות ממשפחות חע"ח הראו ביטוי ולא כל מערך החלבונים המתבטאים בעקבות עקת חום, בא לידי ביטוי. ניתן להסיק מכאן שחע"ח אינם חלבונים כלליים המתבטאים כתגובה לכל עקה שהיא, והספציפיות שלהם לעקות חום גבוהה. ביטוי של בני כל המשפחות בצמחים נצפה רק בעקבות עקת חום. עקות אביוטיות כגון יובש, מליחות או קור לא הביאו לביטוי בני כל המשפחות, כפי שקורה בעקבות חשיפה לעקת חום (Vierling 1991, Wang et al 2004). בני משפחת sHsp's הם חע"ח המתבטאים בעקות אביוטיות רבות בארבידופסיס. משפחה זו מגיבה בעיקר לעקת קור, מליחות, עקה אוסמוטית, חשיפה לקרינת UV, עקת חום וגם לפציעה (Swindell et al, 2007).

## **7. חלוקת חע"ח למשפחות**

### **Hsp100/Clp .א**

חלבוני Hsp100 בנויים כטבעת הקסאמרית שמורכבת משני חלקים. חלק אחד, שנמצא בחלק ה - N טרמינלי של החלבון, הוא רגולטורי והוא תלוי ATP. החלק האחר הוא בעל פעילות פרוטאוליטית והוא חותך רצפי חלבון לא פונקציונליים. החלבונים הללו ייחודיים בכך שפעילותם מתמקדת בפירוק ושחרור של חלבונים מתוך אגרגטים ששקעו בתא, ולא במניעת אגרגציה של חלבונים דנטורטיביים, אף כשהם מבוטאים ביתר. רק בנוכחות Hsp70 ו - Hsp40, יכולים חלבוני Hsp100 לגרום רה-אקטיבציה לאגרגטים חלבוניים (Glover & Lindquist 1998). בנוסף לפעילות של שחרור חלבונים מאגרגטים, חלבוני Hsp100 משחררים גם חלבונים מתוך גרנולות שנוצרות ע"י חלבוני sHsp (Lee et al. 2005). קיים גם שיתוף פעולה בין Hsp100 לחלבוני Hsp's אחרים שהם גבה מולקולאריים. בצמחים, Hsp100 יוצרים קומפלקסים עם Hsp90 ו - Hsp70 (Zhang & Guy 2005). נמצא שהחלבונים הללו הם בעלי תפקיד בהגנה על צמחים ומיקרואורגניזמים (אך לא בדרוזופילה) מפני עקת חום בעקבות חשיפה מוקדמת לחום נמוך יותר. מוטציה בהם פוגעת ביכולת לרכוש עמידות לחום בשמרים וארבידופסיס (Queitsch et al. 2000). ביטוי ביתר של חלבונים אלו באורז הפך אותו לעמיד יותר לחום (Katiyar & Grover 2003). במשפחת Hsp100, קיימים נציגים קונסטיטוטיביים ונציגים המושרים בעקבות עקת חום. נמצא שהנציגים המושרים קרובים יותר זה לזה בצמחים, חיידקים ופטריות יותר משהם קרובים לנציגים הקונסטיטוטיביים (Katiyar & Grover 2003).

חלבוני Hsp100 בחיידקים נקראים Clp והם בעלי פעילות פרוטאוליטית סלקטיבית תלויה ATP, בדומה לפרוטאוזום האוקריוטי - הם יוצרים קומפלקס בעל ליבה צרה שאליה מתאפשרת כניסה של חלבונים בלתי מקופלים בלבד (חלבונים לא תקינים) לצורך פירוק. בתאים צמחיים נדרשת פעילות פרוטאוליטית גם בכלורופלסט שמכיל כמחצית מכלל החלבונים בתא. מכיוון שהכלורופלסט חסר את מערכת הפרוטאוזום והיוביקוויטין, פירוק החלבונים שבו מתבצע באופן דומה לפרוקריוטים (Shanklin et al. 1995). המערכת הפרוקריוטית מתבססת על 2 מרכיבים: מרכיב פרוטאוליטי (ClpP) ומרכיב מבקר שהוא ATPase (ClpA בחיידקים ו- ClpC בצמחים). המרכיב המבקר יכול להכיל 2 אתרים שונים הקושרים נוקלאוטידים והוא מכיל גם אתר Zinc - Finger. המרכיב הפרוטאוליטי הוא מסוג Ser - type והוא עשיר בשיירי Ser - His - Asp. הפעילות הפרוטאוליטית מתרחשת ע"י קומפלקס גדול שמתבסס על המרכיבים הללו (Adam et al. 2001). הקומפלקס בנוי מ- 2 טבעות הקסאמריות של A ו- 2 טבעות הפטאמריות של P. חלבוני A בוחרים פוליפפטידים בעלי קיפול לא תקין שמיועדים לפירוק ומעבירים אותם לליבה הפרוטאוליטית של הקומפלקס, שם מתרחש הפירוק ע"י P (Zheng et al. 2002). קומפלקס של P בלבד יכול לפרק פפטידים קצרים ונוכחותו של A דרושה לצורך שבירת חלבונים שלמים. הוצע שכמות היחידות המבקרות בתא תקבע את רמות הפרוטאז הפעיל בתא (Nakabayashi et al. 1999).

ClpC ו- P מתבטאים באופן קונסטיטוטיבי בכלורופלסט (נמצאים בסטרומה) וניתן למצוא אותם בכל הרקמות, ללא תלות בתנאי הסביבה (Zheng et al. 2002).

נומנקלטורה של Clp ומיקומם באורגנלות (Adam et al. 2001):

ClpA - D: נציגים אלו מכילים 2 אתרים לקישור ATP והם שונים זה מזה במרחק שבין האתרים. כולם ממוקמים בכלורופלסט למעט B שנמצא בציטוזול (Hsp101), שעובר אינדוקציה בחום, שייך למשפחה זו).

ClpP1 - P6: נציגים פרוטאוליטיים (מסוג סרין פרוטאזות) אלו מקודדים ע"י הגנום הגרעיני למעט P1 שמקודד ע"י הגנום הכלורופלסטי. נמצא שגן זה אינו חיוני לחיות התא (Cahoon et al, 2003). הנציגים הללו פועלים בכלורופלסט למעט P2 שפועל במיטוכונדריה.

## **Hsp90 ב.**

חברי משפחה זו נפוצים בתא ומהווים 1%-2% מכלל החלבונים בתא. החלבונים הללו יחסית שמורים וקיים דמיון של 63%-71% בחומצות האמינו שלהם בצמחים, בע"ח ושמרים. הם דורשים ATP לצורך פעילותם והם פועלים במנגנון מולטי צ'אפרוני ביחד עם חלבוני Hsp70, חלבון Hop וקו-צ'אפרונים נוספים. Hsp70 נקשר לחלבון פגום ומעביר אותו לחלבון Hsp90 בעזרת החלבון המתווך Hop (Wang et al. 2004). שמו של Hop נגזר מיכולתו לתאם בין חלבוני Hsp90 ו- Hsp70 ולקרבתם זה אל זה תוך כדי קישור בו זמנית אל שניהם. חלבון Hop נקשר אל שני החלבונים כשהם נמצאים בקונפורמציה קושרת ADP. הקישור של Hop ל- Hsp70 מתבצע דרך הקצה האמיני של Hop באתר בעל רצפים חוזרניים שנקרא TPR. הקישור של Hop ל- Hsp90 מתבצע דרך אתר TPR שממוקם במרכזו של חלבון Hop. לאחרונה התגלה שהחלבון Hop מבקר את פעילות ה- ATPase של Hsp90 ושהוא יכול לעכבה לחלוטין (Zhang et al, 2003).



לאחר העברת החלבון הפגום מ - Hsp70 ל - Hsp90 דרך Hop, חלבון Hsp90 נפרד מחלבוני Hop ו - Hsp70 ומתאפשר קיפול תקין של החלבונים (Wang et al, 2004).

עיקר תפקידם של חלבוני Hsp90 הוא בקיפול חלבונים אך הם נבדלים מיתר המשפחות בכך שהם משתתפים בהעברת סיגנלים בתא. בנוסף לכך, הם מסייעים בפירוק חלבונים ע"י בקרה על בנייה ותחזוקה של הפרוטאזום. אלו הם חלבונים קונסטיטוטיביים אך בארבידופסיס נמצא שכמותם בתא עולה בתגובה לתנאי עקה שונים (Wang et al, 2004). הפחתת כמות החלבונים בדרוזופילה (Rutherford & Lindquist, 1998) וארבידופסיס (Queitsch et al, 2002) פגעה בהתפתחות וגרמה לשינויים מורפולוגיים ממצאים אלו משערים כי החלבונים הללו מדכאים בתנאים נורמאליים ביטוי של חלבונים מורפולוגיים והתפתחותיים שעברו מוטציה אך בתנאי עקה המצב שונה. בתנאי עקה אתרי המטרה של חלבוני Hsp90 משתנים ע"מ לאפשר את קיומו התא וכתוצאה מכך נחשפות המוטציות המורפולוגיות וההתפתחותיות שעברו עיכוב בתנאים נורמאליים.

נומנקלטורה של חלבוני Hsp90 - כפי שכבר אמרנו, חלבוני Hsp90 קיימים בצמחים, בע"ח ושמרים. בפרוקריוטים קיימים הומולוגים שנקראים HTPG ובארכיאה אין חלבונים דמויי Hsp90 כלל. מ - HTPG נוצרו בנפרד בשלב מוקדם באבולוציה חלבוני Hsp90 אורגנליים: TRAP המיטוכונדריאלי ו - Hsp90B שנמצא ב - ER. Hsp90B נקרא גם Grp94 והוא לא קיים בפטריות. מ - Hsp90B נוצרו Hsp90C הכלורופלסטי ו - Hsp90A הציטוזולי. באאוקריוטים נמצא שכל חלבוני ה - Hsp90 האורגנליים השונים מקודדים ע"י הגנום הגרעיני (Chen et al, 2006).

### **ג. Hsp70**

משפחה זו היא אחת המשפחות הנחקרות ביותר וחבריה מצויים כמעט בכל מדורי התא. חבריה הם בעלי התפקודים הבאים: מניעה של הצטברות חלבונים וסיוע בקיפול תקין של חלבונים לא פעילים הן בתנאים נורמאליים והן בתנאי עקה והעברת חלבונים בין מדורי התא ובין תאים דרך הפלסמודסמה (Sung et al, 2001). בדומה לכל משפחות הע"ח, גם נציגים ממשפחה זו עוברים אינדוקציה בעקבות חשיפה לטמפי גבוהות אך לאחרונה נצפתה אינדוקציה שלהם בטחב, גם בעקבות חשיפה למתכות כבדות (Sergio et al, 2007).

חברי המשפחה מאפשרים קיפול תקין של חלבונים בשלב מוקדם של הסינתזה שלהם. הידרוליזה של ATP גורמת להצמדת חלבוני Hsp70 אל חלבון שמסונתז בריבזום ויש צורך לקפלו באופן תקין. חלבוני Hsp70 מסייעים בקיפולו של החלבון שנוצר ויש לשחרר אותם ממנו בתום תהליך הקיפול. זה מתאפשר ע"י מעבר של Hsp70 למצב קושר ADP. במצב זה, המשיכה שלהם אל החלבון המקופל פוחתת והם משתחררים ממנו.

קיימים חלבוני Hsp70 שמבוטאים באופן קונסטיטוטיבי ונקראים Hsc70. הם מסייעים בקיפול חלבונים בזמן הסינתזה שלהם ואחראים על טרנסלוקציה של חלבונים פרקורסוריים. בנוסף לכך, הם מזהים פרקורסורים שמגיעים מהסטרומה או מהמטריקס ומאפשרים חיתוך של ה - signal peptide ע"י פפטידאז. חיתוך זה מאפשר טרנסלוקציה של חלבונים לא מקופלים מהמיטוכונדריה והכלורופלסט אל הציטוזול. חלבוני Hsp70 מאפשרים גם טרנסלוקציה הפוכה של חלבונים מהציטוזול אל המיטוכונדריה

בעזרת הקומפלקס TOM שנמצא בממברנה החיצונית של המיטוכונדריה ובעזרת TIM שנמצא בממברנה הפנימית (Wang et al. 2004).

בדומה למעבר חלבונים מן הציטוזול אל המיטוכונדריה, קיים מעבר מן הציטוזול אל הכלורופלסט. מעבר זה מתווך ע"י Hsp70 כלורופלסטי וע"י קומפלקסים ע"פ הממברנה החיצונית (TOC) והפנימית (TIC) של האורגנלה.

מכיוון ש - Hsp70 הוא בעל חשיבות רבה במעבר חלבונים מן הציטוזול אל תוך הכלורופלסט והמיטוכונדריה, נבדקה המשיכה שלו לחלבונים מיטוכונדריאליים וכלורופלסטיים. מרבית החלבונים הללו מסונתזים בציטוזול ומזוהים כמיטוכונדריאליים/כלורופלסטיים ע"י תוספת בקצה האמיני שלהם. נמצא כי 97% מן החלבונים המיטוכונדריאליים מכילים אתר קישור ל - Hsp70 ו - 82.5% מן החלבונים הכלורופלסטיים מכילים אתר קישור כזה (Zhang & Glaser. 2002).

**מבנה** - חלבוני Hsp70 מכילים קצוות קרבוקסילי ואמיני שמורים. הקצה האמיני מכיל אתר בעל פעילות של ATPase ומשקלו 44kDa. הקצה הקרבוקסילי מכיל אתר קושר חלבונים ומשקלו 25kDa. פעילות הקישור והפירוק של ATP דורשת את נוכחותם של Hsp70 co-chaperons כגון DnaJ/Hsp40 ו - GrpE. משפחת Hsp70 היא המשפחה השמורה ביותר וקיימת זהות של 50% בחומצות האמיניות בין Hsp70 אאוקריוטי לבין ההומולוג הפרוקריוטי ב - E. Coli : **DnaK** (Wang et al. 2004).

#### **Hsp60/chaperonins** 4.

חברי משפחה זו מסייעים בקיפול חלבונים בזמן הטראנסלוקציה והסינתזה והוצע שהם פועלים בשיתוף עם חלבוני Hsp100 ו - Hsp70 בקיפול מחודש של חלבונים שנפגעו ויצרו אגרגטים. עיקר תפקידם של חלבוני Hsp60 הוא בקיפול תת יחידות של קומפלקסים לצורה הנאטיבית שלהן, ע"מ שיוכלו לתפקד בתא באופן מלא (Wang et al, 2004).

חלבוני Hsp60 מתחלקים לשתי קבוצות. קבוצה אחת היא של נציגים פרוקריוטיים, מיטוכונדריאליים וכלורופלסטיים (**chaperonins**). אל הקבוצה השנייה (**Hsp60**) משתייכים חברי משפחה שנמצאים בציטוזול האאוקריוטי ובארכיאה (Wang et al, 2004).

כמו כל חלבוני Hsp, גם במשפחה זו קיימים נציגים קונסטטוטטיביים ונציגים שעוברים אינדוקציה בחום כגון GroEL הפרוקריוטי (Walkley et al, 1996). באופן כללי, נציגים פרוקריוטיים של המשפחה נקראים Cpn60 והם פועלים ביחד עם קו - ציפרונים שנקראים Cpn10. פעילות הציפרונים הללו תלויה בפירוק ATP והם בנויים כצמד של טבעות זהות או דומות מאוד שחופפות זו לזו ליצירת מבנה דמוי חבית (Wang et al, 2004).

בניגוד לנציגים הפרוקריוטיים, הנציגים המיטוכונדריאליים בתאי יונקים בנויים מטבעת יחידה. המכנה המשותף בין הנציגים הפרוקריוטיים והמיטוכונדריאליים הוא שיתוף פעולה עם צ'אפרון נלווה שגודלו 10kDa (Perezgasga et al, 1999). בכלורופלסטים מתבצע שיתוף פעולה בין Hsp60 לצ'אפרון נלווה, הכפול בגודלו מזה שבמיטוכונדריה ופרוקריוטים. יוצא מן הכלל הוא הציפרון הנלווה מסוג Cpn10, שמקודד ע"י גנום הארבידופסיס (Wang et al, 2004).

חלבוני Hsp60 מיטוכונדריאליים נבדקו גם בצמחים כגון תירס וארבידופסיס ונמצא שהם מתבטאים בעקת חום ובנביטת זרעים. נמצא שבגנום הארבידופסיס קיים גן גרעיני יחיד המקודד ל - Hsp60 מיטוכונדריאלי. בצמח התירס Hsp60 המיטוכונדריאלי עוזר בקיפולה של תת יחידה המהווה חלק ממערכת הולכת האלקטרונים, ולכן הוא חשוב בביוגנזה של המיטוכונדריה שמתרחשת בשלבים המוקדמים של נביטת הזרע (Prasad & Stewart, 1992). לאחרונה הוצע לנציגי תת משפחה זו, תפקיד באפופטוזיס, בעקבות חשיפה לעקה חמורה ולהעדר תפקוד המיטוכונדריה (Rikhvanov et al, 2007). חברי תת המשפחה הכלורופלסטיים נחלקים ל - 2 תת יחידות שקיים ביניהן דמיון של 50% בחומצות האמינו. האחת היא מסוג Cpn60 $\alpha$  והשנייה היא מסוג Cpn60 $\beta$  (Ishikawa et al, 2003). קיימים מוטנטים של תת היחידות הכלורופלסטיות  $\alpha$  ו -  $\beta$  בארבידופסיס וטבק. מוטציית antisense ל -  $\beta$  בטבק גורמת לשינויים דרסטיים בפנוטיפ כגון גידול איטי ועיכוב בפריחה. מוטצייה נוספת שנוצרה בארבידופסיס ע"י החדרת T-DNA לגן המקודד לתת יחידה  $\alpha$ , פוגעת בשלבים הראשונים של ההתפתחות העוברית. כמו כן, נפגעת התפתחות הכלורופלסטים, והעוברים נותרים לבנים גם בשלבי התפתחותם המאוחרים בהשוואה לעוברים נורמאליים (Apuya et al, 2001). בציטוזול האאוקריוטי ובארכיאה, חברי המשפחה יוצרים קומפלקסים שגודלם 900kDa. כל קומפלקס בנוי מ - 8 או 9 טבעות והן נקראות ע"ש האותיות היווניות ( $\alpha$  -  $\iota$ ). תת היחידה  $\alpha$  היא הראשונה שזוהתה והיא נקראת TCP-1 (T complex polypeptide 1). מכיוון שתת יחידה זו היא חלק מן הקומפלקס, הוא נקרא TRiC (TCP-1 ring complex) או CCT (chaperonin containing TCP-1). נהוג לכנות את כל תת משפחת Hsp60 הציטוזולית TCP-1, ע"ש תת יחידה זו (Walkley et al, 1996). כל חברי המשפחה הם בעלי מבנה ותפקיד דומים ותת המשפחות נבדלות בגודל הסופי של הקומפלקס שנוצר. הקומפלקס שנוצר הוא בעל מבנה דו טבעתי דמוי חבית שבחלקו העליון (טבעת ציס) נוצר מגע עם צ'אפרון נלווה ומתרחשת הידרוליזה של ATP. ה - ATP משפיע על קונפורמציה החבית ומאפשר את קיפול הסובסטרט החלבוני בחלל שבמרכז. הצ'אפרון הנלווה מונע את יציאת הסובסטרט. בתחתית (טבעת טרנס) נמצא אתר קישור נוסף ל - ATP, המאפשר את ניתוק הצ'אפרון הנלווה, לצורך שחרור הסובסטרט (Perezgasga et al, 1999).

### ה. sHsp's

חלבוני sHsp's הם בעלי משקל מולקולרי נמוך (12kDa-40kDa) והם מגוונים מאוד בצמחים מבחינת תפקוד, רצף ומיקום בתא (ככל הנראה עקב קיומם של מצבי עקה מיוחדים לצמחים). בצמחים, משפחה זו מחולקת ל - 6 תת משפחות שנבדלות זו מזו ברצף, בתפקיד ובמיקום בתא (Wang et al, 2004). הם אופיינו גם באאוקריוטים אחרים כגון דרוזפילה, שמרים ואדם ונמצא שרק בצמחים קיים מגוון רחב מאוד שלהם.

כל חברי המשפחה מקודדים ע"י הגנום הגרעיני והם מכילים אתר מסוג  $\alpha$  crystalline domain (ACD) בן 90 ח.א בקצה ה - C טרמינלי שלהם. אתר זה מאפיין חלבון שמצוי בעדשת העין של חולייתנים. את האתר ניתן לחלק לשני אזורים (I ו - II) שביניהם יש אזור הידרופילי שאורכו משתנה. אזור I, שנמצא בקצה

ה - N טרמינלי של אתר ה - ACD, הוא בן 27 ח.א והוא מכיל את הרצף השמור Pro-X<sub>14</sub>-Gly-Val-Leu .  
אזור II הוא בן 29 ח.א והוא מכיל את הרצף השמור Pro-X<sub>14</sub>-X/Val/Leu/Ile-Val/Ile ( Wobus et al, 2002).

יחסית לחלבוני Hsp's אחרים שעוברים אינדוקציה בחום, החלבונים הללו מתבטאים בכמות הגדולה ביותר. רובם המכריע אינו מתבטא ברקמות וגטיביות בתנאים נורמאליים אך כשבדקו את כמותם בעלים שנחשפו לחום נמצא שהם היוו כ - 1% מן החלבונים המסיסים בציטוזול וכ - 0.02% מכלל החלבונים המסיסים בכלורופלסט. כשהחלבונים הללו מסונתזים בתא בעקבות חשיפה לעקה, הם נותרים בו זמן רב (חלבונים יחסית יציבים) מכיוון שזמן מחצית החיים שלהם נע בין 30 ל - 50 שעות. עובדה זו יכולה לרמז על חשיבותם גם בהתאוששות התאים לאחר חשיפה לעקות שונות (Wobus et al, 2002).  
על אף היותם חלבוני עקה, נציגים ממשפחה זו מתבטאים גם במהלך התפתחות עוברית, נביטת זרעים, התפתחות אבקה והבשלת פרי (Sun et al, 2002). בנוסף לכך, נמצא שהם נוכחים גם באברי אגירה כגון פקעות (Wobus et al, 2002).

כפי שכבר אמרנו, ניתן לחלק את המשפחה לתת משפחות ואלו נבדלות זו מזו בקצה האמיני שלהן. קיים דמיון רב בין חלבונים מצמחים שונים, כאשר מדובר בחלבונים מאותה תת משפחה. חלבונים מתת משפחות שונות באותו צמח הם בעלי דמיון הרבה יותר נמוך (Sun et al, 2002).  
חשוב לציין שקיומן של תת משפחות של sHsp's באורגנלות הוא ייחודי לצמחים. יוצא מן הכלל הוא Hsp22 מיטוכונדריאלי שהתגלה בדרוזופילה (Sun et al, 2002).  
כעת נתאר את תת המשפחות השונות של חלבוני ה - sHsp's :

#### sHsp's ציטופלסמטיים :

**Class I :** לחברי המשפחה הללו רצף שמור של חומצות אמיניות 107-120 שנמצאות בקצה האמיני (Wobus et al, 2002).

**Class II :** לחברי המשפחה הללו רצף שמור של חומצות אמיניות 143-154 שנמצאות בקצה האמיני. משערים כי תת המשפחות I ו - II התפצלו ממשפחה אחת לפני 400 מיליון שנים (Wobus et al, 2002).  
נמצא שנציגים מתת משפחות אלו פועלים כצ'אפרונים מולקולאריים *in vivo*. הם אינם מקפלים חלבונים שנפגעו, אלא מונעים יצירה של אגרגטים ע"י חלבונים לא נאיביים שקיפולם לא תקין (Low et al, 2000).

נמצא שעלייה או ירידה ברמות הביטוי שלהם משפיעות על עמידות הצמח לעקת חום. גזר טרנסגני שביטא ביתר sHsp Class I היה בעל עמידות גבוהה יותר לחום. לחילופין, ביטוי מופחת של החלבון בגזר, הביא לעמידות נמוכה יותר לחום בצמח הטרנסגני (Malik et al, 1999).

### sHsp's כלורופלסטיים :

חברי תת משפחה זו נמצאים בכלורופלסט והם בעלי מבנה ייחודי. באתר ה-ACD שלהם קיים אזור III בנוסף לאזורים I ו-II שנמצאים בכל ה-Hsp's. אזור זה עשיר במתיונין והוא בעל מבנה של  $\alpha$ -helix (Lee et al, 1998). עקה חמצונית או חום גורמים לחמצון של הגופרית על שיירי המתיונין שב- $\alpha$ -helix ובכך מביאים לשינוי קונפורמציה של החלבון (Sun et al, 2002).

תפקידה של תת משפחה זו הוא לשמור על שרשרת העברת האלקטרונים תקינה ב-PSII. נציג הקבוצה, 22-Ku, נמצא בחלל התילקואיד של הצמח *Chenopodium album* ומגן על הקומפלקס שיוצר חמצן ב-PSII. נמצא שחלבון זה אינו יכול לתקן נזק שנגרם לקומפלקס אם הוא עבר דה-נטורציה (Sun et al, 2002).

בנוסף לכך, נמצא שחברי תת המשפחה מקנים סבילות לחום. ואריאנטים עמידים לחום של העשב *Agrostis stolonifera* היו בעלי sHsp כלורופלסטי שנקרא sHsp26.2. ואריאנטים רגישים לחום הכילו חלבון בעל מוטציה נקודתית שהביאה ליצירת stop codon (Wang et al, 2004).

ייתכן שחברי תת המשפחה מעורבים גם בתהליכים התפתחותיים. בעגבנייה בודד הגן pTOM111 שמתבטא במהלך הבשלת הפרי ועובר אינדוקציה בחום בעלים, פרחים ופירות. גן זה מקודד לתוצר בן 30kDa ולאחר המעבר לכלורופלסט התוצר עובר חיתוך לתוצר סופי שגודלו 24kDa (Lawrence et al, 1997). ככל הנראה, חלבון זה משמש בהגנה מפני עקת חמצון. בחשיפה לעקת טמפרטורה בלבד, לא נצפתה הצטברות משמעותית של החלבון בצמחים טרנסגניים אך הוא עבר אינדוקציה משמעותית בחשיפה לקור ולאור גבוה, שגורמים ליצירת רדיקלים חופשיים ועקה חמצונית (Neta sharer et al, 2005). היות והחלבון מצטבר בפלסטידות, מקום יצירת הליקופן ויתר הקרוטנואידים בעת הבשלת הפרי, ייתכן שהוא מעורב בתהליך הביוסינתזה ע"י אקטיבציה או הגנה על אנזימים המשתתפים בתהליך.

### sHsp's מיטוכונדריאליים :

בדומה ל-sHsp's אחרים, הנציגים המיטוכונדריאליים הם בעלי פעילות צ'אפרונית ונמצא שהם מקנים סבילות לחום. sHsp מיטוכונדריאלי רקומביננטי שבודד מעגבנייה אפשר רה - נטורציה של ציטראט סינתאז שעבר דנטורציה כימית (Liu & Shono, 1999). החדרת הגן שמקודד לחלבון זה לטבק, הפכה את הצמחים הטרנסגניים לעמידים לחום (Sanmiya et al, 2004).

לחברי תת משפחה זו יש תפקידים נוספים כגון הגנה על קומפלקסי העברת האלקטרונים. בתירס נמצא שהחלבונים הללו משפרים שרשרת העברת האלקטרונים ע"י הגנה על חלבונים בקומפלקס I בעקת מליחות אך הם נכשלו בהגנה על חלבונים מקומפלקס II (Wang et al, 2004). בנוסף לכך, נציגים אלו יכולים להגן על התא מפני אפופטוזיס עקב נזקי חמצון. נציג הקבוצה, Hsp27, מחזיר אל המיטוכונדריה ציטוכרום C שיצא ממנה עקב העקה החמצונית בעזרת אקטין (Sun et al, 2002).

הגנים המקודדים לחברי תת משפחה זו מתבטאים ככל הנראה עקב נוכחות של Reactive Oxygene Species (בעיקר  $H_2O_2$ ) ושל חלבונים פגומים. אלו החע"ח העיקריים שמתבטאים בעקבות עקה חמצונית או נזקי פגיעת קרני גאמא (Banzet et al, 1998). חלבונים אלו מתבטאים גם בחום ורמות הביטוי שלהם

יותר גבוהות מאלו של חלבוני חע"ח גבה מולקולריים אחרים כגון Hsp60 או Hsp70 (Shono et al, 2002).

לחלבוני sHsp's מיטוכונדריאליים יש מאפיינים ייחודיים. בעבר חשבו שבצמחים, בשונה מבע"ח, חלבוני sHsp's אינם עוברים פוספורילציה. Hsp22 מתירס, היה הנציג הצמחי הראשון שנמצא כעובר פוספורילציה מבין כל ה - sHsp's הצמחיים. בנוסף לכך, נציג זה הוא הראשון מבין חברי המשפחה הצמחיים, שנמצא בעל אינטרון שעובר שחבור אלטרנטיבי (Lund et al, 2001).

#### מנגנון הפעולה של sHsp's:

לצורך פעולתם, חלבונים אלו יוצרים קומפלקסים שנקראים HSG's (heat stress granules) ממסי' תת יחידות ושגודלם יכול להגיע נע בין 1 ל - 2MDa. בשלב הראשון נוצרים הומודימרים מתת יחידות זהות דרך אתרי ה - ACD. לאחר מכן, נוצרים dodecamers (טרימרים של דימרים) בעלי מבנה טבעתי. נמצא שלצורך יצירת הטבעות דרושים הקצה ה - N טרמינלי ואתרי ה - ACD שבקצה ה - C טרמינלי. בסופו של דבר, מן הטבעות נוצרים מבני ה - HSG's (Wobus et al, 2002).

בציטופלסמה, HSG's בנויים מנציגים מתת המשפחות I ו - II, ו - Hsp70. בתחילה, חלבונים מתת המשפחה II יוצרים dodecamers ורק לאחר מכן נציגים ממת המשפחה I מצטרפים לבניית גרנולות ה - HSG's (Sun et al, 2002). הגרנולות שנוצרות, יכולות להגיע לקוטר של 40nm והן נוצרות בעת חשיפה ממושכת לחום וביחס ישר להצטברות חלבונים דנטורטיביים בתא (Low et al, 2000). גרנולות כאלו זוהו במיני צמחים שונים וברקמות שונות כגון אבקה ואף בעוברים. המבנים הכדוריים הללו קושרים מסביבם חלבונים שעברו דנטורציה ע"מ למנוע יצירה של אגרגטים. כתוצאה מכך, נוצר קומפלקס יציב של חלבונים ותת יחידות של sHsp's. ע"מ לשחרר את החלבונים הפגומים יש צורך בהידרוליזה של ATP. בשחרור החלבונים מעורב גם Hsp100 שעובר אינטראקציות עם הגרנולות ומסייע לשחרור חלבונים מתוכם ע"מ שיעברו רה - אקטיבציה ע"י צ'אפרונים אחרים. השחרור גורר בעקבותיו קיפול תקין של החלבונים הדנטורטיביים ע"י חלבוני Hsp70 שמלווים בקו - צ'אפרון Hsp40 (Smykal et al, 2000). ההסבר המקובל ליצירת הגרנולות הוא שכאשר עקת החום נמשכת זמן רב, חלבוני Hsp70 ו - Hsp40 לא מסוגלים לקפל את כל החלבונים שעברו דנטורציה עקב עומס על המערכת. כתוצאה מכך, חלבוני sHsp's יוצרים את גרנולות ה - HSG's עם חלבונים שעברו דנטורציה (Sun et al, 2002). ככל הנראה, האינטראקציות בין גרנולות ה - sHsp's והחלבונים הדנטורטיביים הן הידרופוביות (Wang et al, 2004). נמצא שנוכחותם של חלבוני sHsp's בזמן העקה חיונית למניעת אגרגטים. כשהחלבונים הללו הוספו למערכת לאחר היווצרותם של האגרגטים, האגרגטים לא התפרקו ולא ניתן היה לשחרר מהם חלבונים פגועים לצורך רה - אקטיבציה (Lee et al, 1995). בנוסף לכך, נבדקה השפעת Hsp70 על יצירת האגרגטים. החלבון sHsp18.1 שבודד מאפונה, נקשר לחלבון שעבר דנטורציה, מנע אגרגציה שלו ובסיוע של Hsp70, הביא לקיפולו מחדש והחזיר אותו לפעילות. ללא Hsp70 לא נצפתה חזרת החלבון לפעילות אך sHsp18.1 היה יעיל יותר במניעת האגרגציה. בנוכחות Hsp70 בלבד, רק פחות משליש הכמות של החלבון שעבר דנטורציה, חזר לפעילות. האינטראקציה בין sHsp ו - Hsp70 אינה ישירה ואינה כרוכה

בהכרת רצפים מכיוון שהחלפת Hsp70 בהומולוג פרוקריוטי, הביאה לתוצאות דומות ( Lee & Vierling, 2000).

כאשר גרמו לאובדן הפעילות של sHsp's, נמנעה יצירת הגרנולות ונגרם מוות של תאים בטמפרטורה לא לטאלית, בהשוואה לצמחי ביקורת. אובדן הפעילות התרחש ע"י ביטוי של נוגדנים ספציפיים כנגד sHsp's בצמחים טרנסגניים. ה - sHsp's היו מסוגלים לקשור חלבונים דנטורטיביים ולהביא אותם לקיפול ע"י צ'אפרונים אחרים בנוכחות הנוגדנים ורק יצירת הגרנולות נמנעה. מות התאים לאחר חשיפה לטמפרטורה לא לטאלית מעיד על החשיבות הרבה של יצירת Hsp's להישרדות התא ( Miroshnichenko et al, 2005).

ככל הנראה, פעילות ה - sHsp's מבוקרת ומתוזמנת בהתאם לרמת ה - ATP בתא, וקישור ל - sHsp's. בזמן עקה, יורדת רמת ה - ATP הזמין לתא בשל פעילות מוגברת ודרישה גבוהה של התא. כאשר עולה רמת ה - ATP בתא בזמן ההתאוששות שלאחר העקה, הוא נקשר ל - sHsp's שקשורים לחלבונים דנטורטיביים. כתוצאה מכך, החלבונים הדנטורטיביים משתחררים מן ה - sHsp's והופכים לזמינים לדגרציה או קיפול מחדש (Smykal et al, 2000).

## **8. ביטוי חלבוני עקת חום באבקה מתפתחת**

בתהליך התפתחות האבקה מעורבות שתי קבוצות עיקריות של גנים. הקבוצה הראשונה היא קבוצת הגנים המוקדמים, שמאוקטבים בתאים זמן קצר לאחר המיזוג, ושיא ביטויים הוא בסמוך למיטוזה ופוסק מיד לאחר מכן. הקבוצה השנייה היא קבוצת הגנים המאוחרים, שעוברים אקטיבציה לאחר המיטוזה הראשונה ותוצרי הביטוי שלהם מצטברים במהלך הבשלת האבקה (Mascarenhas & Crone, 1996). בתירס (*Zea mays*) נמצא ביטוי של חצי ממשפחת sHsp's Class II בשלב הביטוי של הגנים המוקדמים, ללא חשיפה לעקה. המסקנה היא שביטוי הגן כרוך בסינגל התפתחותי ואינו קשור לעקה מכל סוג שהוא. רמת הביטוי ירדה מאוד בשלב הדו גרעיני, ובאבקה בשלה רמת הביטוי הייתה אפסית ( Atkinson et al, 1993).

בטבק (*Nicotiana tabacum L.*) נבדק ביטוי של sHsp's ממשפחות Class I ו - II. חלק מן הגנים התבטאו בשלבים המוקדמים ורמתם ירדה משמעותית לקראת השלב הדו - תאי. חלקם עברו אינדוקציה רק בשלבים המאוחרים והצטברו בתא לקראת ההבשלה. לגבי שלושה מהם, נצפתה תבנית ברורה של ביטוי רק בשלב מוגדר בתהליך התפתחות האבקה. רובם עברו אינדוקציה בעקבות חשיפה לחום, אך התגובה הייתה נמוכה בסדרי גודל של 3% - 95% בהשוואה לעלים שעברו טיפול דומה (Volkov et al, 2005). באבקה של תירס נבדק ביטוי של נציגים ממשפחות sHsp's, Hsp60 ו - Hsp70, בשלב שלפני המיזוג. בעקבות חשיפה לחום, הייתה עלייה מסוימת ברמת הביטוי של sHsp's ו - Hsp70 אך כמות החלבונים בתא לא השתנתה באופן משמעותי (Magnard et al, 1996).

הביטוי של Hsp70 נבדק גם באבקה מתפתחת של עגבנייה באמצעות In situ Hybridization. התעתיק נמצא באבקנים בגודל של 5 - 6 mm (A - 8) בתאי הספורנגיוס, בתאי הטפטום הסמוכים ובאנדוטציום עד לאפידרמיס של האבקן. כמו כן סומן Hsp70 בפלואם שבצינורות האבקן ובעלי כותרת מתפתחים.

באבקנים בגודל 10 mm (4 - A), Hsp70 סומן במיקרוספורות ובטפטום אבל לא נמצא באנדוטציום ובאפידרמיס. בשלבים מאוחרים יותר של התפתחות האבקה, Hsp70 לא קיים בטפטום, שעובר דגדגה, ובאבקה בוגרת רמת Hsp70 נמוכה ביותר (Duck et al, 1989).

בארבידופסיס נבדק גם ביטוי של נציגי Hsp90 באבקה ונמצא כי הם מתבטאים כמעט בכל השלבים של התפתחות האבקה. מתוך שלושת בני המשפחה שנבדקו, רק אחד הראה עלייה בביטוי בעקבות חשיפה לחום. ביטוי שני האחרים כמעט ולא השתנה (Yabe et al, 1994).

בנוסף לכך, נבדקה רמת הביטוי של Hsp100 באבקה של תירס (*Zea mays*) ונמצא כי הוא התבטא ברמות נמוכות מאוד בשלבים שונים של ההתפתחות באבקנים, ובאבקה בוגרת. לא נצפתה תגובה לעקת חום ברקמות אלה (Young et al, 2001).

ההשערה הרווחת, באופן כללי, היא כי אבקה בשלה ברוב מיני הצמחים הינה חסרת יכולת לתגובה נורמאלית של חע"ח. ברוב המינים שנבדקו, לא נצפתה אינדוקציה של חע"ח בעקבות חשיפה לעקת חום. במקרה וכן הייתה אינדוקציה, רמת הביטוי הייתה נמוכה בכמה וכמה סדרי גודל, בהשוואה ליתר חלקי הצמח (Mascarenhas & Crone, 1996).

במחקרים שנעשו בכמה מיני צמחים ובכללם טבק (Mascarenhas & Crone, 1996), פטוניה (Nagao & Gurely, 1999), תירס (Cooper et al, 1984) ועגבנייה (Duck & Folk, 1994) הראו כי אבקה נובטת היא חסרת פעילות חע"ח. יוצא דופן כמעט יחיד תועד בדורה (*Sorghum*), בה נצפתה תגובת חע"ח ברמה מאוד נמוכה, יחסית לרקמות וגטטיביות, גם באבקה נובטת (Frova et al, 1991). בשונה מן המצב במכוסני זרע, בצמחים חשופי זרע כגון אורן (*Pinus tadea*) נצפתה תגובת חע"ח נורמאלית באבקה נובטת (Frankis and Grayson, 1990).

ביטוי נמוך של גנים המקודדים לחע"ח אינו תוצאה של ירידה כללית בשעתוק גנים בשלב זה. דוגמא לכך היא שעתוק הגן המקודד לאלפא טובולין במהלך עקת חום, בגרגירי אבקה של תירס, שאינם מבטאים חע"ח (Hopf et al, 1992). דוגמא נוספת היא ביטוי של גן מדווח בטבק, שהתבטא בכל הרקמות במהלך עקת חום, למעט אבקה (Spena & Schell, 1987).

שלב ההאבקה ונביטת הנחשונים הוא שלב קריטי מאוד, ומהווה את אחד השלבים הרגישים ביותר לפגיעה בעקבות עקה. משמעות הפגיעה גדולה במיוחד בגידולים חקלאיים בהם מספר וגודל הפרי הם פקטורים חיוניים לכדאיות הגידול. העובדה כי שלב זה נמצא מוגבל מבחינת ביטוי חע"ח מהווה פרדוקס בטבע, היות והאבקה ויצירת פירות וזרעים, הם תכלית קיומו של הצמח.

הוצע מודל לגבי Hsp70, לפיו חע"ח נאגרים באבקה בשלה בכמות נמוכה כדי להגן מפני עקת חום, היות ובשלב זה אין סינתזה חדשה של חע"ח (Duck et al, 1989). ייתכן ומודל זה תקף גם לגבי משפחות חע"ח אחרות (Mascarenhas & Crone, 1996).



## **9. הקומפנסציה (פיצוי)**

הקומפנסציה (פיצוי) היא תופעה שבה חושפים צמחים לעקה אחת וע"י כך מגנים עליהם מפני עקה אחרת. במחקר שבוצע במסגרת עבודה זו, נבדקה הגנה מפני עקת קור ע"י חשיפה מוקדמת לעקת חום. עבודות קודמות שנעשו במערכות צמחיות שונות, מעידות גם הן על יכולת הגנה מפני קור ע"י חימום מוקדם. Saltveit (2002) הראה שחימום נבטי אורז למשך מס' דקות, הגביר את עמידות הנבטים לקור. Gong et al (2001) הראו שחימום מוקדם של נבטי תירס הגביר את עמידותם לעקות חום, קור יובש ומלח. Sabehat et al (1998) הראו שחימום מוקדם של פירות עגבנייה מאפשר הגנה מפני עקת קור. החימום המוקדם גורם להצטברות של חלבוני עקת חום קטן - מולקולאריים שככל הנראה, הם אלו שהגדילו את עמידות הפירות לקור.

בצמחי הפלפל, תופעת הקומפנסציה נחקרה ביתר פירוט. כאשר צמחי פלפל נחשפו לתנאי קור בשלב שלפני האנטזיס, נצפו שינויים מורפולוגיים בפרחים שלהם: הפרחים גדלו עקב התנפחות השחלות והאבקנים התקצרו (Rylski, 1985; Polowick and Sawhney, 1985). כמו - כן, הקור פגע בשלב המיזוגה, שהוא הגורם המגביל של יצירת ג"א, וגרם להפחתה במס' גרגירי האבקה ולירידה בחיוניות שלהם (Pressman et al, 1998). עקב כך, נוצרו פירות קטנים ומעוותים שהם חסרי זרעים או בעלי מספר זרעים מועט (Pressman et al, 1998; Rylski, 1986). בנוסף לכך, נמצא שעקת קור גרמה לירידה בתכולת הסוכרים בגרגירי אבקה של פלפל (Shaked et al, 2004).

כל הפרמטרים הנ"ל ופרמטרים נוספים נבדקו כאשר הצמחים חוממו במהלך היום ונחשפו לתנאי קור בלילה (Pressman et al, 2006). צמחים שגודלו בתנאים הללו היו דומים במימדיהם ובמורפולוגיה שלהם לצמחים שגודלו בתנאים אופטימאליים, בשונה מצמחים שגודלו בתנאים של קירור לילה בלבד. בהשוואה לצמחי הקור, צמחי הקומפנסציה (צמחים שגודלו בתנאים של חום וקור) היו גבוהים יותר, משקלם היה גדול יותר ומספר עליהם היה גבוה יותר. כמו כן, מספר גרגירי האבקה מפרחים של צמחי הקומפנסציה היה גבוה יותר והחיוניות שלהם עלתה. עלייה בחיוניות גרגירי האבקה ובמספרם בצמחי הקומפנסציה, אפשרה התפתחות של פירות גדולים יותר, בעלי מספר רב של זרעים, שמשקלם גבוה יותר. בצמחי הקומפנסציה, העלייה בחיוניות גרגירי האבקה התאפשרה בעקבות עלייה בריכוז הסוכרים בגרגירים, ובהגברת פעילותם של אנזימי אינברטאזות (מפרקים סוכרוז לגלוקוז ופרוקטוז).

## **ג. מטרת העבודה**

בכדי ללמוד על תגובה לעקה וביטוי חע"ח באבקה מתפתחת, ומכיוון שלא נבדקה תמונת הביטוי של חע"ח באבקה של פלפל, התמקדנו במסגרת העבודה בשאלות הבאות:

- א. אלו חע"ח עוברים אינדוקציה בעלים של צמחים צעירים, בעקבות חשיפה לחום.
- ב. אלו חע"ח מבין המשפחות הידועות בפלפל, מתבטאים במהלך שלב ההבשלה של ג"א, שהוא שלב רגיש לעקות אביוטיות.
- ג. האם יש הבדל בביטוי או באינדוקציה של חע"ח באבקה ובעלים, בין צמחים ששהו בחממות הקומפנסציה לבין צמחים ששהו בחממות הביקורת.

## ד. חומרים ושיטות

### 1. רשימת חומרים:

|  |  |
|--|--|
| 2 - Propanol - Biolab (Jerusalem, Israel)  | Hydrochloric Acid - Biolab   |
| { 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranos<br>(X - gal) - Sigma (Rehovot, Israel) | { Isopropyl $\beta$ -D-1- Thio<br>Galactopyranoside (IPTG)-<br>Promega (Biological<br>Industries Ltd., Kibbutz<br>Beit Haemek, Israel) |
| 6 - amino - N - carpoic acid - Sigma   | { Lactic Acid - Sigma  |
| Acetic Acid - Biolab   | Magnesium Sulfate - Sigma  |
| Acid Fuchsin - Biolab  | Malachite Green - Sigma  |
| Acrylamide (40%) - Biolab  | Methanol - Biolab  |
| Agar - Bacto (Liverpool, NSW, Australia)   | { N,N,N',N' - Di -<br>Dimethylamino Ethane<br>(TEMED) - Bio Rad  |
| Agarose-Amresco (Tamar, Mevaseret Zion, Israel)  | Phenol - Sigma   |
| Albumine from Bovine Serum (BSA) - Sigma   | { Phenylmethyne sulfonyl<br>(PMSF) - Sigma   |
| Ammonium Persulfate (APS) - Sigma  | Potassium Nitrate - Sigma  |
| Ampicillin - Sigma   | Sodium Chloride - Sigma  |
| Beta Mercapto Ethanol - Sigma  | { Sodium Dodecyl Sulfate<br>(SDS) - Bio Rad  |
| Boric Acid - Sigma   | Sodium Hydroxide - Sigma   |
| Bromophenol Blue - Sigma   | { Sucrose - Duchefa (Getter<br>Bio-Med, Ramat Gan, Israel)   |
| Calcium Nitrate - Sigma  | Tris Hydrochloride - Amersco   |
| Chloroform - Biolab  | Trisma base - Biolab   |
| Comassie brilliant Blue (CBB) - Amersco  | Tryptone - Bacto   |
| { Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets -<br>Roche (Basel, Switzerland)         | Tween - Biolab   |
| Diethyl Pyrocarbonate - Sigma  | Water, Molecular Biology-Biolab  |
| Dimethyl Sulfoxide (DMSO) - Sigma  | Xylene Cyanol - Amersco  |
| { Dry Milk Blotting Grade - Bio Rad<br>(Rishon le Zion, Israel)                        | Yeast Extract - Bacto  |
| DTT (DL Dithio Threitol) - Sigma   |  |
| Ethanol (ABS) - Biolab   |  |
| Ethidium Bromide (EtBr) - Amersco  |  |
| Ethylene Diamine TetraaceticAcid (EDTA)-Sigma  |  |
| Glycerol - Amersco   |  |
| Glycine - Bio Rad  |  |

## **2. חומר צמחי:**

זרעים של פלפל מזן Celica (סליקה) נרכשו מחברת Enza Zaden שבהולנד, בתיווך המחלקה לזרעים של מכון וולקני (מדעי הצמח - גידולי שדה וגן). הזרעים נזרעו במגשי חישתיל שהכילו תערובת המורכבת מכבול וורמיקוליט ביחס 1:1 ולאחר שישה שבועות הועברו לחממה. בחממות הניסוי נשתלו הצמחים (צמח יחיד בכל עציץ) בעציצי פלסטיק בנפח של 5 ליטרים, שהכילו תערובת תוצרת חברת "שחם - גבעת עדה" המורכבת מ- 60% כבול, 20% קלקר ו- 20% ספוג. הצמחים הושקו בטפטוף לפי הצורך וניתן להם דישון, דרך מערכת ההשקיה, בדשן מסוג מור ("דשנים וחומרים כימיים", חיפה) שמכיל 4% חנקן, 2.5% זרחן, 6% אשלגן ו- 6% יסודות קורט. החממות בהן בוצע הניסוי כללו מערכת בקרת אקלים ממוחשבת מתוצרת "גביש" - גבעת-ברנר, שביקרה את הטמפי' בכל חממה בנפרד משך כל שעות היממה. הבקרה התבצעה דרך שליטה של המערכת על פעולת הוילונות, המאווררים והמזרון הלח בכל חממה.

## **3. גידול הצמחים לניסוי:**

צמחי הניסוי גודלו בחממות בטמפי' יום/לילה  $20^{\circ}\text{C}/26^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) במשך חודשיים. מספר מועט של צמחים נלקח בהיותם צעירים (בני חודשיים בלבד) ע"מ לבדוק דעיכה של חע"ח לאחר טיפול חום קצר. יתר הצמחים המשיכו לגדול בחממות, שבהן הייתה חשיפה לטיפול טמפי' שונים, כפי שיפורט בהמשך, עד להגיעם לגיל בגרות (בני חצי שנה). עם הגיעם לגיל זה, נדגמו מהם עלים ואבקה לצורך בדיקת החע"ח.

### ניסויי דעיכה

הצמחים הצעירים (בעלי שני פסיגים וארבעה עלים אמיתיים) קיבלו טיפול חום למשך שעה או למשך 3 שעות בטמפי' של  $35^{\circ}\text{C}$  או  $40^{\circ}\text{C}$  ע"י אינקובציה באינקובאטור, תוך שמירה על תנאי לחות. לאחר החשיפה לחום, הצמחים הועברו לחדר גידול בטמפי' של  $25^{\circ}\text{C}$ . כביקורת, חלק מן הצמחים נחשפו לטמפי' של  $25^{\circ}\text{C}$  בלבד, ללא חימום. מכל הצמחים נדגמו עלים צעירים לצורך הפקת חלבון. מן הצמחים שחוממו למשך 3 שעות בלבד, נדגמו עלים צעירים גם לצורך הפקת RNA.

הצמחים הבוגרים חולקו לארבעה טיפולים ששניים מתוכם מהווים ביקורות. להלן פירוט הטיפולים:

טיפול מס' 1 - ביקורת - הצמחים היו חשופים לתנאי הסביבה. טמפי' הלילה הייתה  $13^{\circ}\text{C}$  -  $10^{\circ}\text{C}$ . טווח הטמפי' במהלך היום היה רחב יותר ( $16^{\circ}\text{C}$  -  $33^{\circ}\text{C}$ ) עקב שינויים במזג האוויר.

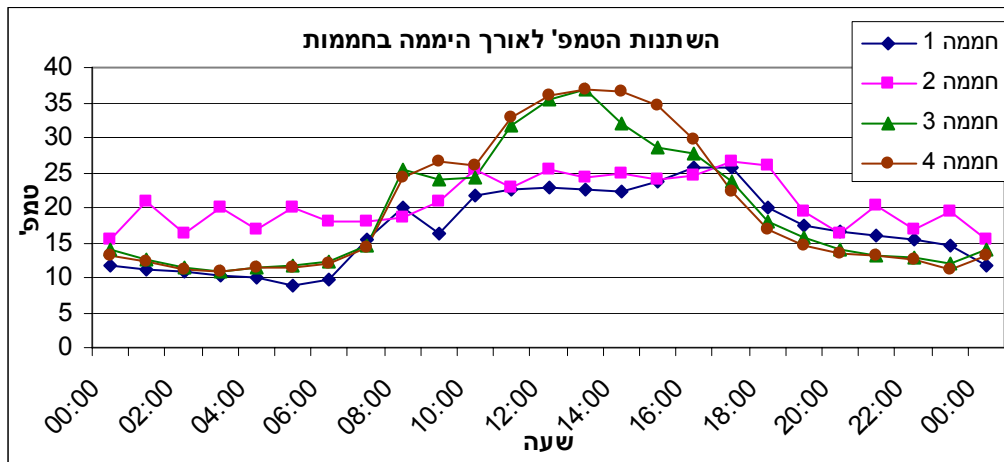
טיפול מס' 2 - טיפול שמהווה ביקורת נוספת ובמהלכו הצמחים גדלו בתנאים אופטימאליים. במהלך הלילה התבצע חימום וטווח הטמפי' היה  $16^{\circ}\text{C}$  -  $18^{\circ}\text{C}$ . במהלך היום טווח הטמפי' היה כמו בטיפול מס' 1.

טיפול מס' 3 - בטיפול זה החממה לא חוממה במהלך הלילה וטווח הטמפי' היה  $13^{\circ}\text{C}$  -  $10^{\circ}\text{C}$ . במהלך היום החממה נסגרה וחוממה למשך 3 שעות (בין השעות 14:00 - 11:00) בטווח טמפי' של  $36^{\circ}\text{C}$  -  $40^{\circ}\text{C}$ .

בתום החימום, התבצע אוורור בחממה והטמפי' ירדו לטווח של  $20^{\circ}\text{C}$  -  $28^{\circ}\text{C}$ .

טיפול מס' 4 - טיפול זה היה דומה לטיפול הקודם בכך שהחממה לא חוממה במהלך הלילה וטווח הטמפי' היה זהה לטווחים שבטיפול הלילה מס' 1 ו- 3. בנוסף לכך, החממה נשארה סגורה במשך כל היום. כתוצאה מכך הטמפרטורות עלו במידה רבה ובצהריים גם הן הגיעו לערכים של  $36^{\circ}\text{C}$  -  $40^{\circ}\text{C}$  כמו בטיפול מס' 3. בטיפול זה, טווח הטמפי' בתום 3 שעות החימום ( $25^{\circ}\text{C}$  -  $33^{\circ}\text{C}$ ) היה נמוך יותר מן הטווח שבמהלך החימום עצמו, אך הוא היה גבוה יותר מטווח הטמפי' שהיה קיים במהלך תקופת האוורור שבטיפול מס' 3.

**גרף 1.7:** גרף המתאר את שינוי הטמפ' במהלך היום, בחממות השונות:



ניתן לראות שטמפ' הלילה בחממה מס' 2 היו מקסימאליות. בנוסף לכך, טמפ' היום בחממות מס' 3 ו- 4 היו מקסימאליות, בעוד שטמפ' היום בחממה מס' 2 היו מינימאליות. כמו כן, ניתן לראות שהטמפ' היו זהות בחממות מס' 3 ו- 4, בין השעות 11:00 - 14:00. מעבר לשעות הנ"ל הטמפ' בחממה מס' 4 הייתה גבוהה מזו שבחממה מס' 3, במהלך היום. הצמחים שקיבלו טיפולים שונים המשיכו לייצר פרחים ואבקה ובמקביל איכותה של האבקה בטיפול מס' 1 נפגעה כתוצאה מהטיפול, בהשוואה לאבקה שיוצרה ע"י הצמחים שקיבלו את יתר הטיפולים. אחת לשבוע בוצעה בדיקת איכות אבקה כביקורת ע"פ המתואר להלן.

**4. בדיקת חיוניות האבקה כמדד לאיכותה:**

**תמיסת מיצוי/הנבטה:**  $1.27 \text{ mM Ca(NO}_3)_2$ ,  $0.16 \text{ mM H}_3\text{BO}_3$ ,  $1 \text{ mM KNO}_3$ ,  $1.6 \text{ mM MgSO}_4$ . להנבטה מוסיפים 10% סוכרוז בהתאם לנפח.

**ריאגנט אלכסנדר:** 100 mg Acid Fuchsin, 20 mg Malachite Green, 20 ml Ethanol (95%)

50 ml DDW, 1 ml Lactic Acid, 40 ml Glycerol, 5 g Phenol

עשרה פרחים בשלב האנטזיס שנפתחו באותו בוקר, נאספו מכל זן ונשמרו בתוך כלי עם קרח. מכל פרח הופרד אבקן אחד שהונח ב- 0.5 ml תמיסת הנבטה בתוך מבחנת אפנדורף שנוערה היטב.

לאחר 3 שעות אינקובציה בטמפרטורת של  $25^\circ\text{C}$ , הוספו לכל מבחנה  $20 \mu\text{l}$  של ריאגנט אלכסנדר. לאחר הוספת הריאגנט, נלקחה מכל מבחנת אפנדורף דוגמא לספירה ע"ג המוציטומטר במיקרוסקופ. בכל בדיקה נספרו 8 שדות והממוצע של שדות אלה שימש לחישוב מספר הגרגרים לפרח לפי הנוסחה:  
 $0.5 \times 6 \times 10,000 \times \text{ממוצע}$ . הגרגרים שנספרו חולקו לשלוש קטגוריות: גרגרים שנבטו, גריגריים חיוניים שנצבעו בסגול ע"י הריאגנט וגריגרים לא חיוניים שצבעם ירוק.

**5. איסוף חומר צמחי:**

היות והתגובה לחום וביטוי של חע"ח מגיעה לשיאה מס' שעות לאחר סוף הטיפול (Vierling, 1991), צמחי הפלפל נחשפו לחום למשך 3 שעות ע"מ ללמוד על האינדוקציה והדעיכה של חע"ח בעקבות החשיפה לחום. מן הצמחים הצעירים שקיבלו טיפולי חום כמתואר בסעיף מס' 3 של פרק זה, נדגמו עלים צעירים (באורך 2 - 3 cm) מיד בתום החימום. בנוסף לכך נדגמו עלים כעבור 3, 24 ו- 48 שעות מתום החימום. כל

העלים שנקטפו הוקפאו מיד בחנקן נוזלי. בשלב מאוחר יותר הופקו מהם חלבונים ומחלק מהם הופק גם RNA, כמתואר בסעיף 3 של פרק זה. מן הצמחים הבוגרים שקיבלו טיפולים שונים בחממות, נקטפו עלים צעירים בשעה 17:00 (כ - 3 שעות מתום החימום עבור טיפולים מסי' 3 ו - 4) ובשעה 9:00 בבוקר שלמחרת (טווח של 24 שעות מתום החימום). באופן דומה, נאספו באותן שעות 200 - 100 פקעי פריחה מן החממות. פקעי הפריחה עברו תהליך של הפרדת אבקנים ומיצוי אבקה כמתואר להלן.

#### **6. בידוד אבקנים והפרדת אבקה מאבקנים:**

פקעי הפריחה הופרדו ע"ג קרח ( $4^{\circ}\text{C}$ ). באמצעות פינצטה עדינה סולקו עלי הכותרת והגביע ולאחר מכן הוסרו האבקנים. בכדי להפריד גריגרי אבקה מהאבקן, נחתך כל אבקן ל - 2 או 3 פיסות באמצעות סקלפל על משטח קר. האבקנים החתוכים הועברו למבחנה שהכילה תמיסת הנבטה ללא סוכרוז. מבחנה זו נוערה ע"י מכשיר וורטקס במשך 3 דקות ע"מ לשחרר את גריגרי האבקה לתוך הנוזל. לאחר הניעור, סוננה התמיסה שהכילה את האבקה למבחנה נוספת דרך פד גזה, לסילוק דפנות האבקן, וסורכזה במשך 25 דקות בצנטריפוגה מקוררת במהירות של 20,000 rpm. לאחר הסרכוז התקבלו 2 פאזות: פאזה מוצקה שהכילה את האבקה ופאזה נוזלית שהורחקה. האבקה המבודדת נשמרה ב -  $80^{\circ}\text{C}$ .

#### **7. קטיף פירות:**

מן החממות השונות נקטפו פירות מ - 15 צמחים לצורך בדיקת השפעת הטיפולים על היבול. נקטפו פירות אדומים בלבד (הבשלה מלאה) שצורתם נורמאלית: פירות מרובעים (צורה המכונה "Blocky"). לא נקטפו פירות פחוסים או מעוקלים גם אם הבשלתם הייתה מלאה. הפירות הנורמאליים שנקטפו נספרו ונשקלו לצורך השוואה בין הטיפולים השונים.

#### **8. הפקת RNA וטיפול ב - DNase:**

##### **תמיסות:**

DDW + DEPC: 1ml DEPC into 1L DDW, incubation at Room Temperture O/N,

Autoclave 40 min

EtBr: 30  $\mu\text{l}$  Ethidium Bromide (0.625 mg/ ml) per mini gel (50 ml)

TAE x 50 Buffer : 40 mM Tris (242 gr) , 20 Mm Acetic Acid (57.1 ml) , 1 mM EDTA (100 ml EDTA 0.5M) pH 8.0, adjust to 500 ml with DDW + DEPC

SB (x6): 70% Glycerol (35 ml), 2% TAE x 50 (1 ml), 1% SDS (20%), 4% EDTA 0.5M, 0.05 gr Bromophenol Blue, 0.05 gr Xylene Cyanol, adjust to 50 ml with DDW

## אבקה

החומר הצמחי (100 - 50 mg רקמה) נכתש כשהוא קפוא בחנקן נוזלי בעזרת עלי ומכתש ובנוכחות חול סטרילי מתוצרת חברת "Merck" (Germany, Darmstadt), עד לקבלת אבקה דקה. לרקמה הכתושה והקפואה, הוסף 1 ml של TRI - Reagent (Sigma), ע"פ הוראות היצרן, ובוצעה הפקה באמצעות כלורופורם ואתנול (ראו פירוט בנספח א' סעיף א. 1).

איכות ההפקה נבדקה בגיל שהוכן ע"י הקרשת אגארוז בשיעור של 1% בתמיסת TAE x 1. בוצעה הטענה של דוגמאות בנות 1 µl של RNA, 8 µl של DEPC + DDW ו- 1 µl של SB (x6). ההרצה בוצעה בבופר TAE x 1 שהוכן תוך שימוש במים מטופלים ב- DEPC. ההרצה בוצעה למשך 50 דקות במתח של 100 V במתקן הרצה של חברת USA Scientific, המיוצגת בארץ ע"י חברת ירדן ביוטק, ירושלים, ובסופה הגיל צולם במצלמת UV מדגם TFI - 500 מתוצרת חברת "FUJI" (מיוצגת בארץ ע"י חברת "רניום" ירושלים). ריכוז ה- RNA נבדק בספקטרופוטומטר מסוג Nano Drop, שמיוצר ע"י חברת Thermo Scientific המיוצגת בארץ ע"י חברת האחים אייזנברג, לוד.

ה- RNA שהופק עבר ניקוי משאריות DNA גנומי באמצעות DNase RQI, RNase free (Promega) בהתאם להוראות היצרן (ראו פירוט בנספח א' סעיף א. 2). לאחר הטיפול ב- DNase, בוצעה הרצה נוספת של ה- RNA על גיל אגארוז כפי שתארתי קודם, ע"מ לקבוע את איכותו ולשלול את קיומן של שאריות DNA. ריכוז ה- RNA נבדק בשנית ע"י שימוש בספקטרופוטומטר ויתרתו נשמרה בטמפי של  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## עלים

עלי פלפל צעירים (400 - 300 mg רקמה) נכתשו כשהם קפואים בחנקן נוזלי בעזרת עלי ומכתש, עד לקבלת אבקה דקה. מן הרקמה הופק RNA תוך שימוש ב- GenElute Mammalian Total RNA Kit של Sigma ע"פ הוראות היצרן (ראו פירוט בנספח א' סעיף א. 3).

איכות ההפקה נבדקה בגיל שהוכן ע"י הקרשת אגארוז בשיעור של 1% בתמיסת TAE x 1. בוצעה הטענה של דוגמאות בנות 1 µl של RNA, 8 µl של DEPC + DDW ו- 1 µl של SB (x6). ההרצה בוצעה בבופר TAE x 1 שהוכן תוך שימוש במים מטופלים ב- DEPC, במתקן הרצה של חברת USA Scientific. ההרצה בוצעה למשך 50 דקות במתח של 100 V ובסופה הגיל צולם במצלמת UV מדגם TFI - 500. ריכוז ה- RNA נבדק בספקטרופוטומטר מסוג Nano Drop.

ה- RNA שהופק עבר ניקוי משאריות DNA גנומי באמצעות DNase I, HVD BIOTECH (Deoxyribonuclease I) בהתאם להוראות היצרן דניאל ביוטק, רחובות, ישראל (ראו פירוט בנספח א' סעיף א. 4).

לאחר הטיפול ב- DNase, בוצעה הרצה נוספת של ה- RNA על גיל אגארוז כפי שתארתי קודם ע"מ לקבוע את איכותו ולשלול את קיומן של שאריות DNA. ריכוז ה- RNA נבדק בשנית ע"י שימוש בספקטרופוטומטר ויתרתו נשמרה בטמפי של  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## **9. סינתזת cDNA:**

סינתזת ה- cDNA נעשתה ע"י תבנית של Total RNA תוך שימוש באנזים SuperScript II RT של חברת invitrogen (מיוצגת בארץ ע"י חברת רניום) ע"פ הוראות היצרן (ראו פירוט בנספח א' סעיף א. 5). גדילי ה- RNA נפרשו ועברו אינקובציה בנוכחות נוקליאוטידים, אנזים ובופר לצורך ביצוע הסינתזה. בתום הסינתזה, אוחסנו דוגמאות ה- cDNA בטמפי של  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **10. ריאקצית Semi Quantitative PCR:**

### עקרון השיטה

שיטה זו היא בעצם הכפלת מקטעי DNA ספציפיים ע"י סינתזה אנזימתית *in vitro*. הסינתזה מתבצעת בעזרת שני תחלים (פריימרים) שעוברים היברידיזציה, כל אחד לגדיל המשלים, ותוחמים את האזור בו מצוי מקטע ה- DNA אותו מעוניינים להגביר, ואנזים DNA פולימראז עמיד לחום - Taq polymerase, שיציב בטמפי גבוהות (עד  $95^{\circ}\text{C}$ ).

ריאקצית ה- PCR התבצעה במכשיר PCR של חברת דניאל ביוטק. ה- cDNA מן הדוגמאות השונות שימש כתבנית בריאקציות ה- PCR. בוצע שימוש בערכה PCR Master Mix של חברת ABgene המיוצגת בארץ ע"י חברת "תמר". הערכה מכילה אנזים, בופר ונוקלאוטידים הדרושים לסינתזת גדילי ה- DNA המשלימים.

### מרכיבי הריאקציה

12.5  $\mu\text{l}$  PCR Master Mix, 0.6  $\mu\text{M}$  forward / reverse primers, 1,000 - 1,500 ng cDNA and Water for Molecular Biology

נפח הריאקציה הוא  $25 \mu\text{l}$ .

### שלבי הריאקציה

שלב 1: דנטורציה לשם פתיחת גדילי ה- DNA.

שלב 2: מס' מחזורים של דנטורציה, היצמדות פריימרים אל תבנית ה- DNA וסינתזה לצורך שכפול.  
שלב 3: השלמת השכפול וסיום הריאקציה (פירוט נוסף לגבי שלבי הריאקציה מופיע בנספח א' סעיף א. 6).  
במסגרת ה- Semi Quantitative PCR, נבדקה הגברה של גן ביקורת בכל הדוגמאות, ע"מ לוודא שאכן מגבירים כמות שווה של DNA בכל דוגמא. לאחר כיוול כמויות ה- DNA בכל דוגמא באמצעות גן הביקורת, כוילו הגנים הנבדקים ע"מ לוודא שהם נמצאים בשלב הליניארי של השכפול שלהם (פירוט לגבי גן הביקורת ואופן הכיוול מופיע בנספח א' סעיף א. 6).

### אנליזת DNA בגיל

לאחר סיום ריאקציות ה- PCR, תוצרי הריאקציה עברו אלקטרופורזה בגיל של 1.5% אגארוז, בתוך תמיסת TAE x 1 נטולת DEPC שמכילה EtBr בכמות של  $1 \mu\text{l}$  פר 20 מ"ל של גיל (פירוט לגבי מרכיבי הגיל מופיע בסעיף 7 בפרק זה). ההרצה התבצעה בבופר TAE x 1 נטול DEPC, ותנאי ההרצה היו 100 V למשך 15 דקות, לאחר מכן הוסף לבופר ההרצה EtBr בנפח של  $25 \mu\text{l}$  וההרצה נמשכה למשך 30 דקות נוספות. טרם ההטענה, הוסף לתוצרי ריאקציה ה- PCR (x6) SB בנפח של  $2 \mu\text{l}$  (פירוט לגבי המרכיבים

מופיע בסעיף 7 בפרק זה). ההרצה בוצעה במקביל לסמן הגודל המולקולרי 100 bp DNA Ladder מתוצרת Lamda Biotech Inc, המיוצגת בארץ ע"י חברת טלרון מרחובות. בסיום ההרצה הגיל צולם במצלמת UV מדגם TFI - 500. כאשר בוצעה הגברה של 2 תוצרי PCR במקביל, האנליזה הייתה זהה למעט אלקטרופורזה בגיל של 1.8% אגארוז והרצה למשך 50 דקות במתח של 110V.

### **11. רשימת תחלים (Primers):**

כל הפריימרים תוכננו לאזורים שמורים לפי השוואה עם חע"ח ידועים אחרים בפלפל, בעגבניה, בטבק ובארבידופסיס. הפריימרים לראקציות ה-PCR תוכננו תוך שימוש בתוכנה Primer3 (Whithehead Institute for Biomedical Research). התחלים תוכננו עבור רצפים המייצגים Hsp70, Hsp60, sHsp's, Hsp90, Hsp100 ו-18S rRNA, כמפורט בנספח א', טבלה מס' 3.

### **12. ריצוף תוצרי PCR:**

#### ניקוי תוצר PCR

ריצוף התוצרים נעשה ע"מ לוודא שתוצר הראקציה שנוצר ע"פ הפריימרים שתוכננו הוא אכן מקטע מגן חע"ח המבוקש ולא תוצר אחר (זיהום או גן דומה).

תמיסות: TE Buffer - 10 mM TRIS HCl, 10 mM EDTA

ניקוי תוצר PCR מגיל אגארוז נעשה לפי הוראות היצרן תוך שימוש בערכה של חברת Promega : Wizard SV Gel and PCR clean up system

התהליך כלל המסת פיסת אגארוז שנחתכה מתוך הגיל והכילה את תוצר ה-PCR. לאחר מכן, ה-DNA נקשר לקולונה ונוקה. ה-DNA הנקי שוחרר מן הקולונה באמצעות שטיפה בבופר TE.

#### שיבוט מקטע PCR לתוך פלסמיד והחדרת הפלסמיד לחיידקים קומפוטנטיים

מצע מזון לגידול חיידקים -

LB: 1% Bacto - tryptone w/v, 0.5% Yeast extract w/v, 1% NaCl w/v, adjust pH with NaOH to 7.5 and autoclave 20 min

להכנת מצע מוצק יש צורך בהוספת אגר, אמפיצילין, IPTG, ו-X-gal (ראו פירוט בנספח א' סעיף א. 7). עבור תהליכי שיבוט ובדיקת תוצרי השיבוט משתמשים בחיידקי E. coli בעלי עמידות לאמפיצילין מזן DH5 $\alpha$  שנקנו מחברת Bio Lab. השיבוט של המקטע הרצוי נעשה באמצעות שימוש בערכה pGEM - T Easy vector system של חברת Promega ע"פ הוראות היצרן (ראו פירוט בנספח א' סעיף א. 7). השיטה מתבססת על ליגציה של מחדר (תוצר PCR) לפלסמיד, החדרתו לחיידקים קומפוטנטיים, ריבוי החיידקים ובדיקה לצורך וידוא הכנסת המחדר. לאחר השיבוט שולחים לריצוף דוגמאות של 50  $\mu$ l במבחנות מסומנות לחברת דניאל ביוטק. החברה מפיקה את הפלסמיד מן החיידקים, מנקה אותו ומרצפת אותו. ריאקצית הריצוף מתרחשת תוך שימוש בפריימר R - 13 M, שמכוונת לאתר MCS שבפלסמיד.



כשתוצאות הריצוף מתקבלות מן החברה, מתבצע BLAST במאגרי המידע TIGR או NCBI ע"מ לוודא שהמקטע שהוגבר הוא אכן המקטע התחום בין זוג הפריימרים שתוכננו עבור הרצף המקודד לחע"ח הרצוי.

### **13. הפקת חלבון:**

מיצוי החלבונים בוצע בבופר מיצוי ע"פ שיטתם (Wehmeyer et al (1996):

**Protein Extraction Buffer:** 60 mM Tris HCl pH 8.0, 60 Mm DTT, 2.0% SDS, 15% Sucrose, 5 mM 6 - amino - N - carpoic acid, 1 mM PMSF

Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets - 1 per each 10 ml Buffer

הגולות מיוצרות ע"י חברת Roche Diagnostics, המיוצגת בארץ ע"י חברת דין דיאגנוסטיקס, קיסריה. החומר הצמחי נכתש בחנקן נוזלי עד לקבלת אבקה דקה. לכל מבחנה הוספו 500 µl בופר מיצוי. לאחר 5 דקות בטמפ' החדר סורכזו המבחנות למשך 5 דקות במהירות של 13,000 rpm. הפאזה העליונה, שהכילה את מיצוי החלבון, הועברה למבחנה חדשה. דוגמאות החלבון נשמרו ב -20°C.

**קביעת ריכוז חלבון**

**תמיסות:**

**Comassie Brilliant Blue Protein Dye:** 2 g CBB, 500 ml Methanol, 100 ml Acetic Acid, 400 ml DDW

**Destain Solution:** 500 ml Methanol, 100 ml Acetic Acid, 400 ml DDW

מכיוון שהבופר מכיל SDS, לא ניתן לקבוע את כמות החלבון בשיטת ברדפורד. הקביעה והצביעה נעשו כמתואר במאמר של (Gosh et al (1988).

דוגמאות חלבון בנפח של 1 µl הוטענו בנקודות ע"ג נייר ווטמן מסומן. במקביל הוטענה עקומת כיוול של ריכוזים ידועים מחלבון BSA. לאחר צביעת החלבון ב - CBB, כמות החלבון בדוגמאות חושבה יחסית לצביעה של עקומת הכיוול.

### **14. אנליזת WESTERN BLOT:**

**תמיסות:**

**4 X Upper Tris Buffer:** 6.06 g Tris Base, 60 ml DDW, 4 ml 10% SDS Solution, adjust pH to 6.8, DDW to final volume of 100 ml

**4 X Lower Tris Buffer:** 36.3 g Tris Base, 60 ml DDW, 20 ml 10% SDS Solution, adjust pH to 8.8, DDW to final volume of 100 ml

**10 X Running Buffer:** 30 g Tris Base, 144 g Glycine, 10 g SDS, add DDW to final volume of 1L

**Sample Buffer:** 3 ml Glycerol, 3.75 ml Upper Tris Buffer, 1.5 ml Beta - Mercapto - Ethanol, 1.75 ml SDS 20% Solution, 1.2 mg Bromophenol Blue

**Transfer Buffer:** 200 ml Methanol, 3 g Tris, 14.4 g Glycine, DDW to final volume of 1L

PBS - Tween: 60 ml NaCl 2.5 M Solution, 20 ml 0.5 M Na - Phosphate pH 7.3 Solution, DDW to final volume of 1L, 1 ml Tween

מכל דוגמא של חלבון נלקחו  $20\mu\text{g}$  (החישוב בוצע ע"פ עקומת הכיול). לכל דוגמא הוספו  $7\mu\text{l}$  של Sample Buffer. הנפח הושלם ל-  $20\mu\text{l}$  ע"י הוספת DDW. הדוגמאות הורצו ב- 12% פוליאקריל אמיד ג'ל שמכיל SDS. כאשר בוצעה הרצה לצורך תגובה עם נוגדן כנגד Hsp100, הג'ל הכיל 10% פוליאקריל אמיד.

Lower Gel: 6 ml 30% Acrylamide, 3.75 ml 4 X Lower Tris Buffer, 5.25 ml DDW,  $175\mu\text{l}$  APS Solution 10%,  $10\mu\text{l}$  TEMED

Upper gel: 1.2 ml 30% Acrylamide, 2.5 ml 4 X Upper Tris Buffer, 6 ml DDW,

$120\mu\text{l}$  APS Solution 10%,  $15\mu\text{l}$  TEMED

הרצת הדוגמאות בוצעה בתוך 1 X Running Buffer מסוג 3 Mini - Protein בתוצרת Bio - Rad כחצי שעה במתח של 50 V ולאחריה כשעתיים במתח של 100 V. הסמן שהורץ הוא Prestained Protein Page Ruler של חברת Fermentas, המיוצגת בארץ ע"י חברת האחים אייזנברג. לאחר ההרצה החלבונים הועברו לממברנת ניטרוצלולוז  $0.5\mu\text{m}$  (Gelman Sciences Bio Trace NT), המיוצרת ע"י חברת PALL Life Sciences, המיוצגת בארץ ע"י חברת האחים אייזנברג. ההעברה בוצעה במתח של 90 V למשך שעה וחצי.

החסימה (Blocking) התבצעה בתמיסת 5% Dry Milk למשך הלילה. מטרת החסימה הייתה ליצור משטח חוסם של חלבונים לא ספציפיים שיכסו את כל הממברנה כדי למנוע קישור נוגדנים לאזורים חשופים ע"י הממבראנה. למחרת נשטפה הממבראנה ב- PBS - Tween מס' פעמים. בתום השטיפות בוצעה אינקובציה למשך שעתיים עם נוגדן ראשוני, שנמהל בתמיסת Dry milk, במיהולים משתנים (ראו פירוט בנספח א', טבלה מס' 2).

לאחר האינקובציה בוצעו שטיפות נוספות ב- PBS - Tween, שלאחריהן בוצעה אינקובציה נוספת למשך כחצי שעה עם נוגדן שניוני (ראו פירוט בנספח א', טבלה מס' 2), שקשור לאנזים HRP (Horseradish Peroxidase), במיהול של 1: 3,500. בתום האינקובציה הנוספת בוצעו שטיפות נוספות ב- PBS - Tween. לאחר מכן, בוצעה הגבה של הממבראנה עם ריאגנט ECL (Enhanced Chemiluminescence), המיוצר ע"י חברת תעשיות ביולוגיות בית העמק, לפי הוראות היצרן. מיד בתום התגובה עם הריאגנט, בוצעה חשיפה של הממברנה לפילם מסוג Fuji Super Rx שגודלו  $18 \times 24\text{ cm}$ . הפילם נעשה בחושך באמצעות מכונת פיתוח מדגם CURIX 60 של חברת AGFA (Köln, Germany), תוך שימוש בתמיסות GBX developer & fixer and Replenisher מתוצרת חברת Kodak, המיוצגת בארץ ע"י חברת תמר.

## ה. תוצאות

### 1. השפעות פיסיולוגיות של תנאי הגידול על הצמחים

צמחי הניסוי גודלו במהלך עונת החורף, בחממות שבהן הייתה חשיפה לתנאי קור בלבד (חממה מס' 1, ללא חימום), חשיפה לתנאים אופטימאליים (חממה מס' 2, חימום לילה) וחשיפה לתנאי קומפנסציה המהווים שילוב של תנאי חום וקור (חממה מס' 3 שנסגרה ל - 3 שעות בכל יום וחממה מס' 4 שנסגרה לכל היום). פרק זה מתאר את ההשפעות הפיסיולוגיות של תנאי הגידול על הצמחים.

#### א. השפעת תנאי הגידול על המראה הכללי של הצמחים:

תמונה מס' 1 - תצלום של צמחים שגודלו בחממות, בהן תנאי הגידול משתנים:

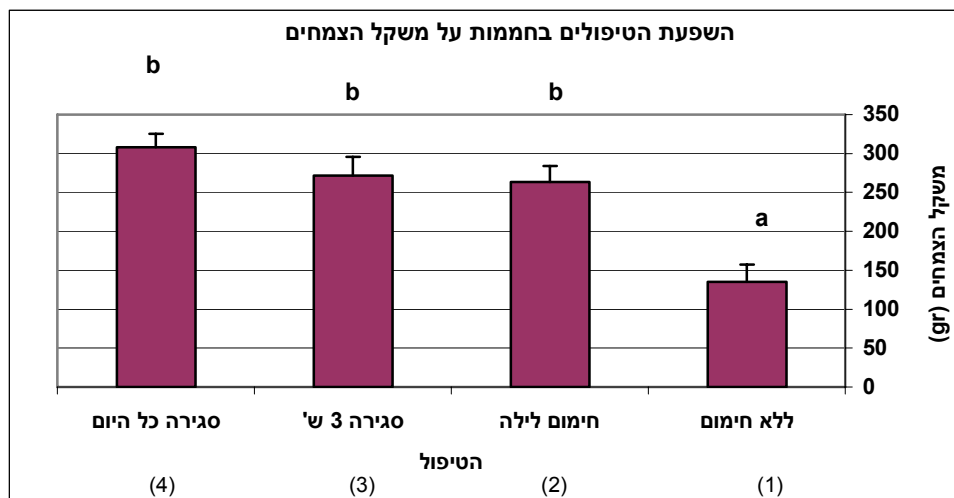


ללא חימום (1) סגירה כל היום (4) סגירה 3 ש' (3) חימום לילה (2)

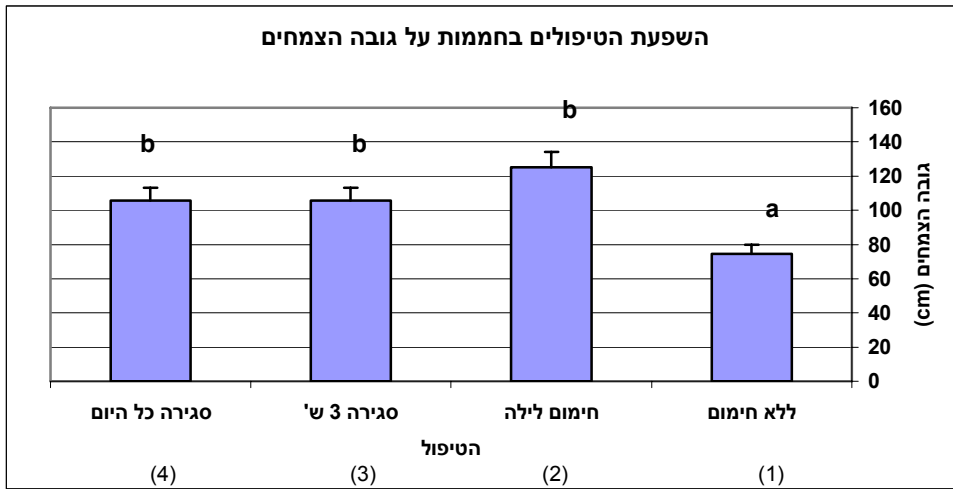
מכל חממה נלקחו עציצים ובהם צמחים שעברו את הטיפולים הנ"ל, וצולמו ע"מ להמחיש את ההבדלים הנובעים מהשפעת הטיפולים, באופן ויזואלי. בתמונה זו, העציצים השונים מסודרים לפי גובהם.

#### ב. השפעת תנאי הגידול על הרקמות הוגטטיביות של הצמחים:

גרף מס' 2 - השפעת תנאי הגידול על משקל הצמחים:



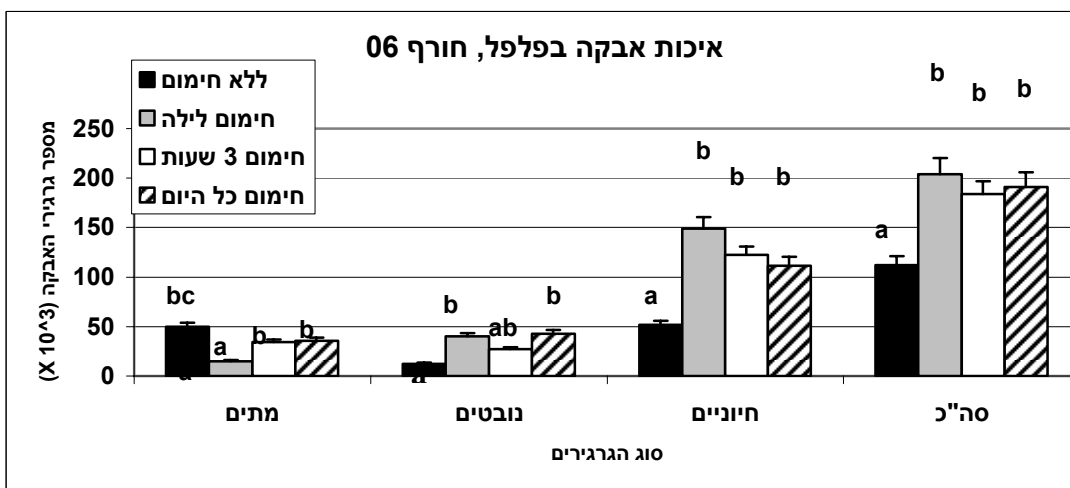
גרף מס' 3 - השפעת תנאי הגידול על גובה הצמחים :



מכל חממה, נלקחו שישה צמחים, ונבדקו גובהם ומשקלם הממוצע (ללא שורשים וללא פירות). בוצעו ניתוחים סטטיסטיים באמצעות התוכנה "anova". הערכים המוצגים באותיות דומות אינם נבדלים סטטיסטית ברמת מובהקות של  $p = 0.05$ . ניתן לראות שבחממות הקומפנסציה הסגורות (3 - 4) ובחממת הביקורת מס' 2 (חימום לילה) אורכי הצמחים ומשקלם דומים (מובהק סטטיסטית), והם גבוהים יותר מן האורכים והמשקלים של הצמחים בחממת הביקורת מס' 1 (ללא חימום).

ג. השפעת תנאי הגידול על הרקמות הרפרודוקטיביות של הצמחים :

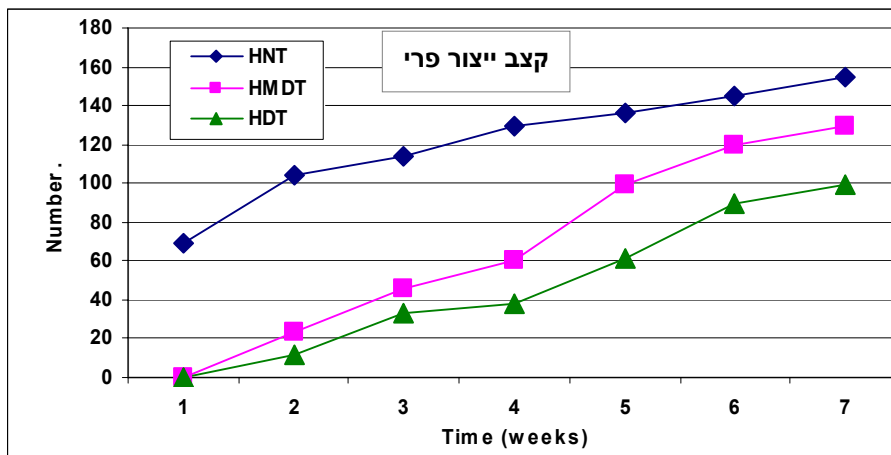
גרף מס' 4 - השפעת תנאי הגידול על איכות האבקה של פלפל :



מכל חממה נקטפו פרחים לצורך קביעת איכות האבקה, כמתואר בפרק חומרים ושיטות. בוצעו ניתוחים סטטיסטיים באמצעות התוכנה "anova". הערכים המוצגים באותיות דומות אינם נבדלים סטטיסטית ברמת מובהקות של  $p = 0.05$ . ניתן לראות שבחממת הביקורת "ללא חימום", המספר הכולל של גרגירי האבקה, ומס' הגרגירים החיים הוא הנמוך ביותר (מובהק סטטיסטית). כמו כן, ניתן לראות שבחממת הביקורת "חימום לילה", מספר גרגירי האבקה המתים הוא הנמוך ביותר (מובהק סטטיסטית).

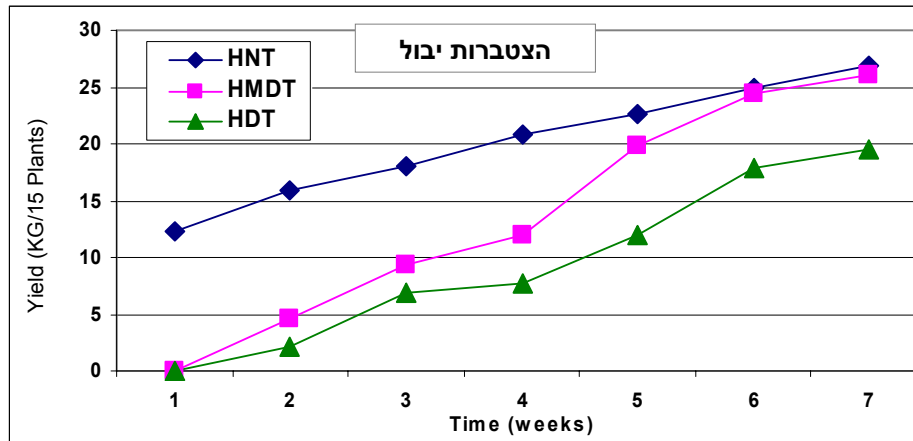
#### ד. השפעת תנאי הגידול על תנובת הפירות:

גרף מס' 5 - השפעת תנאי הגידול על קצב ייצור פירות בפלפל:



גרף זה מתאר את המספר המצטבר של פירות נורמאליים של 15 צמחים במהלך הניסוי. הניסוי החל מהרגע שבו הופיעו על הצמחים פירות שהיו לקראת ההבשלה, בחממה מס' 2 (חימום לילה - HNT: High Night Temperature). בתום שבוע מרגע זה, נקטפו הפירות הבשלים, שצבעם היה אדום, והם נספרו. אליהם התווספו פירות שנקטפו במהלך השבועות הבאים כלומר, בכל שבוע נספרו גם הפירות שנקטפו באותו השבוע וגם אלו שנקטפו בשבועות הקודמים. עד לתום השבוע הראשון של הניסוי בשני טיפולי הקומפנסציה (חממה מס' 3 - HMDT: High Mid Day Temperature וחממה מס' 4 - HDT: High Day Temperature) מספר הפירות הנורמאליים של הצמחים היה נמוך בהשוואה למספר הפירות בחימום הלילה, בעיקר במועדי הקטיף הראשונים. צמחים שטופלו בטיפול החימום הקצר (חממה מס' 3 - HMDT) הניבו יותר פירות נורמאליים מאלו שגדלו בחממה הסגורה (חממה מס' 4 - HDT), שבה היה מחסור ב-  $CO_2$ . עד למועד הקטיף האחרון עדיין לא הייתה הבשלה של פירות נורמאליים בחממה מס' 1, שלא חוממה כלל.

## גרף מס' 6 - השפעת תנאי הגידול על הצטברות יבול הפלפל:



גרף זה מתאר את המשקל המצטבר של פירות נורמאליים של 15 צמחים במהלך הניסוי. בכל שבוע נקטפו פירות שנשקלו ואליהם התווספו פירות שנקטפו במהלך השבועות הבאים כלומר, בכל שבוע נשקלו גם הפירות שנקטפו באותו השבוע וגם אלו שנקטפו בשבועות הקודמים. בדומה למס' הפירות, גם היבול פר 15 הצמחים בחממה שעברה חימום בלילה (חממה מס' 2 - HNT), היה גבוה מזה שבשתי חממות הקומפנסציה (חממה מס' 3 - HMDT וחממה מס' 4 - HDT), במיוחד בקטיפים הראשונים. יבול הצמחים שחוממו רק בצהריים (חממה מס' 3 - HMDT) היה גבוה מיבול הצמחים שחוממו כל היום (חממה מס' 4 - HDT). לקראת סוף הניסוי השתוו היבולים של הצמחים שחוממו כל היום או כל הלילה.

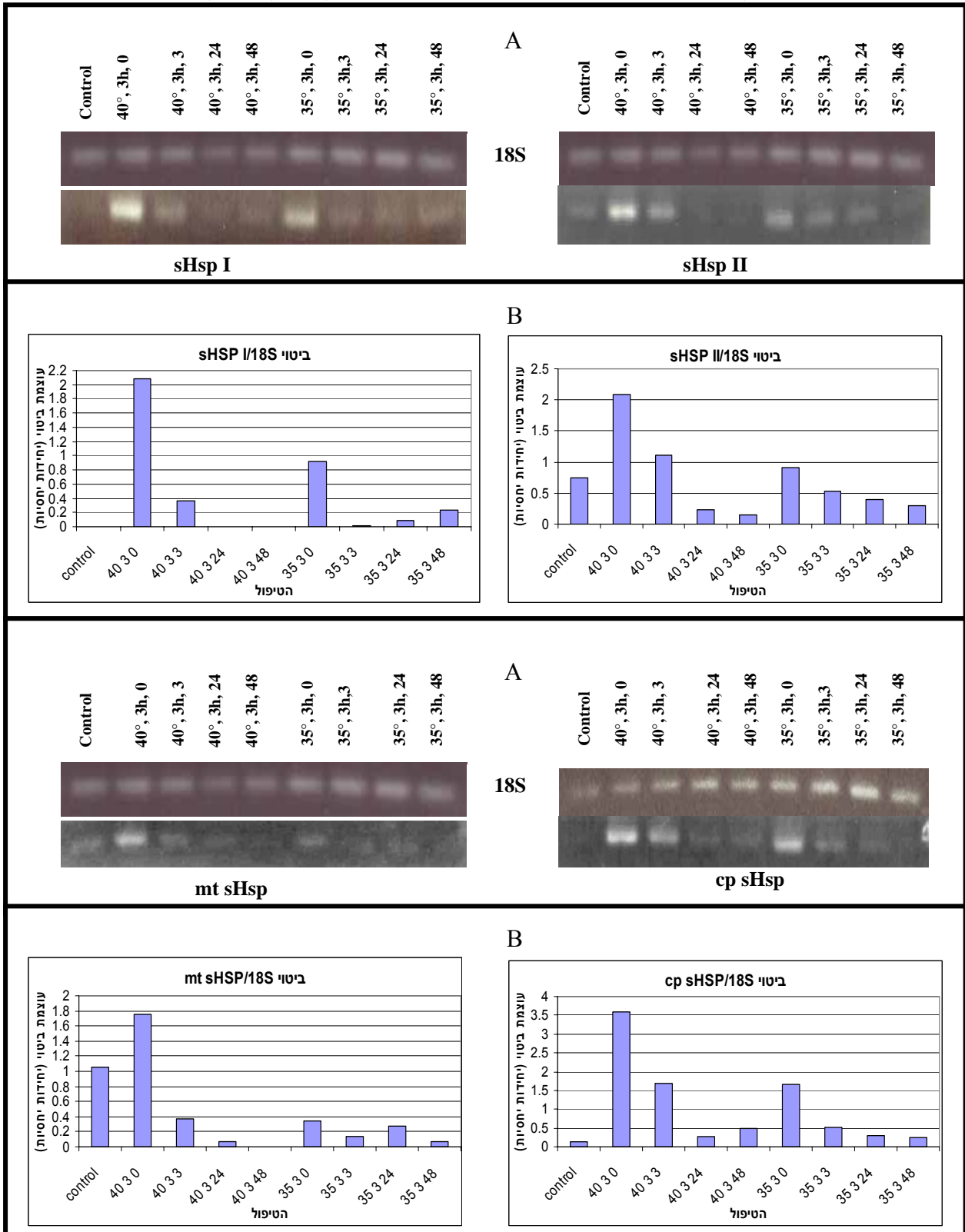
## 2. ביטוי חלבוני עקת חום ברמת ה-RNA בעלים של צמחים צעירים בתגובה לעקת חום קצרת מועד (ניסוי דעיכה)

מכיוון שפרופיל הביטוי של חע"ח אינו ידוע בפלפל, הוא נבדק בצמחים צעירים לצורך לימוד המערכת. ביטוי חע"ח נבדק בעלים שנדגמו מצמחים צעירים, שנחשפו לתנאים שונים של עקת חום, בהשוואה לביקורת. מן העלים הופק RNA וע"ס תבנית ה-RNA, סונתז cDNA, כמתואר בפרק חומרים ושיטות. הביטוי ברמת ה-RNA נבדק בשיטת Semi quantitative RT-PCR עבור הגן הנבדק וגן הביקורת 18S rRNA, כמתואר בפרק חומרים ושיטות. העלים נדגמו מיד בתום החימום, כ-3 שעות, כ-24 שעות וכ-48 שעות לאחריו. תוצאות הניסוי מתוארות בתרשים 2.1 בעמוד 33.

### אינדוקציה של חע"ח בעקבות חשיפה לחום:

בתרשים 2.1 מסוכמות תוצאות הביטוי של sHsp ציטופלסמטי מסוג Class I ו-Class II, sHsp מיטוכונדריאלי ו-sHsp כלורופלסטי.

תרשים 2.1: אינדוקציה של חציית בעלים של צמחי פלפל צעירים מזן סליקה, בעקבות חשיפה לחום



רמת הביטוי נבחנה בעלים שנדגמו מצמחים צעירים שנחשפו לתנאי חום, בהשוואה לביקורת, כמתואר בפרק חומרים ושיטות. הביטוי ברמת ה-RNA נבדק בשיטת Semi quantitative RT-PCR עבור הגן הנבדק וגן הביקורת 18S rRNA (A) והוצג באופן גרפי (B) ע"י כימות באמצעות התוכנה ImageJ. עבור כל טיפול, הערך שהתקבל באמצעות התוכנה, חולק בערך שהתוכנה מדדה עבור גן הביקורת 18S rRNA. תיאור הטיפולים בגרף ובגלל מתייחס לטמפ' (40°C או 35°C), משך החימום (3 שעות) ומועד דיגום העלים (מיד בתום החימום, כ-3 שעות, כ-24 או כ-48 שעות לאחר מכן). התוצאות המוצגות כאן מהוות חזרה מייצגת מתוך שתי חזרות.

נבדקה גם רמת הביטוי של תעתיקים המקודדים לחע"ח גבה - מולקולריים (פירוט לגבי התעתיקים מופיע בפרק "חומרים ושיטות" סעיף מס' 11) ונמצא שהם לא עוברים אינדוקציה בעקבות חשיפה לחום ולכן דגם הביטוי שלהם אינו מוצג כאן.

מתוך התוצאות המוצגות בתרשים 2.1 ניתן לראות:

- א. כל התעתיקים שמקודדים לחע"ח קטן - מולקולריים אינם מתבטאים באופן קונסטיטוטיבי והם עוברים אינדוקציה בעקבות חשיפה לחום.
- ב. התעתיקים המקודדים ל - sHsp הציטופלסמטי מסוג Class I ו - sHsp הכלורופלסטי הם בעלי ביטוי אפסי בתנאי ביקורת.
- ג. שיא הביטוי של כל התעתיקים הוא מיד בתום חימום בן 3 שעות בטמ' של  $40^{\circ}\text{C}$ . קיימת אינדוקציה של התעתיקים גם בעקבות חשיפה לטמ' של  $35^{\circ}\text{C}$ , אך היא חלשה יותר בהשוואה לטיפול שהוזכר בסעיף הקודם.
- ד. בשני טיפולי החום שניתנו, ניתן היה להבחין בתופעה של דעיכה. התעתיקים התבטאו בעוצמה חלשה יותר כ - 24 ו - 48 שעות מתום הטיפולים.
- ה. התעתיקים אינם יציבים והם בעלי עוצמות ביטוי נמוכות במועדים שאינם סמוכים למתן טיפולי החום.
- ו. התעתיק המקודד ל - sHsp הכלורופלסטי אינו מקודד לחלבון שנבדק, מכיוון שהתעתיק עובר אינדוקציה בעקבות חשיפה לחום, בשונה מן החלבון (ראו סעיף מס' 3 בפרק זה).
- ז. שיא הביטוי של חלבוני sHsp's בעקבות חשיפה לחום הוא כ - 3 שעות מתום הטיפול (ראו סעיף מס' 3 בפרק זה), בעוד ששיא הביטוי של התעתיקים הוא מיד בתום הטיפול. ע"ס התוצאות הללו ניתן להסיק שהתעתיקים מקדימים את החלבונים (בהנחה שהתעתיקים והחלבונים הם התוצרים של אותם גנים).

### **3. ביטוי חלבוני עקת חום ברמת החלבון בעלים של צמחים צעירים בתגובה**

#### **לעקת חום קצרת מועד (ניסוי דעיכה)**

מכיוון שפרופיל הביטוי של חע"ח אינו ידוע בפלפל, הוא נבדק בצמחים צעירים לצורך לימוד המערכת. ביטוי חע"ח נבדק בעלים שנדגמו מצמחים צעירים, שנחשפו לתנאים שונים של עקת חום, בהשוואה לביקורת ומהם הופק חלבון כמתואר בפרק חומרים ושיטות. העלים נדגמו מיד בתום החימום, כ - 3 שעות, כ - 24 שעות וכ - 48 שעות לאחריהם. תוצאות הניסוי מתוארות בתרשים 3.1 בעמוד 35.

#### **אינדוקציה של חע"ח בעקבות חשיפה לחום:**

בתרשים 3.1 מסוכמות תוצאות הביטוי של sHsp ציטופלסמטי מסוג Class I ו - Class II, sHsp מיטוכונדריאלי, HSP70 ו - Hsp100.



### תרשים 3.1: סיכום ביטוי חצי"ח בעלים של צמחי פלפל צעירים מזן סליקה



רמת הביטוי נבחנה בעלים שנדגמו מצמחים צעירים שנחשפו לתנאי חום, בהשוואה לביקורת, כמתואר בפרק חומרים ושיטות. הביטוי ברמת החלבון נבדק בשיטת (A) Western Blot תיאור הטיפולים בגלל מתייחס לטמפ' 40°C או 35°C, משך החימום (שעה או 3 שעות) ומועד דיגום העלים (מיד בתום החימום, כ - 3, 24 או 48 שעות לאחר מכן). התוצאות המוצגות כאן מהוות חזרה מייצגת מתוך שתי חזרות.

נבדקה גם רמת הביטוי של החלבון sHsp ונמצא שהוא לא עובר אינדוקציה בעקבות חשיפה לחום ולכן דגם הביטוי שלו אינו מוצג כאן.

מתוך התוצאות המוצגות בתרשים 3.1 ניתן לראות:

- א. כל החלבונים שנבדקו בניסוי זה, אינם בעלי ביטוי קונסטיטויטיבי (רמת ביטוי דומה בכל הטיפולים שנבדקו עבור כל חלבון).
- ב. החלבונים שנבדקו עוברים אינדוקציה בעלים בעקבות חשיפה לחום בהשוואה לתנאי ביקורת.
- ג. שיא הביטוי היה כ - 3 שעות לאחר חימום בטמפי של 40°C למשך 3 שעות. החלבון sHsp הציטופלסמטי מסוג Class I התבטא בעוצמה גבוהה מאוד גם כ - 3 שעות לאחר חימום בטמפי של 35°C למשך 3 שעות (ראו סימון בצבע אדום).
- ד. החלבון sHsp הציטופלסמטי מסוג Class I הוא היחיד שלא התבטא בתנאי ביקורת, ושלא התבטא מיד בתום החימום, למעט ביצוע חימום למשך 3 שעות, בטמפי של 40°C.
- ה. החלבונים Hsp70 ו - sHsp הציטופלסמטי מסוג Class I הם היחידים שלא התבטאו כ - 48 שעות מתום חימום למשך שעה אחת.
- ו. כל החלבונים עוברים אינדוקציה בעקבות חשיפה לחום והם מתבטאים בתא גם לאחר 48 שעות ממועד החימום, כלומר אלו הם חלבונים יציבים.

ז. כאשר יש חשיפה לחום, ביטוי החלבונים גבוה יותר בסמוך למועד החימום. כעבור 24 או 48 שעות, הביטוי נמוך יותר כלומר, קיימת תופעה של דעיכה. תופעה זו מתקיימת גם עבור החלבון sHsp הכלורופלסטי, שבו הביטוי מקסימאלי בתנאי ביקורת.

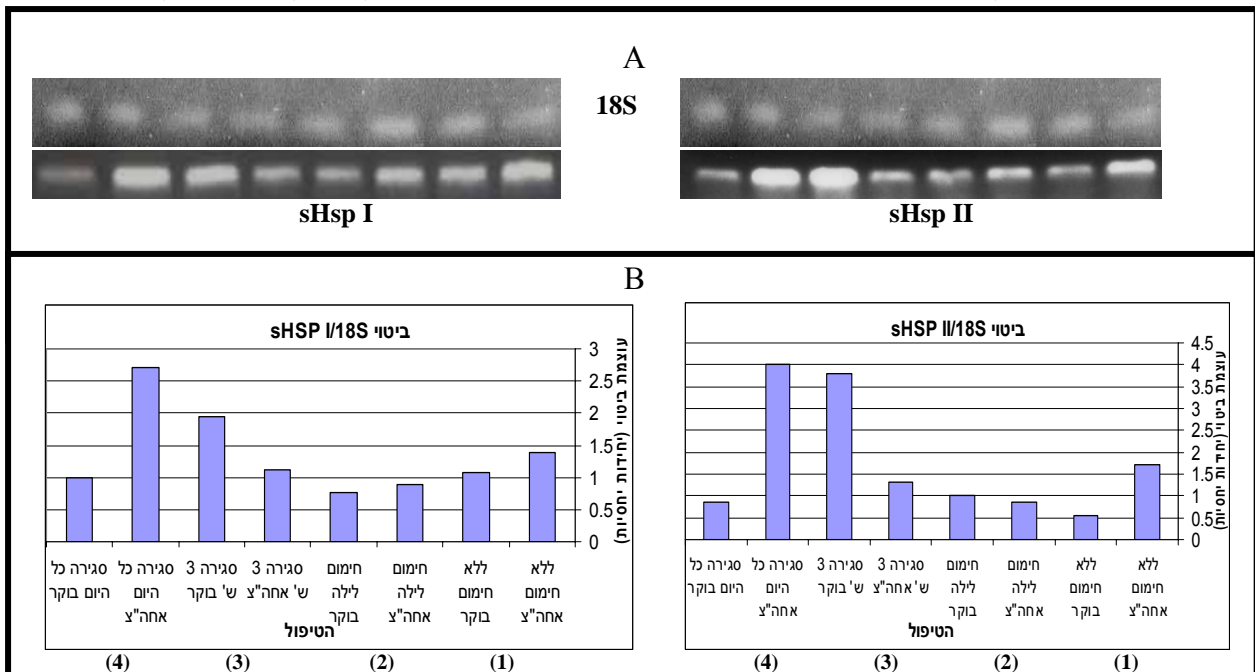
#### 4. ביטוי חלבוני עקת חום ברמת ה-RNA בעלים של צמחים בוגרים בתנאי חממה, המשלבים חשיפה לתנאי קור בלילה ולתנאי חום ביום

לאחר לימוד פרופיל הביטוי של חע"ח בצמחים צעירים, נבדקו רמות ביטוי של חע"ח בצמחים בוגרים, בתנאי חממה. ביטוי חע"ח נבדק בעלים צעירים. צמחים בוגרים בני חצי שנה גודלו בארבע חממות שבהן הצמחים נחשפו לתנאים אופטימאליים, לתנאי קור בלילה ולתנאים של חום ביום וקור בלילה, כמתואר בפרק חומרים ושיטות. מן הצמחים נדגמו עלים שמהם הופק RNA וע"ס תבנית ה-RNA סונתז cDNA, כמתואר בפרק חומרים ושיטות. הביטוי ברמת ה-RNA נבדק בשיטת Semi quantitative RT-PCR עבור הגן הנבדק וגן הביקורת 18S rRNA, כמתואר בפרק חומרים ושיטות. מועדי הדיגום היו בשעה 17:00 בערב ובשעה 9:00 בבוקר שלמחרת. תוצאות הניסוי מתוארות בתרשימים 4.1 - 4.4 בעמודים 36 - 39.

#### א. אינדוקציה של חע"ח בחממות הקומפנסציה:

תרשים 4.1 מסוכמות תוצאות הביטוי של sHsp הציטופלסמטיים Class I ו-II.

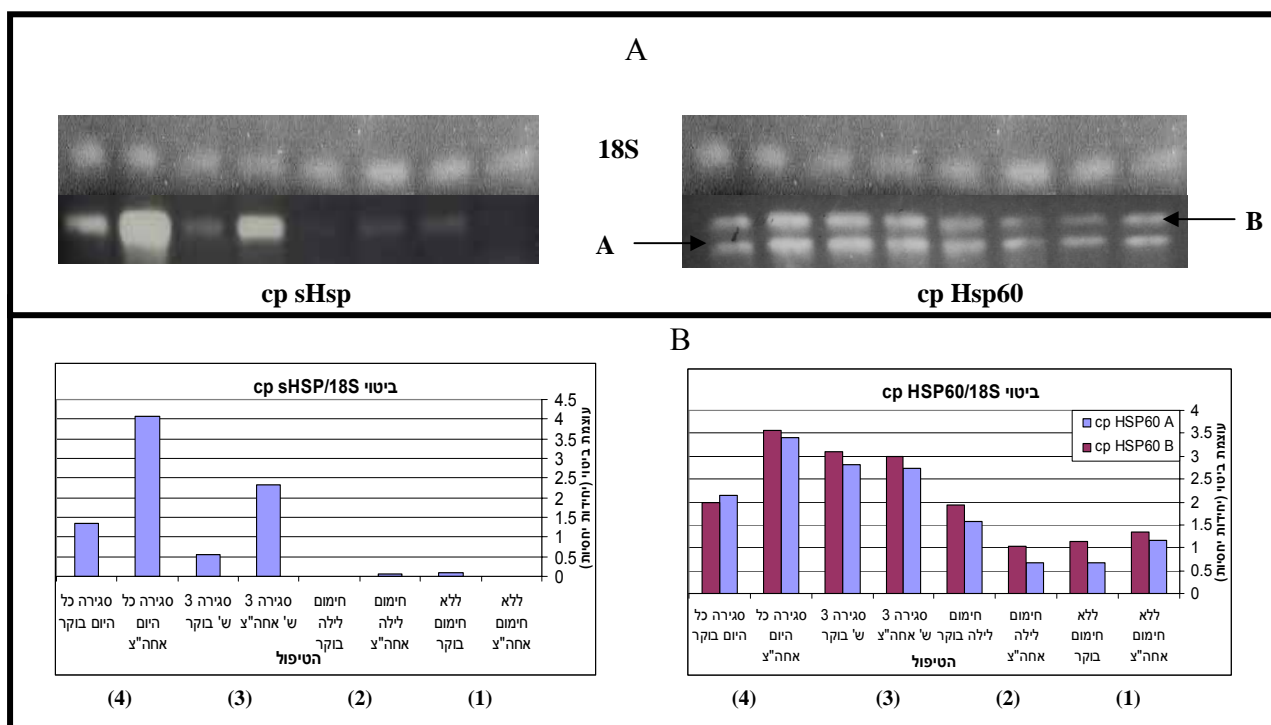
תרשים 4.1: אינדוקציה של חע"ח בעלים צעירים של צמחי פלפל בוגרים מזן סליקה, בתנאי קומפנסציה



רמת הביטוי נבחנה בעלים שנדגמו מצמחים בוגרים שנחשפו לתנאי חום וקור (סגירה 3 ש' או כל היום), בהשוואה לביקורות (ללא חימום או חימום לילה), כמתואר בפרק חומרים ושיטות. הביטוי ברמת ה-RNA נבדק בשיטת Semi quantitative RT-PCR עבור הגן הנבדק וגן הביקורת 18S rRNA והוצג באופן גרפי (A) והוצג באופן גרפי (B) ע"י כימות באמצעות התוכנה imageJ. עבור כל טיפול, הערך שהתקבל באמצעות התוכנה, חולק בערך שהתוכנה מדדה עבור גן הביקורת 18S rRNA. תאור הטיפולים בגרף מתייחס לאופי החימום ומועד דיגום העלים (חמש אחה"צ או למחרת בתשע בבוקר). התוצאות המוצגות כאן מהוות חזרה מייצגת מתוך שתי חזרות.

בתרשים 4.2 מסוכמות תוצאות הביטוי של sHsp ו- Hsp60 הכלורופלסטיים.

תרשים 4.2: אינדוקציה של חצי"ח בעלים צעירים של צמחי פלפל בוגרים מזן סליקה, בתנאי קומפנסציה



רמת הביטוי נבחנה בעלים שנדגמו מצמחים בוגרים שנחשפו לתנאי חום וקור (סגירה 3 ש' או כל היום), בהשוואה לביקורות (ללא חימום או חימום לילה), כמתואר בפרק חומרים ושיטות. הביטוי ברמת ה- RNA נבדק בשיטת Semi quantitative PCR עבור הגן הנבדק וגן הביקורת 18S rRNA (A) והוצג באופן גרפי (B) ע"י כימות באמצעות התוכנה imageJ. עבור כל טיפול, הערך שהתקבל באמצעות התוכנה, חולק בערך שהתוכנה מדדה עבור גן הביקורת 18S rRNA. תאור הטיפולים בגרף מתייחס לאופי החימום ומועד דיגום העלים (חמש אחה"צ או למחרת בתשע בבוקר). התוצאות המוצגות כאן מהוות חזרה מייצגת מתוך שתי חזרות.

מתוך התוצאות המוצגות בתרשימים 4.1 - 4.2 ניתן לראות:

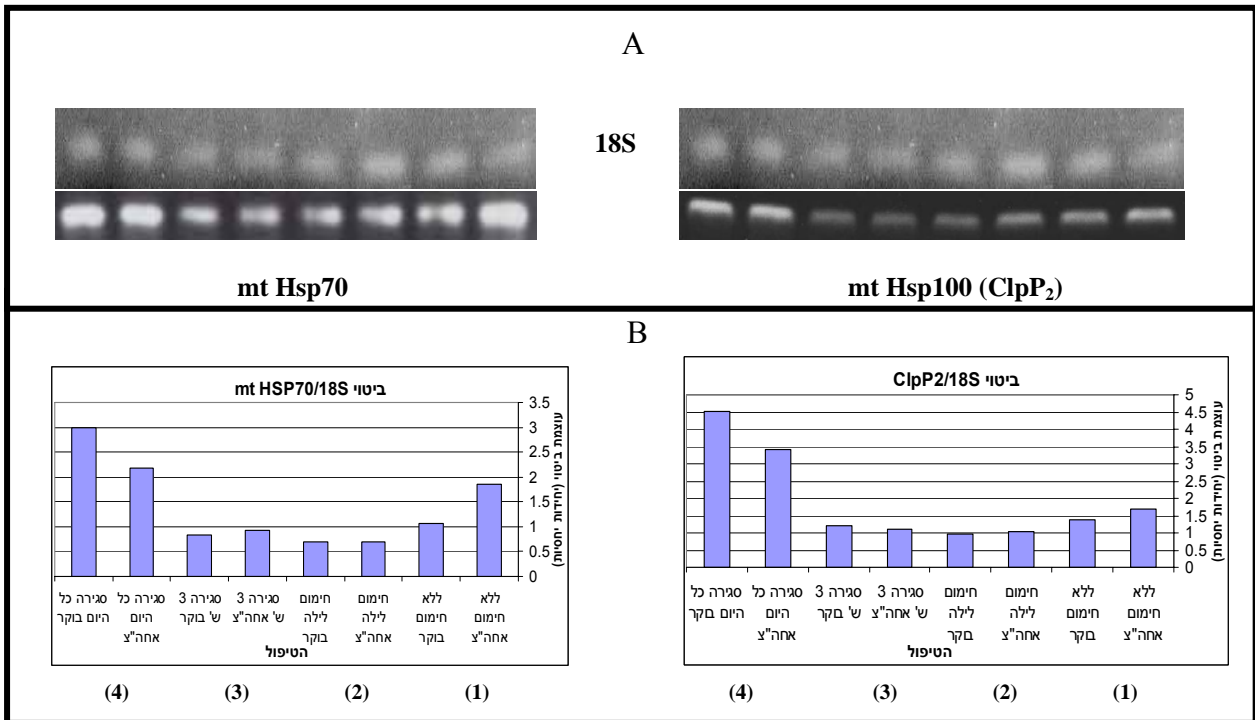
- א. התעתיקים הנ"ל לא היו בעלי ביטוי קונסטיטוטיבי והם התבטאו בעלים בכל הטיפולים שנבדקו למעט התעתיק המקודד ל- sHsp הכלורופלסטי, שהיה בעל ביטוי אפסי בחממות הביקורת.
- ב. התעתיקים עברו אינדוקציה בחממות הקומפנסציה וככל הנראה הם מקודדים לחלבונים המעורבים במנגנון זה. שיא הביטוי היה בחממה מס' 4, שם תנאי העקה חמורים יותר, מכיוון שהחממה סגורה כל היום, וחשופה לתנאי קור בלילה.
- ג. התעתיקים הציטופלסמטיים עברו אינדוקציה חלשה יותר גם בעקבות חשיפה לתנאי קור בלבד.
- ד. התעתיק המקודד ל- sHsp הציטופלסמטי מסוג Class I אינו מקודד לחלבון שנבדק, מכיוון שהחלבון אינו מתבטא כלל בצמחים הבוגרים (ראו סעיף מס' 6 בפרק זה).
- ה. התעתיק המקודד ל- sHsp הציטופלסמטי מסוג Class II אינו מקודד לחלבון שנבדק, מכיוון שהתעתיק עובר אינדוקציה גם בעקבות חשיפה לתנאי קור בלבד, בשונה מן התעתיק.

1. התעתיקים המקודדים ל - Hsp60 הכלורופלסטיים עברו אינדוקציה בחממות הקומפנסציה בצמחים בוגרים אך לא בצמחים צעירים, שם לא נצפתה אינדוקציה של התעתיקים בעקבות חשיפה לתנאי חום.

**ב. אינדוקציה של חע"ח בעקבות חשיפה לעקה חמורה:**

בתרשים 4.3 מסוכמות תוצאות הביטוי של Hsp70 ו - Hsp100 המיטוכונדריאליים

תרשים 4.3 אינדוקציה של חע"ח בעלים צעירים של צמחי פלפל בוגרים מזן סליקה, בתנאי עקה חמורה



רמת הביטוי נבחנה בעלים שנדגמו מצמחים בוגרים שנחשפו לתנאי חום וקור (סגירה 3 ש' או כל היום), בהשוואה לביקורות (ללא חיסום או חיסום לילה), כמתואר בפרק חומרים ושיטות. הביטוי ברמת ה - RNA נבדק בשיטת Semi quantitative RT-PCR עבור הגן הנבדק וגן הביקורת 18S rRNA (A) והוצג באופן גרפי (B) ע"י כימות באמצעות התוכנה imageJ. עבור כל טיפול, הערך שהתקבל באמצעות התוכנה, חולק בערך שהתוכנה מדדה עבור גן הביקורת 18S rRNA. תאור הטיפולים בגרף מתייחס לאופי החיסום ומועד דיגום העלים (חמש אחה"צ או למחרת בתשע בבוקר). התוצאות המוצגות כאן מהוות חזרה מייצגת מתוך שתי חזרות.

מתוך התוצאות המוצגות בתרשים 4.3 ניתן לראות:

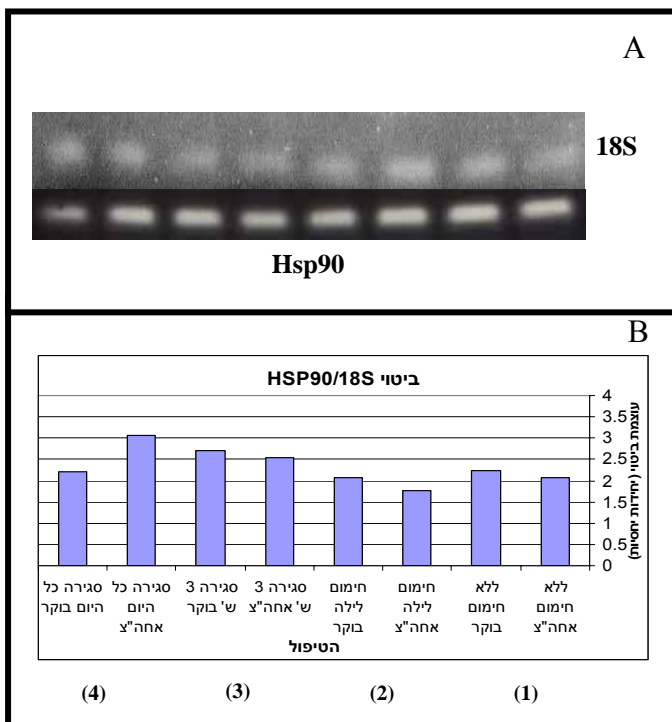
- א. התעתיקים התבטאו בעלים בכל הטיפולים שנבדקו, והם לא היו בעלי ביטוי קונסטיטויטיבי.
- ב. בשתי החזרות שנבדקו, שיא הביטוי של התעתיקים היה בחממת הקומפנסציה מס' 4, בשונה מן המצב בחממת הקומפנסציה מס' 3.
- ג. מכיוון שהתעתיק עובר אינדוקציה בחממת הקומפנסציה מס' 4 אך לא בחממה מס' 3, ניתן להסיק שהוא מקודד לחלבון שכל הנראה, הוא בעל מעורבות חלקית במנגנון הקומפנסציה.

ד. ככל הנראה, האינדוקציה בחממה מס' 4 נובעת מחשיפה לתנאי עקה חמורים (חימום ביום ללא אוורור, וחשיפה לקור בלילה). ייתכן שאם היינו מחממים את חממה מס' 3 לטמפי גבוהות יותר, התעתיק היה עובר אינדוקציה גם בחממה זו.

### ג. ביטוי קונסטיטוטיבי של חע"ח:

בתרשים 4.4 מסוכמות תוצאות הביטוי של Hsp90 בציטופלסמה ובכלורופלסט

תרשים 4.4 ביטוי קונסטיטוטיבי של חע"ח בעלים צעירים של צמחי פלפל בוגרים



רמת הביטוי נבחנה בעלים שנדגמו מצמחים בוגרים שנחשפו לתנאי חום וקור (סגירה 3 ש' או כל היום), בהשוואה לביקורות (ללא חימום או חימום לילה), כמתואר בפרק חומרים ושיטות. הביטוי ברמת ה-RNA נבדק בשיטת Semi quantitative RT-PCR עבור הגן הנבדק וגן הביקורת 18S rRNA (A) והוצג באופן גרפי (B) ע"י כימות באמצעות התוכנה imageJ. עבור כל טיפול, הערך שהתקבל באמצעות התוכנה, חולק בערך שהתוכנה מדדה עבור גן הביקורת 18S rRNA. תאור הטיפולים בגרף מתייחס לאופי החימום ומועד דיגום העלים (חמש אחה"צ או למחרת בתשע בבוקר). התוצאות המוצגות כאן מהוות חזרה מייצגת מתוך שתי חזרות.

מתוך התוצאות המוצגות בתרשים 4.4 ניתן לראות:

- א. התעתיק Hsp90 הציטופלסמטי/כלורופלסטי התבטא בעלים בכל הטיפולים שנבדקו. בשתי החזרות שנבדקו, עוצמת הביטוי הייתה דומה בכל הטיפולים.
- ב. מכיוון שהתעתיק הוא בעל ביטוי גבוה יחסית גם בחממות הביקורת, ניתן להסיק שהתעתיק מוקדם לחלבון שכל הנראה, אינו מעורב במנגנון הקומפנסציה.

נבדקה גם רמת הביטוי של תעתיקים נוספים, ולא נמצא דגם ביטוי שיכול להעיד על מעורבותם במנגנון הקומפנסציה, ולכן התוצאות אינן מוצגות כאן.

## **סיכום תוצאות בחינת רמת הביטוי של חע"ח ברמת ה - RNA בעלים צעירים של צמחים בוגרים בתגובה לחשיפה לקור ולחשיפה משולבת לתנאי חום וקור (תנאי חממה):**

מתוך התוצאות המוצגות בניסוי זה, ניתן להסיק כי:

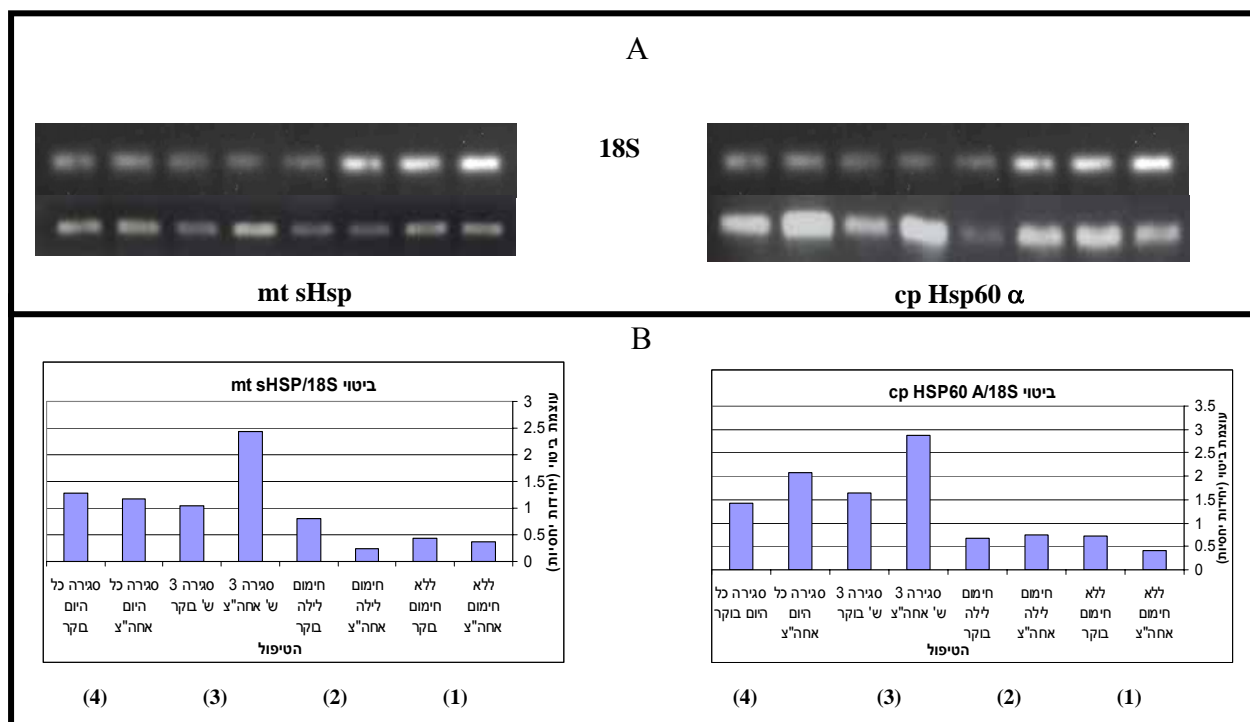
- א. התעתיקים שמייצגים sHsp's בציטופלסמה ובכלורופלסט והתעתיקים שמקודדים ל - Hsp60 בכלורופלסט מקודדים ככל הנראה לחלבונים המעורבים במנגנון הקומפנסציה בעלים צעירים.
- ב. התעתיקים שמקודדים ל - sHsp's, למעט התעתיק הכלורופלסטי, עוברים אינדוקציה בעקבות חשיפה לתנאי קור בלבד.
- ג. התעתיק שמקודד ל - sHsp הכלורופלסטי אינו מקודד לחלבון שנבדק בשיטת Western blot (ראו סעיף 6 בפרק זה) מכיוון שהחלבון מתבטא בחממות הביקורת, בניגוד לתעתיק.
- ד. התעתיק שמקודד ל - sHsp הציטופלסמטי מסוג Class II אינו מקודד לחלבון שנבדק בשיטת Western blot (ראו סעיף 6 זה) מכיוון שהתעתיק, בשונה מן החלבון, עובר אינדוקציה בעקבות חשיפה לתנאי קור בלבד.
- ה. התעתיקים המקודדים ל - Hsp100 ו - Hsp70 המיטוכונדריאליים עוברים אינדוקציה חזקה בחממת הקומפנסציה מס' 4, שסגורה כל היום, וחשופה לקור בלילה. ייתכן שהם עוברים אינדוקציה רק בעקבות חשיפה לעקה חמורה במיוחד.

## **5. ביטוי חלבוני עקת חום ברמת ה - RNA באבקה של צמחים בוגרים בתנאי חממה, המשלבים חשיפה לתנאי קור בלילה ולתנאי חום ביום**

לאחר לימוד פרופיל הביטוי של חע"ח בצמחים צעירים, נבדקו רמות ביטוי של חע"ח בצמחים בוגרים, בתנאי חממה. ביטוי חע"ח נבדק בגרגירי אבקה שבודדו מפקעי פריחה בשלבים המאוחרים שלאחר המיזוזה, בדרגות ההתפתחות 4/5 - A. צמחים בוגרים בני חצי שנה גודלו בארבע חממות שבהן הצמחים נחשפו לתנאים אופטימאליים, לתנאי קור בלילה ולתנאים של חום ביום וקור בלילה, כמתואר בפרק חומרים ושיטות. מן הצמחים נדגמו פרחים שמהם הופקה אבקה. מן האבקה הופק RNA וע"ס תבנית ה - RNA סונתז cDNA, כמתואר בפרק חומרים ושיטות. הביטוי ברמת ה - RNA נבדק בשיטת Semi quantitative RT-PCR עבור הגן הנבדק וגן הביקורת 18S rRNA, כמתואר בפרק חומרים ושיטות. מועדי הדיגום היו בשעה 17:00 בערב ובשעה 9:00 בבוקר שלמחרת. תוצאות הניסוי מתוארות בתרשימים 5.1 - 5.2 בעמודים 41 - 42.

## א. אינדוקציה של חע"ח בחממות הקומפנסציה:

בתרשים 5.1 מסוכמות תוצאות הביטוי של plastid Hsp60  $\alpha$  subunit ו-sHsp המיטוכונדריאלי תרשים 5.1: אינדוקציה של חע"ח באבקה של צמחי פלפל בוגרים מזן סליקה, בתנאי קומפנסציה



רמת הביטוי נבחנה באבקה שנדגמה מצמחים בוגרים שנחשפו לתנאי חום וקור (סגירה 3 ש' או כל היום), בהשוואה לביקורות (ללא חימום או חימום לילה), כמתואר בפרק חומרים ושיטות. הביטוי ברמת ה-RNA נבדק בשיטת Semi quantitative RT-PCR עבור הגן הנבדק וגן הביקורת 18S rRNA (A) והוצג באופן גרפי (B) ע"י כימות באמצעות התוכנה imageJ. עבור כל טיפול, הערך שהתקבל באמצעות התוכנה, חולק בערך שהתוכנה מדדה עבור גן הביקורת 18S rRNA. תאור הטיפולים בגרף מתייחס לאופי החימום ומועד דיגום העלים (חמש אחה"צ או למחרת בתשע בבוקר). התוצאות המוצגות כאן מהוות חזרה מייצגת מתוך שתי חזרות.

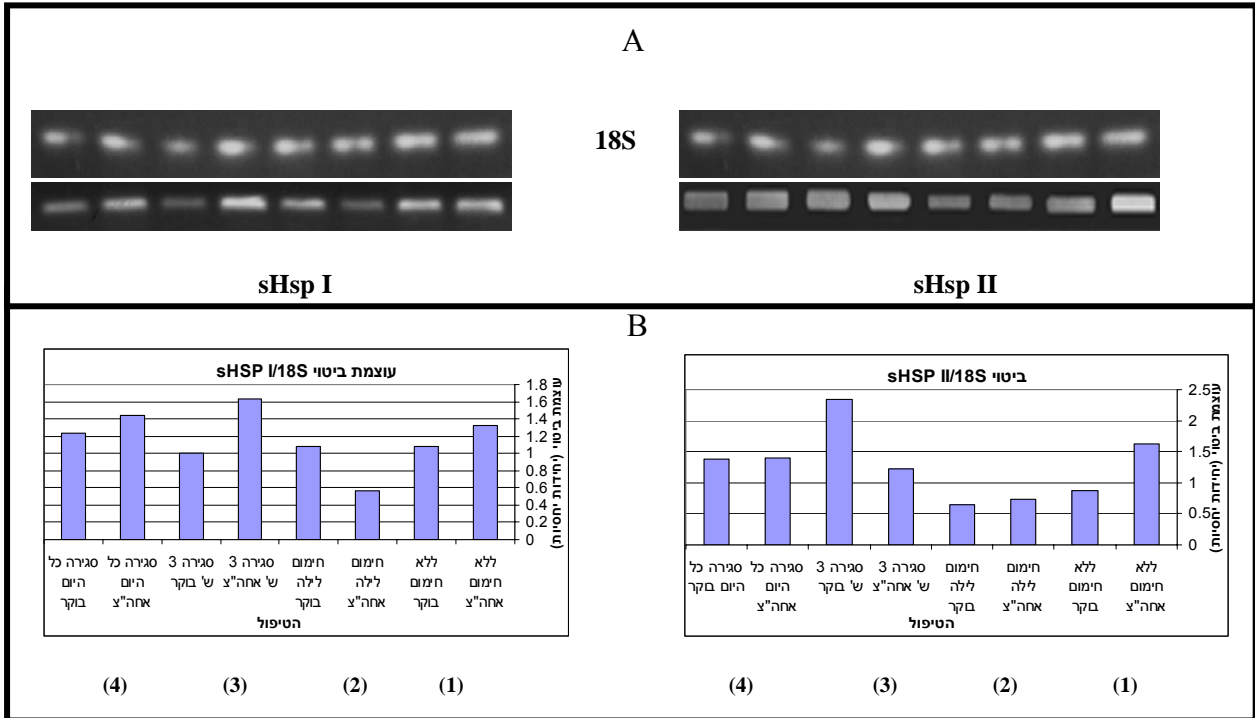
מתוך התוצאות המוצגות בתרשים 5.1 ניתן לראות:

- התעתיקים התבטאו באבקה בכל הטיפולים שנבדקו, והם לא היו בעלי ביטוי קונסטיטויבי.
- בשתי החזרות שנבדקו, נצפתה אינדוקציה בחממות הקומפנסציה, בהשוואה לחממות הביקורת.
- מכיוון שהתעתיקים הם בעלי ביטוי גבוה בחממות הקומפנסציה, ייתכן שהתעתיקים מקודדים לחלבונים שמעורבים במנגנון הקומפנסציה.

**ב. אינדוקציה של חע"ח בעקבות חשיפה לתנאי קור:**

בתרשים 5.2 מסוכמות תוצאות הביטוי של sHsp הציטופלסמטיים מסוג Class I ו-II

תרשים 5.2: אינדוקציה של חע"ח באבקה של צמחי פלפל בוגרים מזן סליקה, בתנאי קור



רמת הביטוי נבחנה באבקה שנדגמה מצמחים בוגרים שנחשפו לתנאי חום וקור (סגירה 3 ש' או כל היום), בהשוואה לביקורות (ללא חימום או חימום לילה), כמתואר בפרק חומרים ושיטות. הביטוי ברמת ה-RNA נבדק בשיטת Semi quantitative RT-PCR עבור הגן הנבדק וגן הביקורת 18S rRNA (A) והוצג באופן גרפי (B) ע"י כימות באמצעות התוכנה imageJ. עבור כל טיפול, הערך שהתקבל באמצעות התוכנה, חולק בערך שהתוכנה מדדה עבור גן הביקורת 18S rRNA. תאור הטיפולים בגרף מתייחס לאופי החימום ומועד דיגום העלים (חמש אחה"צ או למחרת בתשע בבוקר). התוצאות המוצגות כאן מהוות חזרה מייצגת מתוך שתי חזרות.

מתוך התוצאות המוצגות בתרשים 5.2 ניתן לראות:

- א. התעתיקים התבטאו באבקה בכל הטיפולים שנבדקו, והם לא היו בעלי ביטוי קונסטיטוטיבי.
- ב. בשתי החזרות שנבדקו, נצפה ביטוי מינימאלי בחממת הביקורת מס' 2 (חימום לילה), שבה תנאי הגידול אופטימאליים.
- ג. בשתי החזרות שנבדקו, נצפתה אינדוקציה גם בחממת הביקורת מס' 1 (ללא חימום), בנוסף לאינדוקציה שנצפתה בחממות הקומפנסציה.
- ד. ע"ס התוצאות הללו ניתן להסיק שהתעתיקים עוברים אינדוקציה גם בעקבות חשיפה לתנאי קור בלבד.
- ה. ככל הנראה, התעתיקים מקודדים לחלבונים שאינם מעורבים במנגנון הקומפנסציה, מכיוון שהם עוברים אינדוקציה גם בעקבות חשיפה לתנאי קור בלבד.

נבדקה גם רמת הביטוי של תעתיקים נוספים, ולא נמצא דגם ביטוי שיכול להעיד על מעורבותם במנגנון הקומפנסציה, ולכן התוצאות אינן מוצגות כאן.



## **סיכום תוצאות בחינת רמת הביטוי של חע"ח ברמת ה - RNA באבקה של צמחים בוגרים בתגובה לחשיפה לקור ולחשיפה משולבת לתנאי חום וקור (תנאי חממה):**

מתוך התוצאות המוצגות בניסוי זה, ניתן להסיק כי:

- א. התעתיקים שמייצגים sHsp's ציטופלסמטיים, בשונה מן ההתעתיק המיטוכונדריאלי, מקודדים ככל הנראה לחלבונים שאינם מעורבים במנגנון הקומפנסציה באבקה.
- ב. התעתיק שמייצג sHsp מיטוכונדריאלי, אינו מקודד לחלבון שנבדק בשיטת Western blot (ראו סעיף 6 בפרק זה), מכיוון שהחלבון כמעט ולא מתבטא באבקה.
- ג. התעתיק שמייצג את Hsp60 הפלסטידי מן הסוג תת היחידה  $\alpha$ , מקודד ככל הנראה לחלבון המעורב במנגנון הקומפנסציה בעלים ובאבקה.
- ד. התעתיקים שמייצגים sHsp's ציטופלסמטיים עוברים אינדוקציה בעקבות חשיפה לתנאי קור בלבד.
- ה. הן באבקה והן בעלים, מרבית התעתיקים שמייצגים חע"ח גבה מולקולאריים, מקודדים כפי הנראה, לחלבונים שאינם מעורבים במנגנון הקומפנסציה.
- ו. באבקה, בשונה מן המצב בעלים, מרבית התעתיקים שמייצגים חע"ח קטן מולקולאריים, מקודדים כפי הנראה, לחלבונים שאינם מעורבים במנגנון הקומפנסציה.

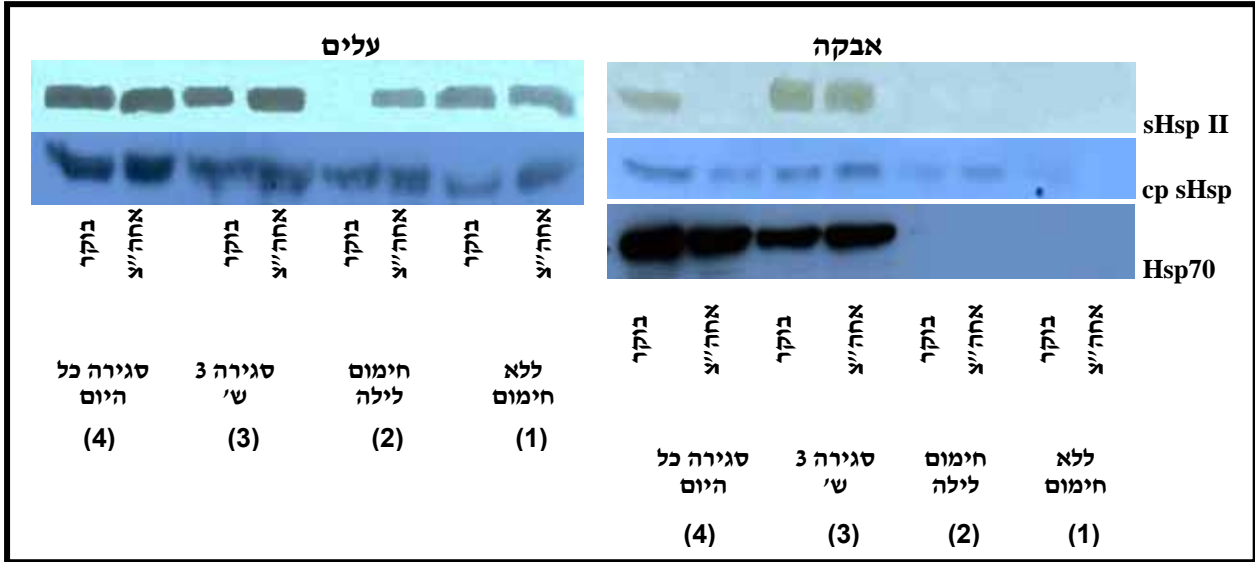
### **6. ביטוי חלבוני עקת חום ברמת החלבון בעלים ואבקה של צמחים בוגרים בתנאי חממה, המשלבים חשיפה לתנאי קור בלילה ולתנאי חום ביום**

לאחר לימוד פרופיל הביטוי של חע"ח בצמחים צעירים, נבדקו רמות ביטוי של חע"ח בצמחים בוגרים, בתנאי חממה. ביטוי חע"ח נבדק בגרגירי אבקה שבודדו מפקעי פריחה בשלבים המאוחרים שלאחר המיזוזה, בדרגות ההתפתחות A-4/5, ובעלים צעירים. צמחים בוגרים בני חצי שנה גודלו בארבע חממות שבהן הצמחים נחשפו לתנאים אופטימאליים, לתנאי קור בלילה ולתנאים של חום ביום וקור בלילה, כמתואר בפרק חומרים ושיטות. מן הצמחים נדגמו עלים והופקה מהם אבקה. מועדי הדיגום היו בשעה 17:00 בערב ובשעה 9:00 בבוקר שלמחרת. מן העלים והאבקה הופק חלבון ונבדקה תגובה עם נוגדנים בשיטת Western Blot, כמתואר בפרק חומרים ושיטות. תוצאות הניסוי מתוארות בתרשימים 6.1 - 6.3 בעמודים 44 - 45.

**א. אינדוקציה של חע"ח בחממות הקומפנסציה:**

בתרשים 6.1 מסוכמות תוצאות הביטוי של sHsp ציטופלסמטי מסוג Class II, sHsp כלורופלסטי ו - Hsp70.

תרשים 6.1: אינדוקציה של חע"ח בעלים ובאבקה של צמחים בוגרים מזן סליקה, בתנאי קומפנסציה



רמת הביטוי נבחנה בעלים שנדגמו מצמחים בוגרים שנחשפו לתנאי חום וקור (סגירה 3 ש' או כל היום), בהשוואה לביקורות (ללא חימום או חימום לילה), כמתואר בפרק חומרים ושיטות. הביטוי ברמת החלבון נבדק בשיטת Western Blot. תיאור הטיפולים בגרף מתייחס לאופי החימום ומועד דיגום העלים (חמש אחה"צ או למחרת בתשע בבוקר). התוצאות המוצגות כאן מהוות חזרה מייצגת מתוך שתי חזרות.

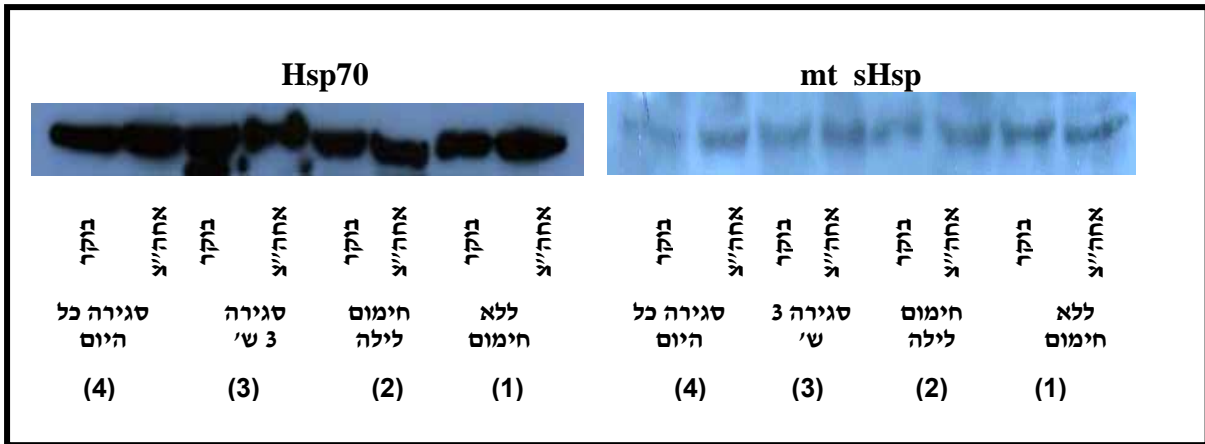
מתוך התוצאות המוצגות בתרשים 6.1 ניתן לראות:

- א. החלבונים sHsp הכלורופלסטי והציטופלסמטי מסוג Class II עוברים אינדוקציה בחממות הקומפנסציה בעלים ובאבקה והחלבון Hsp70 עובר אינדוקציה בחממות הקומפנסציה רק באבקה.
- ב. באבקה, החלבונים הם בעלי ביטוי אפסי בחממות הביקורת. החלבונים sHsp הציטופלסמטי מסוג Class II ו - Hsp70 עוברים אינדוקציה חזקה מאוד בתנאי קומפנסציה.
- ג. החלבון sHsp הכלורופלסטי עובר אינדוקציה חזקה בעלים בחממה מס' 4, שם תנאי העקה חמורים ביותר, מכיוון שהחממה סגורה כל היום, וחשופה לתנאי קור בלילה. חלבון זה מתבטא באבקה על אף שהיא אינה מכילה כלורופלסטים. ככל הנראה, חלבון זה מתבטא בעמילופלסטים של אבקה.
- ד. החלבון sHsp הציטופלסמטי מסוג Class II לא התבטא בשעות הבוקר, בעלים של צמחים ששהו בחממת הביקורת מס' 2 (חימום לילה) בשתי החזרות שנבדקו. החלבון לא התבטא בשעות הערב, באבקה של צמחים ששהו בחממת הקומפנסציה מס' 4, בשתי החזרות שנבדקו.

**ב. ביטוי קונסטיטוטיבי של חע"ח בעלים:**

בתרשים 6.2 מסוכמות תוצאות הביטוי של Hsp70 ו-sHsp המיטוכונדריאלי.

תרשים 6.2: ביטוי קונסטיטוטיבי של חע"ח בעלים צעירים של צמחי פלפל בוגרים מזן סליקה



רמת הביטוי נבחנה באבקה ובעלים שנדגמו מצמחים בוגרים שנחשפו לתנאי חום וקור (סגירה 3 ש' או כל היום), בהשוואה לביקורות (ללא חימום או חימום לילה), כמתואר בפרק חומרים ושיטות. הביטוי ברמת החלבון נבדק בשיטת Western Blot. תיאור הטיפולים בגרף מתייחס לאופי החימום ומועד דיגום העלים (חמש אחה"צ או למחרת בתשע בבוקר). התוצאות המוצגות כאן מהוות חזרה מייצגת מתוך שתי חזרות.

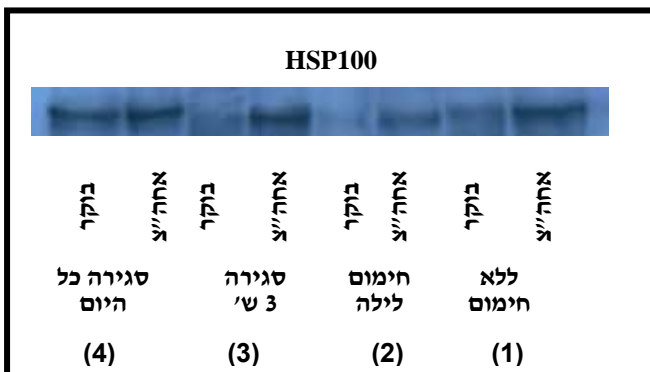
מתוך התוצאות המוצגות בתרשים 6.2 ניתן לראות:

- א. החלבונים Hsp70 ו-sHsp המיטוכונדריאלי הם בעלי עוצמת ביטוי דומה בעלים, בכל הטיפולים שנבדקו. החלבונים לא עוברים אינדוקציה בעקבות חשיפה לקור או חשיפה לתנאים משולבים של חום וקור, בעלים צעירים של צמחי סליקה בוגרים.
- ב. החלבון Hsp70 התבטא בעוצמה חזקה בכל הטיפולים.

**ג. אינדוקציה של חע"ח בעלים, בעקבות חשיפה לתנאי קור:**

בתרשים 6.3 מסוכמות תוצאות הביטוי של Hsp100.

תרשים 6.3: אינדוקציה של חע"ח בעקבות חשיפה לקור בעלים צעירים של צמחי פלפל בוגרים מזן סליקה



רמת הביטוי נבחנה בעלים שנדגמו מצמחים בוגרים שנחשפו לתנאי חום וקור (סגירה 3 ש' או כל היום), בהשוואה לביקורות (ללא חימום או חימום לילה), כמתואר בפרק חומרים ושיטות. הביטוי ברמת החלבון נבדק בשיטת Western Blot. תיאור הטיפולים בגרף מתייחס לאופי החימום ומועד דיגום העלים (חמש אחה"צ או למחרת בתשע בבוקר). התוצאות המוצגות כאן מהוות חזרה מייצגת מתוך שתי חזרות.

מתוך התוצאות המוצגות בתרשים 6.3 ניתן לראות:

- א. חלבון זה עובר אינדוקציה בעלים בעקבות חשיפה לקור ולתנאים משולבים של חום וקור, בהשוואה לביטוי עקב חשיפה לתנאים אופטימאליים (חממת ביקורת מס' 2).
- ב. בשתי החזרות שנבדקו, הביטוי המינימאלי של חלבון זה בעלים, היה בשעות הבוקר בחממה מס' 2.
- ג. בשתי החזרות שנבדקו עבור ביטוי החלבון בעלים בחממה מס' 1 (תנאי קור במהלך הלילה), הביטוי היה חזק יותר בשעות הערב, מאשר בשעות הבוקר שהיו סמוכות למועד החשיפה לקור.

נבדקו גם רמות הביטוי של sHsp הציטופלסמטי Class I בעלים ובאבקה, ושל sHsp המיטוכונדריאלי ו- Hsp100 באבקה. נמצא שהחלבונים הללו לא מתבטאים ברקמות הנ"ל ולכן התמונות אינן מוצגות.

### **סיכום תוצאות בחינת רמת הביטוי של חע"ח ברמת החלבון בעלים צעירים ובאבקה של צמחים בוגרים בתגובה לחשיפה לקור ולחשיפה משולבת לתנאי חום וקור (תנאי חממה):**

מתוך התוצאות המוצגות בניסוי זה, ניתן להסיק כי:

- א. החלבונים Hsp70 ו- sHsp המיטוכונדריאלי מתבטאים בעלים צעירים בכל הטיפולים באופן דומה. המצב היה שונה כאשר החלבונים הללו נבדקו בעלים של צמחים צעירים, שבהם נצפתה אינדוקציה בעקבות חשיפה לחום.
- ב. ניתן להסיק שהחלבונים Hsp70 ו- sHsp המיטוכונדריאלי אינם מעורבים במנגנון הקומפנסציה (הגנה מפני קור בעקבות חשיפה לקור) בעלים, מכיוון שהם לא עוברים אינדוקציה בחממות מס' 3 ו- 4.
- ג. גם החלבון Hsp100 אינו מעורב ככל הנראה במנגנון הקומפנסציה בעלים, מכיוון שהוא עובר אינדוקציה גם בעקבות חשיפה לקור בלבד, בדומה למצב בחממות מס' 3 ו- 4.
- ד. ככל הנראה, החלבונים sHsp הציטופלסמטי מסוג Class II ו- sHsp הכלורופלסטי מעורבים במנגנון הקומפנסציה בעלים, מכיוון שהם עוברים אינדוקציה בחממות מס' 3 ו- 4, בהשוואה לחממות הביקורת.
- ה. sHsp הכלורופלסטי אינו עובר אינדוקציה בעקבות חשיפה לחום בעלים של צמחים צעירים כלומר, צמחים צעירים וצמחים בוגרים מתנהגים באופן שונה בעקבות חשיפה לתנאי חום.
- ו. ככל הנראה, החלבונים sHsp הציטופלסמטי מסוג Class II, sHsp הפלסטידי ו- Hsp70 מעורבים במנגנון הקומפנסציה באבקה, מכיוון שהם עוברים אינדוקציה בחממות מס' 3 ו- 4, בהשוואה לחממות הביקורת.

## ו. דיון ומסקנות

מעורבות חציית בתגובה והגנה מפני נזקי עקות אביוטיות היא מנגנון שמור מאוד בטווח רחב של אורגניזמים (Vierling, 1991). לעניות דעתנו, עד לעבודה זו, לא תועד ביטוי של חציית באבקה של פלפל כלל. במסגרת העבודה הנוכחית נבדק ביטויים של נציגים מכל משפחות חציית הידועים, כאשר דגש מיוחד הושם על בדיקת ביטוי חלבוני עקת חום (ברמת החלבון) בעלי משקל מולקולארי נמוך - sHsp's, היות ומשפחת חציית זו היא הנפוצים והמגוונים ביותר מבחינת רצף, תפקוד ומיקום בתא בתגובה לעקה (Vierling, 1991). ממשפחה זו נבחרו שני נציגים ציטופלסמטיים (sHsp Class I/II), נציג מיטוכונדריאלי

ונציג כלורופלסטי. ברמת החלבון, נבדקו גם נציגים ציטופלסמטיים של Hsp100 ו- Hsp70.

ברמת ה-RNA, נבדקו נציגי sHsp's ונציג ה- Hsp70 המוזכרים להלן. בנוסף לכך נבדקו נציגים נוספים ל- Hsp70 ו- Hsp100 ונציגים למשפחות Hsp60 ו- Hsp90. בכל משפחה נבדקו נציגים המייצגים חלוקה לתת משפחות ע"פ מיקומם באורגנלות השונות בתא (ציטוזול, מיטוכונדריה, כלורופלסט ו- Hsp90 ב- ER). הנציגים נבחרו על פי רצפים שמורים בין בני תת המשפחה. הגנים המקודדים ל- Hsp's בפלפל עדיין לא בודדו בשלמות והם קיימים רק כרצפי TC (Tetative Consensus) חלקיים במאגר המידע TIGR (ראו פירוט בנספח ב').

יוצא מן הכלל הוא רצף המקודד ל- sHsp כלורופלסטי (ראו פירוט בנספח ב' סעיף ב' תת סעיף מס' 4). בנוסף לכך, תוכנו פריימרים עבור מקטע המייצג Hsp70 כלורופלסטי בעגבנייה מכיוון שהגן בפלפל לא בודד. רצף המקטע שהתקבל בפלפל במסגרת עבודה זו, הוא בבחינת רצף חלקי של גן חדש והוא פורסם באתר NCBI (ראו פירוט בנספח ב' סעיף ד' תת סעיף מס' 3). כל תוצאות הריצוף עבור חציית שהתקבלו במסגרת עבודה זו, פורסמו במאגר המידע NCBI.

במסגרת המחקר בוצעו ניסויי דעיכה שמטרתם הייתה ללמוד על התנהגות חציית בפלפל. ברמת החלבון, נצפתה אינדוקציה של sHsp's, Hsp70 ו- Hsp100 בעקבות חשיפה לחום, בהשוואה לתנאי ביקורת (ראו פירוט בפרק התוצאות סעיף מס' 3). תופעה מעניינת שנצפתה בהקשר של ביטוי חציית ממשפחת sHsp's היא הקורלציה בין רמות ביטוי sHsp Class II הציטופלסמטי לאלו של Hsp100 ו- Hsp70. נציגי המשפחות האלו מראים אינדוקציה ברורה בעקבות חשיפה לחום. בכל המקרים הללו, שיא הביטוי היה כ- 3 שעות מתום חימום בטמפי של 40°C למשך 3 שעות. עובדה זו מעניינת שכן מקשרים את פעילות Hsp100 ו- Hsp70 לזו של sHsp's והראו שיחסי גומלין מתקיימים ביניהם:

חלבוני sHsp's יוצרים גרנולות (HSG's) עם חלבונים שעברו דנטורציה. גרנולות בקוטר 40 ננומטר לערך נוצרות בעת חשיפה ממושכת לחום וביחס ישר למידת ההצטברות של חלבונים דנטורטיביים בתא (Low et al, 2000). גרנולות כאלה זוהו בכמה מינים של צמחים ובסוגים שונים של רקמות כולל עוברים ואבקה (Smykal et al, 2000). לאחרונה הראו כי Hsp100 משחרר חלבונים מתוך הגרנולות שיוצרים חלבונים מסוג sHsp's. במוטנטים שאינם מבטאים Hsp100, הגרנולות אינן מתפרקות ו- sHsp's אינם משתחררים חזרה לפאזה המסיסה (Lee et al, 2005). הממצאים שלנו שמראים אינדוקציה של sHsp's ושל Hsp100 בעלים של פלפל, מוצאים חיזוק בקיום יחסי גומלין אלו ביניהם.

מרכיב חשוב נוסף בפעילות קיפול חלבונים שעברו אגרגציה או אלו המיוצבים על ידי sHsp's בתוך או מחוץ לגרנולות הוא Hsp70. על פי המנגנון המוצע שחרור חלבונים אלו מ - sHsp's גורר בעקבותיו קיפול תקין של החלבונים הדנטורטיביים על ידי חלבוני Hsp70 שملווים בצ'אפרון הנלווה Hsp40 (Smykal et al, 2000).

ברמת ה - RNA, כלל ה - sHsp's עוברים אינדוקציה בעקבות חשיפה לחום, בעוד שיתר התעתיקים שנבדקו אינם עוברים אינדוקציה (ראו פירוט בפרק התוצאות סעיף מס' 2). נצפו הבדלים בהתנהגות sHsp's ברמת החלבון וברמת ה - RNA. ברמת החלבון, שיא הביטוי היה כ - 3 שעות מתום החימום בעוד שברמת ה - RNA, שיא הביטוי היה מיד בתום החימום. מכאן ניתן להסיק שקיימת תגובת ביטוי מיידי של sHsp's בעקבות תגובה לחום ולחלבון לוקח זמן להצטבר בתא. מסיבה זו ה - RNA מקדים את החלבון. יוצא מן הכלל היה sHsp כלורופלסטי שלא עבר אינדוקציה בעקבות חשיפה לחום ברמת החלבון אלא ברמת ה - RNA.

לחלבונים ממשפחת sHsp's המתבטאים באורגנלות השונות תפקידים שונים ומגוונים. לבני משפחה זו תפקיד חשוב בהגנה על חלבונים הנמצאים בתהליכי עריכה ב - ER, הגנה על קומפלקס מעבר האלקטרונים במיטוכונדריה והגנה על PSII בכלורופלסט (Vierling, 1991). התעתיק הכלורופלסטי שנבדק עבר אינדוקציה בחום וככל הנראה הוא מקודד לחלבון שעובר אינדוקציה בעקבות חשיפה לחום. בדומה להבדל שנצפה בין התעתיק המקודד ל - sHsp הכלורופלסטי לבין החלבון, נצפה הבדל בין התעתיק המקודד ל - Hsp70 הציטופלסמטי לבין החלבון. בניגוד לתעתיק, החלבון עבר אינדוקציה (ראו תרשים מס' 3.1).

לאחר לימוד פרופיל הביטוי של חע"ח בפלפל באמצעות ניסויי דעיכה, נבחנה מעורבותם במנגנון הקומפנסציה (הגנה מפני עקת קור ע"י חשיפה מוקדמת לתנאי חום מתונים). הגנה מפני קור ע"י חימום נבדקה במערכות צמחיות שונות כגון תירס (Gong M. et al, 2001) ואורז (Saltveit M. E., 2002). כאשר צמחי פלפל נחשפו לתנאי חום ביום ולתנאי קור בלילה, הם היו גבוהים יותר ומשקלם היה גבוה יותר בהשוואה לצמחים ששהו בתנאי קור בלילה בלבד (ראו פירוט בפרק התוצאות סעיף מס' 1). בהקשר של ביטוי חע"ח והגנה מפני קור ע"י חימום מוקדם, נבדקה מערכת של פירות עגבנייה. בפירות עגבנייה הראו שחימום מוקדם גרם להצטברות של חלבוני עקת חום קטן - מולקולאריים שכלל הנראה, הם אלו שהגדילו את עמידות הפירות לקור (Sabehat A. et al, 1998). אנחנו בדקנו את ההקשר של חע"ח והגנה מפני קור ע"י חימום במערכת של פלפל.

כאשר נבדקה רמת הביטוי של חע"ח בעלים צעירים של צמחים בוגרים בחממות הקומפנסציה, בהשוואה לחממות הביקורת התקבלו התוצאות הבאות. החלבונים sHsp Class II הציטופלסמטי, sHsp הכלורופלסטי ו - Hsp100 עברו אינדוקציה בחממות הקומפנסציה (ראו תרשימים מס' 6.1 ו - 6.3). Hsp100 עבר אינדוקציה גם בעקבות חשיפה לקור בלבד. נצפה הבדל בהתנהגות החלבונים Hsp70 ו - sHsp המיטוכונדריאלי, שעברו אינדוקציה בחום בעלים של צמחים צעירים, בעוד שבצמחים הבוגרים הם היו בעלי ביטוי קונסטיטוטיבי (ראו תרשימים מס' 3.1 ו - 6.2). ייתכן שהחלבונים sHsp המיטוכונדריאלי ו - Hsp70 נחוצים לפעילות תאית נורמאלית של עלים צעירים בצמחים בוגרים של פלפל,

ולכן הם בעלי ביטוי קונסטיטוטיבי. לחוסר האינדוקציה של החלבון Hsp70, בניגוד לחלבוני sHsp's ו- Hsp100, ייתכנו כמה הסברים. ייתכן והרמה הבזאלית של Hsp70 מספיקה כדי להבטיח קיפול נכון של חלבונים שיוצבו על ידי sHsp's. ידוע שבזמן עקת חום תרגום mRNA ויצירת חלבונים חדשים נפסק כמעט כליל (Maestri et al, 2002). במהלך התאוששות מעקה, פעולת Hsp70 להגנה על חלבונים חדשים בתהליך סינתזה נמצאת בתחרות על קיפול מחדש של חלבונים שנפגעו בחום. היות והתחרות מצד מערכת התרגום קטנה ביותר במהלך החשיפה לעקה, מתפנים צ'אפרוני Hsp70 להגנה על חלבונים שעברו דנטורציה. עקב כך, ייתכן והאינדוקציה לייצור Hsp70 היא קטנה יחסית. אפשרות נוספת היא שקיימת אינדוקציה לביטוי איזופורמים ספציפיים של Hsp70 אשר הנם פעילים במיוחד בתנאי עקה, בדומה לאלו שאופיינו בתירס (Galiardi et al, 1995).

ברמת ה-RNA, תעתיקים המייצגים sHsp's עברו אינדוקציה בחממות הקומפנסציה (ראו תרשימים מס' 2 - 4.1). התעתיקים הציטופלסמטיים עברו אינדוקציה בעקבות חשיפה לקור בלבד, ברמה נמוכה יותר מזו של חממות הקומפנסציה.

אספקט מעניין אחר המתקבל מתוצאות עבודה זו הוא רמות הביטוי של Hsp60 (Chaperonin 60). שני הגנים הכלורופלסטיים עברו אינדוקציה בחממות הקומפנסציה בדומה לתעתיק sHsp הכלורופלסטי (ראו תרשים מס' 4.2). בצמחים, עד היום לא נמצאה קורלציה בין ביטוי Hsp60 ל-sHsp's, למעט בעבודה קודמת שבוצעה במעבדתנו, שם נמצאה אינדוקציה של Hsp60 ו-sHsp's בצמחי עגבנייה, בעקבות חשיפה לחום. באופן כללי, לא ידוע עד היום על אינטראקציות בין Hsp60 לחע"ח אחרים, אך הביטוי המשמעותי של משפחות אלו עשוי להעיד על פעילות משותפת, או על צורך מיוחד בפעילות של Hsp60 כלורופלסטי במנגנון הקומפנסציה. כדאי יהיה בעתיד לבדוק אינטראקציות אפשריות בין Hsp60 לגרנולות שיוצרים חע"ח ממשפחת sHsp's או לחלבונים המשתחררים מהגרנולות ע"י Hsp100.

כאשר נבדקו תעתיקים המקודדים ל-Hsp70, Hsp90 ו-Hsp100, התעתיקים Hsp70 ו-Hsp100 המיטוכונדריאליים עברו אינדוקציה בחממת הקומפנסציה מס' 4 שם תנאי העקה הם החמורים ביותר וביטויים היה מקסימאלי (ראו תרשים מס' 4.3). ייתכן שהתעתיקים מקודדים לאיזופורמים שעוברים אינדוקציה רק בעקבות עקות חמורות יותר. התעתיק Hsp90 הציטופלסמטי/כלורופלסטי מתבטא באופן קונסטיטוטיבי (ראו תרשים מס' 4.4). ייתכן שתעתיק זה מקודד לאיזופורם שמתבטא קונסטיטוטיבית כפי שקורה בארבידופסיס. בצמח זה נמצאו שלושה איזופורמים קונסטיטוטיביים ואיזופורם שעובר אינדוקציה בעקבות חשיפה לחום (Sangster & Queitsch 2005).

לאחר בחינת מעורבותם של חע"ח במנגנון הקומפנסציה בעלים צעירים של צמחים בוגרים, נבחנה מעורבותם במנגנון הקומפנסציה באבקה. קיום מערכת תגובה להגנה מפני עקה בשלבי התפתחות אבקה הוא נושא בעל חשיבות אבולוציונית וחשיבות כלכלית - חקלאית. אבקה של צמחים, ובכללם הפלפל, היא איבר רגיש מאוד לפגיעה אביוטית (Pressman et al 1998, Iwahori 1965, Vara Prasad et al 1999), לפיכך יש חשיבות רבה להגנה מפני עקה על ידי תגובה של חע"ח. טמפ' קיצונית פוגעת באחד התהליכים החשובים במהלך ההבשלה של גרגר האבקה, שהוא מטבוליזם הסוכרים וביו סינתזה של עמילן. נמצא

שרמת הביו סינתזה של עמילן באבקה המתפתחת עשויה לשמש כסמן לעמידות של האבקה בפלפל לתנאי עקת קור, אולם אין מידע על מנגנון העמידות (Shaked et al, 2004).

בעבודה זו נבחנה רמת הביטוי של חע"ח השייכים למשפחות העיקריות המתבטאות בצמחים, במהלך התפתחות גרגרי האבקה. איכות האבקה, כפי שנקבעה ע"י אחוז ג"א הנובטים ומספר ג"א החיוניים והלא חיוניים מתוך כלל ג"א, היוותה מדד לאבחנה בין צמחים שגדלו בתנאי קומפנסציה לצמחים שגדלו בתנאי ביקורת. ההשוואה בין צמחים שגדלו בתנאי טיפול שונים, הראתה הבדל ביניהם (ראו סעיף מס' 1 בפרק התוצאות, גרף מס' 4). מתוך מטרה לראות האם יש קשר בין ביטוי חע"ח לעמידות אבקה לעקת קור, נבדק במסגרת עבודה זו שלב קריטי במהלך הבשלת הגרגירים, שלב A - 4/5 בו מתחילה צבירת העמילן.

חשיבות מיוחדת ליכולת התגובה בשלב ההתפתחותי הזה, היא הקשר בין הגנה מעקת קור לפעילות משק הסוכרים וצבירת העמילן בגרגר המתפתח. פעילות זו נפגעת בעקבות חשיפה לקור (Shaked et al, 2004). אינדוקציה של חע"ח בתנאי קומפנסציה עלולה להצביע על מעורבותם, בין היתר, בהגנה והחזרה לפעילות של אנזימים רגישים לקור הפועלים בתהליך האגירה או הפירוק של העמילן.

בניגוד למידע הקיים בספרות, ובניגוד לטענה הרווחת לפיה מגוון חע"ח העוברים אינדוקציה באבקה הוא מצומצם ביותר (Mascarenhas and Crone 1996, Maestri et al 2002), מעידות תוצאות עבודה זו על כך שחע"ח ממשפחות ה-sHsp's כמו גם Hsp70 ו-Hsp60 עוברים אינדוקציה באבקה מתפתחת בעקבות חשיפה לעקה (ראו תרשימים מס' 5.1 ו- 6.1).

תוצאות עבודה זו מראות כי חשיפה לתנאי עקה גורמת לאינדוקציה של מגוון רחב של חלבונים ממשפחת sHsp's באבקה. כל החלבונים השייכים למשפחה זו שנבדקו במסגרת עבודה זו עוברים אינדוקציה בגרגרי אבקה מתפתחים של פלפל. ברמת החלבון, sHsp Class II ו-sHsp הפלסטידי, עברו אינדוקציה בחממות הקומפנסציה, בהשוואה לחממות הביקורת (ראו תרשים 6.1). ברמת ה-sHsp Class I, RNA, עברו אינדוקציה ו-II עברו אינדוקציה בחממות הקומפנסציה, ובעקבות חשיפה לתנאי קור (ראו תרשים 5.2). sHsp המיטוכונדריאלי עבר אינדוקציה בחממות הקומפנסציה בלבד (ראו תרשים מס' 5.1).

למרות החשיבות הרבה של חע"ח ממשפחת sHsp's, קיים מידע מועט ביותר על ביטוי של חע"ח ממשפחה זו באבקה. Volkov et al (2005) הראו באבקה מתפתחת של טבק ביטוי של מספר גנים ממשפחת sHsp Class I/II. חלקם התבטאו בשלבים מוקדמים ורמתם ירדה משמעותית לקראת השלב הדו-תאי, וחלק עברו אינדוקציה רק בשלבים מאוחרים והצטברו בתא לקראת ההבשלה.

לחלבונים ממשפחת sHsp's המתבטאים באורגנלות השונות תפקידים שונים ומגוונים. לבני משפחה זו תפקיד חשוב בהגנה על קומפלקס מעבר האלקטרונים במיטוכונדריה והגנה על PSII בכלורופלסט (Vierling 1991). בעבודה קודמת שבוצעה במעבדה שלנו נמצא ביטוי של sHsp's באורגנלות השונות ובציטופלסמה של אבקה מתפתחת של עגבנייה, בעקבות חשיפה לעקת חום.

למעט בדיקת ביטוי sHsp פלסטידי באבקה מתפתחת של עגבנייה בעקבות חשיפה לחום בעבודה קודמת במעבדתנו, לא קיים מידע בספרות לגבי ביטוי של חלבון זה באבקה. בעבודה הנוכחית, נצפתה אינדוקציה של חלבון זה באבקה, בחממות הקומפנסציה. ייתכן ולחלבון הפלסטידי תפקיד בהגנה על העמילופלאסטים בהם מתרחשת אגירת העמילן בתאי אבקה מתפתחת בשלב שנבדק.

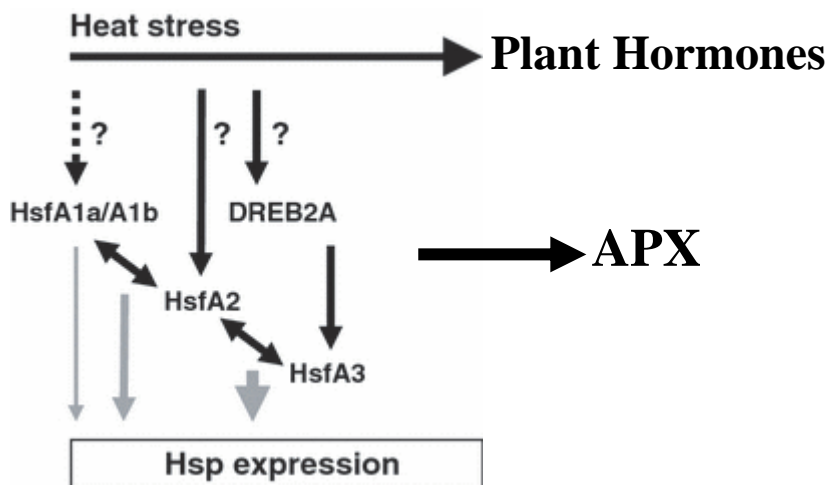


בדומה למצב בעלים של צמחים צעירים, נצפתה קורלציה בין רמות ביטוי sHsp Class II הציטופלסמטי לאלו של Hsp70 ברמת החלבון, ובשני המקרים חלבונים אלו התבטאו בחממות הקומפנסציה בלבד. ייתכן שגם באבקה של פלפל קיים מנגנון של קיפול חלבונים שעברו אגרגציה בעקבות חשיפה לעקה, ע"י חלבוני Hsp70. ע"פ המנגנון, חלבוני sHsp's מייצבים חלבונים דנטורטיביים ע"י יצירת גרנולות עמם ולאחר מכן החלבונים הדנטורטיביים משתחררים ועוברים קיפול תקין ע"י חלבוני Hsp70 (Smykal et al, 2000).

אספקט מעניין אחר המתקבל מתוצאות עבודה זו הוא רמות הביטוי של Hsp60 (Chaperonin 60). הגן הפלסטידי עבר אינדוקציה בחממות הקומפנסציה בדומה לתעתיק sHsp המיטוכונדריאלי (ראו תרשים 5.1). בצמחים, עד היום לא נמצאה קורלציה בין ביטוי Hsp60 ל-sHsp's, למעט בעבודה קודמת שבוצעה במעבדתנו, שם נמצאה אינדוקציה של Hsp60 ו-sHsp's בצמחי עגבנייה, בעקבות חשיפה לחום. באופן כללי, לא ידוע עד היום על אינטראקציות בין Hsp60 לחע"ח אחרים, אך הביטוי המשמעותי של משפחות אלו עשוי להעיד על פעילות משותפת או על צורך מיוחד בפעילות של Hsp60 פלסטידי במנגנון הקומפנסציה. כדאי יהיה בעתיד לבדוק אינטראקציות אפשריות בין Hsp60 לגרנולות שיוצרים חע"ח ממשפחת sHsp's או לחלבונים המשתחררים מהגרנולות ע"י Hsp100.

בניסוי זה לא נבדק מנגנון הפעולה הספציפי בתנאי הקומפנסציה, אלא נבדקה הקורלציה בין ביטוי חע"ח לבין ההשפעות החיוביות של טיפולי הקומפנסציה על הצמחים. מכיוון שנצפתה קורלציה בין חע"ח מסוימים לבין השפעות טיפולי הקומפנסציה, ניתן להניח שהחלבונים הנ"ל מעורבים במנגנון זה, מבלי להתחייב על כך באופן חד - משמעי.

בניסוי זה נבדקה רק רמת הביטוי של חע"ח ולא נערך מעקב אחרי יצירת קומפלקסים ויחסי גומלין בין משפחות. כל אחד מן המצבים הללו עלול להוות נקודת מפתח בהבנת מידת העמידות שמאפשרים תנאי הקומפנסציה. ע"מ ללמוד עוד על מנגנון זה ניתן יהיה לבצע בעתיד בדיקות נוספות. חע"ח מהווים רק חלק ממארג התגובה לחום בתא. בתא הצמחי קיימים מס' מסלולי הגנה מפני עקות, כאשר לא בכולם מעורבים חע"ח. בהקשר זה הוזכרו מסלולי העברת האותות של ABA (Larkindale et al, 2005), תרומתה של פעולת נוגדי חמצון וכן סינתזת איזופרנים וגליצין - בטאין לסבילות לחום (Young et al, 2003) וסינתזה של מטבוליטים שניוניים ושלישוניים (Kaplan et al, 2004). מארג התגובה לחום בתא אינו ידוע על כל פרטיו וניתן לתאר אותו באמצעות המודל הבא, שתואר בצמח הארבידופסיס (Schramm et al, 2008):



ע"פ מודל זה, חע"ח מבוקרים ע"י פקטורי Hsf's. Hsf's מבוקרים ע"י עקת חום, מבקרים זה את זה, את ביטוי חע"ח ואת ביטוי אנזימי APX, הקשורים בתגובה לעקה חמצונית. כמו כן, ניתן לראות כי גם פקטור השעתוק DREB2A, הקשור בתגובה לעקות יובש, מלח וקור, מעורב בתגובה לחום. מודל זה מלמד אותנו על מורכבות התגובה לחום בתא הצמחי, ועל הדו - שיח שקיים בין עקת חום לעקות אביוטיות אחרות. השפעת עקת החום על המאזן ההורמונלי הצמחי, תורמת גם היא למורכבות התגובה התאית לעקה זו. מעניין יהיה בעתיד לבדוק את מידת ההגנה של חע"ח במניעת אגרזיה של אנזימי מפתח בתהליך ייצור העמילן, הרגישים לעקות חום וקור, ובהחזרתם לפעילות של אלו שעברו אגרזיות. ניסוי זה יהיה דומה לניסויים שנערכו in vitro על אנזימים אחרים כגון Firefly Luciferase או Citrate Synthase שעברו דנטורציה בהרתחה ורק בעקבות הוספת חע"ח למערכת, חזרו לקונפורמציה נכונה ולפעילות תקינה ( Low et al 1995, Smykal et al 2000, Shono et al 2002).

בנוסף לכך, ניתן יהיה לבחון את מנגנון הקומפנסציה בשלב התפתחות מאוחר יותר של אבקה בפלפל. אפשר יהיה לחזור על הניסויים ולבצע ניסויים נוספים על השלב המאוחר, A - 2, שלב שבו אגירת העמילן מגיעה לשיאה ומתחיל הפירוק שלו. בעבודה קודמת שבוצעה במעבדתנו, נבדקה השפעת עקת חום על אבקה מתפתחת של עגבנייה, בהקשר של ביטוי חע"ח. התוצאות שהתקבלו בעבודה זו לפיהן יש חע"ח שעברו אינדוקציה דווקא בשלב המאוחר, שבו אגירת העמילן הגיעה לשיאה, היו מעניינות ביותר. ייתכן שגם באבקה של פלפל השלב שבו יש שיא באגירה של עמילן, הוא השלב הקריטי להגנה מפני עקה ע"י חע"ח.

במסגרת העבודה תואר מערך ביטוי של חע"ח ממספר משפחות במהלך התפתחות האבקה. תגובה של ביטוי חע"ח היא כלי מפתח בהגנה על אבקה מתפתחת, ולתיעוד התופעה עשויות להיות השלכות חשובות הן למיון ופיתוח של זנים עמידים על ידי הכלאות, והן ללימוד המערכות המופעלות להגנה על איבר כה רגיש בצמח ודרכי הפעולה שלהן.

## ז. ביבליוגרפיה

- 1) Adam Z., Adamska I., Nakabayashi K., Ostersetzer O., Haussuhl K., Manuell A., Zheng B., Vallon O., Rodermeil S. R., Shinozaki K. & Clarke A. K. (2001): Chloroplast and mitochondrial proteases in Arabidopsis. A proposed nomenclature. Plant Physiol. 125: 1912 - 1918
- 2) Aloni B., Peet M., Pharr M. & Karni L. (2001): The effect of high temperature and high atmospheric CO<sub>2</sub> on carbohydrate changes in bell pepper (*Capsicum annuum*) pollen in relation to its germination. Physiol. Plant 112: 505 - 512
- 3) Apuya N. R., Yadegari R., Fischer R. L., Harada J. J., Zimmerman L. & Goldberg R. B. (2001): The Arabidopsis embryo mutant schepperless has a defect in the Chaperonin - 60 $\alpha$  gene. Plant Physiol. 126: 717 - 730

- 4) Atkinson B. G., Raizada M., Bouchard R. A., Frappier R. H. & Walden D. B. (1993): The independent stage - specific expression of the 18 kDa heat shock protein genes during microsporogenesis in *Zea mays L.* *Develop. Genet.* 14: 15 - 26
- 5) Banzet N. Richaud C., Deveaux Y., Kazmaier M., Gagnon J. & Triantaphylides C. (1998): Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells. *The Plant J.* 13: 519 - 527
- 6) Cahoon A. B., Cunningham K. A. & Stern D. B. (2003): The plastid clpP gene may not be essential for plant cell viability. *Plant Cell Physiol.* 44: 93 - 95
- 7) Chen B., Zhong D. & Monteiro A. (2006): Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. *BMC Genomics* 7: 156
- 8) Clement C., Chavant L., Burrus M. & Audran J. C. (1994): Anther starch variation in *Lilium* during pollen development. *Sex. Plant Reprod.* 7: 347 - 356
- 9) Constan D. J., Akita M. & Keegstra K. (2001): Molecular chaperones involved in chloroplast protein import. *Biochim. Biophys. Acta.* 1541: 102 - 113
- 10) Cooper P., Tuan - Huan, D. H & Hauptmann R. M. (1984): Tissue specificity of the heat shock response in maize. *Plant Physiol.* 75: 431 - 441
- 11) Duck N., McCormick S. & Winter J. (1989): Heat shock protein Hsp70 cognate expression in vegetative and reproductive organs of *Lycopersicum esculentum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3674 - 3678
- 12) Duck N. B. & Folk W. R. (1994): Hsp70 heat shock protein cognate is expressed and stored in developing tomato pollen. *Plant Mol. Biol.* 26: 1031 - 1039
- 13) Edelman L., Czarnecka E. & Key J. L. (1988): Induction and accumulation of heat - shock specific poly (A +) RNA's and proteins in soybean seedlings during arsenate and cadmium treatments. *Plant Physiol.* 86: 1048 - 1056
- 14) Frankis R. C. & Grayson G. K. (1990): Heat shock response in germinating Pine pollen. *Sex Plant Reprod.* 3: 195 - 199
- 15) Frova C., Taramino G. & Ottaviano E. (1991): Sporophytic and gametophytic heat shock protein synthesis in *Sorghum bicolor*. *Plant Sci. Lime.* 73: 35 - 44
- 16) Glover J. R. & Lindquist S. (1998): Hsp104, Hsp70 and Hsp40: A novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell.* 94: 73 - 82
- 17) Gong M., Chen B., Li Z. G. & Guo L. H. (2001): Heat shock induced cross adaptation to heat, chilling, drought and salt stress in maize seedlings and involvement of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Plant. Physiol.* 158: 1125 - 1130

- 18) Gosh S., Gepstein S., Heikkila J. J., Dumbroff E. B., (1988): Use of a scanning densitometer or an ELISA plate reader for measurement of nanogram amounts of protein in crude extracts from biological tissues. *Anal Biochem.* 169: 227 - 233
- 19) Hopf N., Plesofsky - Vig, N. & Bramble R. (1992): The heat shock response of pollen and other tissues of maize. *Plant Mol. Biol.* 19: 623 - 630
- 20) Horner H. T. Jr & Rogers M. A. (1974): A comparative light and electron microscopic study of microsporogenesis in male - fertile and male - sterile pepper (*Capsicum annuum*). *Can. J. Bot.* 52 (3): 435 - 441
- 21) Iwahori S. (1965): High temperatures injuries in tomato. IV. Development of normal flower buds and morphological abnormalities of flower buds treated with high temperature. *J. Jap. Hort. Sci.* 34: 33 - 41
- 22) JianFu L., ShuBang N., XiRong H., QingLin T., DaoGao L. & ChaoAi L. (2003): Study on the relationship between water stress and the pollen development of macadamia. *South China Fruits* 32: 40 - 41
- 23) Kaplan B. H., Kopka J., Haskell D. W., Zhano W., Schiller K.C., Gatzke N., Sung D. Y. & Guy C. (2004): Exploring the temperature - stress metabolome of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 136: 4159 - 4168
- 24) Kaplan F., Kopka J., Haskell D. W., Zhano W., Schiller K. C., Gatzke N., Sung D. Y. & Guy C. (2004): Exploring the temperature - stress metabolome of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 136: 4,159 - 4,168
- 25) Katiyar S. A., Agarwal M., Gallie D. R. & Grover A. (2001): Search for the cellular functions of plant Hsp100/Clp family proteins. *Crit. Rev. Plant Sci.* 20: 277 - 295
- 26) Katiyar S. A. & Grover A. (2003): Heat - tolerant basmati rice engineered by over - expression of hsp101. *Plant Mol. Biol.* 51: 677 - 686
- 27) Kazutsuka S., Katsumi S., Akemi T., Yoshinobu E. & Mariko S. (2005): Ovule - specific expression of the genes for mitochondrial and endoplasmic reticulum localized small heat-shock proteins in tomato flower. *Plant Cell Tiss. Org Cult.* 83: 245 - 250
- 28) Larkindale J., Hall J. D., Knight M. R. & Vierling E. (2005): Heat stress phenotypes of Arabidopsis mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermo tolerance. *Plant Physiol.* 138: 882 - 897

- 29) Lawrence S. D., Cline K. & Moore G. A. (1997): Chromoplast development in ripening tomato fruit: identification of cDNAs for chromoplast-targeted proteins and characterization of a cDNA encoding a plastid - localized low - molecular - weight heat shock protein. *Plant Mol. Biol.* 33: 483 - 492
- 30) Lee G. J., Pokala N. & Vierling E. (1995): Structure and in vitro molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *J. Biol. Chem.* 270: 10432 - 10438
- 31) Lee G. J. & Vierling E. (2000): A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol.* 122 : 189 - 198
- 32) Lee U., Wie C., Escobar M., Williams B., Hong S. W. & Vierling E. (2005): Genetic analysis reveals domain interactions of Arabidopsis Hsp100/ClpB and cooperation with the small heat shock protein chaperone system. *Plant Cell* 17: 559 - 571
- 33) Liu J. & Shono M. (1999): Characterization of mitochondrial - located small heat shock protein from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Physiol.* 40: 1297 - 1304
- 34) Lindquist S. & Craig E. A. (1988): The heat - shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22: 631 - 677
- 35) Low D., Brandle K., Nover L. & Forreiter C. (2000): Cytosolic heat - stress proteins Hsp 17.7 class I and Hsp17.3 class II of tomato act as molecular chaperones in vivo. *Planta* 211: 575 - 582
- 36) Lund A. A., Rhoads D. M., Lund A. L., Cerny R. L. & Elthon T. E. (2001): In vivo modifications of the maize mitochondrial small heat stress protein, HSP22. *J. Biol. Chem.* 276 : 29924 - 29929
- 37) Maestri E., Klueva N., Perrotta C., Gulli N., Nguyen H. T. & Marmioli N. (2002): Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals. *Plant Mol. Biol.* 48: 667 - 681
- 38) Magnard J. L., Vergne P. & Dumas C. (1996): Complexity and genetic variability of heat - shock protein expression in isolated maize microspores. *Plant Physiol.* 111: 1085 - 1096
- 39) Malik M. K., Slovin J. P. & Hwang C. H. (1999): Modified expression of a carrot small heat shock protein gene, Hsp17.7, results in increased or decreased thermotolerance. *The Plant Journal* 20: 89 - 99

- 40) Mascarenhas J. P. & Crone D. E. (1996): Pollen and the heat shock response. *Sex Plant Reprod.* 9: 370 - 374
- 41) Miroshnichenko S., Tripp J., Nieden U., Neumann D., Conrad U. & Manteuffel R. (2005): Immunomodulation of function of small heat shock proteins prevents their assembly into heat stress granules and results in cell death at sublethal temperatures. *Plant J.* 41: 269 - 281
- 42) Mohammady D. S., Sadatinejad J. & Shiran B. (2006): Which one is responsible for apical sterility in wheat under water - stress conditions, ovule or pollen aborting? *Pakis. J. Biol. Sci.* 9: 2808 - 2811
- 43) Nagao R. T. & Gurley W. B. (1999): Use of heat shock promoters to control gene expression in plants. In "inducible gene expression in plants" CABI Publishing CAB International. Wallingford UK pp 97 - 127
- 44) Nakabayashi K., Ito M., Kiyosue T., Shinozaki K. & Watanabe A. (1999): Identification of clp genes expressed in senescing Arabidopsis leaves. *Plant Cell Physiol.* 40 (5): 504 - 514
- 45) Nakamura M. (1936): Experimental and cytological studies on the instability of the meiotic division of pollen mother cells of *Impatiens balsamina* Linn caused by the effect of high air temperature. *Taihouku. Imp. Univ.* 17: 121 - 184
- 46) Neta Sharir I., Isaacson T., Lurie S. & Weiss D. (2005): Dual role for tomato heat shock protein 21: protecting photosystem II from oxidative stress and promoting color changes during fruit maturation. *Plant Cell* 17: 1829 - 1838
- 47) Novak F. & Betlach J. (1970): Development and karyology of the tapetal layer of anthers in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Biol. Plantarum* 12: 275 - 280
- 48) Nover L., Scharf K. D. & Neumann D. (1984): Heat shock induced changes of plant cell ultra structure and auto radiographic localization of heat shock proteins. *Eur. J. Cell Biol.* 34: 254 - 264
- 49) Pacini E. (1996): Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. *Sex. Plant Reprod.* 9: 362 - 366
- 50) Pacini E. & Franchi G. G. (1988): Amylogensis and amylolysis during pollen grain development. In: Cresti M., Gori P. & Pacini E. (eds) *Sexual Reproduction in Higher Plants*. Springer, Berlin, pp 181 - 186
- 51) Parsell D. A. & Linquist S. (1993): The function of heat - shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27: 437 - 496

- 52) Peet M. M., Willitis D. H. & Gradner R. G. (1998): Response of ovule development and post pollen production process in male sterile tomatoes to chronic sub - acute high temperature stress. *J. Exp. Bot.* 48: 101 - 111
- 53) Perezgasga L., Segovia L. & Zurita M. (1999): Molecular characterization of the 5' control region and of two lethal alleles affecting the hsp60 gene in *Drosophila melanogaster*. *FEBS Letters*, 456: 269 - 273
- 54) Picken A., Hurd J. F. and Vince - Pru R. G. (1984): *CRC HandBook of Flowering*. A. H. Halevy (ed) CRC Press, Volume 2, pp 300 - 346
- 55) Polowick P. L. & Sawhney V. K. (1985): Temperature effects on male fertility and flower and fruit development in *Capsicum annum* L. *Sci. Hort.* 25: 117 - 127
- 56) Prasad T. K. & Stewart C. R. (1992): cDNA clones encoding *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays* mitochondrial chaperonin HSP60 and gene expression during seed germination and heat shock. *Plant Mol. Biol.* 18: 873 - 885
- 57) Pressman E., Moshkovitch H., Rosenfeld K., Shaked R., Gamliel B. & Aloni B (1998): Influence of low night temperatures on sweet pepper flower quality and the effect of repeated pollinations, with viable pollen, on fruit set. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 73: 131 - 136
- 58) Pressman E., Peet M. M. & Pharr D. M. (2002): The effect of heat stress on tomato pollen characteristics is associated with changes in carbohydrate concentration in developing anthers. *Annals Bot.* 90: 631 - 636
- 59) Pressman E., Shaked R. & Firon N. (2006): Exposing pepper plants to high day temperatures prevent the adverse low night temperature symptoms. *Physiol. Plantarum* 126: 618 - 626
- 60) Quagliotti L. (1979): Floral biology of *Capsicum* and *Solanum melongena*. In *The Biology and Taxonomy of the Solanaceae*. Hawkes J. G., Lester R. N. & Skelding A. D., Eds, Academic Press, London, pp 399 - 419
- 61) Queitsch C., Hong S. H., Vierling E., Lindquist S. (2000): Hsp101 plays a crucial role in thermo tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 479 - 492
- 62) Queitsch C., Hong S. W., Vierling E. & Lindquist S. (2000): Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 12: 479 - 492
- 63) Rehman S., HeeSun K., JeongHyun L., MyoungRyoul P., JongChul K., KwangGeun P., JaeSeong C., Taell P., JungGon K., KyuSung L., YongWon S., JinKey K., KyeongGu C. & SongJoong Y. (2004): Varietal responses of pollen development to salt stress in barley. *Kor. J. Crop Sci.* 49: 407 - 409

- 64) Rikhvanov E. G., Gamburg K. Z.; Varakina N.N., Rusaleva T. M., Fedoseeva I. V., Tauson E. L., Stupnikova I. V., Stepanov A. V., Borovskii G. B. & Voinikov V. K. (2007): Nuclear-mitochondrial cross - talk during heat shock in Arabidopsis cell culture. *Plant Journal* 52: 763 - 778
- 65) Rutherford S. L. & Lindquist S. (1998): Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 396: 336 - 342
- 66) Rylski I. (1985): Capsicum. In: Halevy H. A. (Ed), *CRC Handbook of flowering*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp: 140 - 146
- 67) Rylski I. (1986): Pepper (Capsicum). In: Monselise, S. P. (Ed.), *CRC Handbook of fruit set and development*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 140 - 146
- 68) Sabehat A., Lurie S. & Weiss D. (1998): Expression of small heat shock proteins at low temperatures. *Plant Physiol.* 117: 651 - 658
- 69) Saltveit M. E. (2002): Heat shocks increase the chilling tolerance of rice (*Oryza sativa*) seedling radicles. *J. Agric. Food. Chem.* 50: 3232 - 3235
- 70) Sanchez Y. & Lindquist S. (1990): HSP104 required for induced thermo tolerance. *Science* 248: 1112 - 1115
- 71) Sangster T. A. & Queitsch C. (2005): The Hsp90 chaperone complex. An emerging force in plant development and phenotypic plasticity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 86 - 92
- 72) Sanmiya K., Suzuki K., Egawa Y. & Shono M. (2004): Mitochondrial small heat - shock protein enhances thermotolerance in tobacco plants. *FEBS Letters* 557: 265 - 268
- 73) Schramm F., Larkindale J., Kiehlmann E., Ganguli A., English G., Vierling E. & Koskull - Doring P. V. (2008): A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of Arabidopsis. *The Plant Journal* 53: 264 - 274
- 74) Sergio E., Cobiauchi R. C., Sorbo S., Conte B. & Basile A. (2007): Ultrastructural alterations and HSP 70 induction in *Elodea canadensis Michx.* exposed to heavy metals. *Caryologia* 60: 115 - 120
- 75) Shaked R., Rosenfeld K. & Pressman E. (2004): The effect of low night temperatures on carbohydrates metabolism in developing pollen grains of pepper in relation to their number and functioning. *Sci. Hortic.* 102: 29 - 36



- 76) Shanklin J., DeWitt N. D. & Flanagan J. M. (1995): The stroma of higher plant plastids contains clpP and ClpC, functional homologs of Escherichia coli ClpP and ClpA: An archetypal two - component ATP - dependent protease. *The Plant Cell* 7: 1713 - 1722
- 77) Sheorn I. S., Sainai H. S. (1996): 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.* 9: 161 - 169
- 78) Shono M., Liu J., Sanmiya K., Singh I., Din J., Suzuki K., Tsukaguchi T. & Egawa Y. (2002): Functional analysis of mitochondrial small heat shock protein. *JIRCAS Work. Rep.* 17 - 23
- 79) Smykal P., Hrdy I. & Pechan P. M. (2000): High - molecular - mass complexes formed in vivo smHSP's and HSP70 and display chaperone - like activity. *Eur. J. Biochem.* 267: 2195 - 2207
- 80) Spena A. & Schell J. (1987): The expression of heat-inducible chimeric gene in transgenic tobacco plants. *Mol. & Gen. Genet.* 206: 436 - 440
- 81) Sun W., Montagu M. V. & Verbruggen N. (2002): Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochim. et Biophys. Acta* 1577: 1 - 9
- 82) Sung D. Y., Vierling E. & Guy C. L. (2001): Comprehensive expression profile analysis of the Arabidopsis Hsp70 gene family. *Plant Physiol.* 126: 789 - 800
- 83) Swindell W. R., Huebner M. & Weber A. (2007): Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non - heat stress response pathways. *BMC Genom.* 8: 125 - 139
- 84) Tretyakova I. N. & Noskova N.E (2004): Scotch pine under conditions of environmental stress. *Russ. J. Ecol.* 35: 20 - 26
- 85) Vara Prasad P. V., Craufurd P. Q. & Summerfield R. J. (1999): Fruit number in relation to pollen production and viability in groundnut exposed to short episodes of heat stress. *Ann. Bot.* 84: 381 - 386
- 86) Vierling E. (1991): The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 579 - 620
- 87) Volkov R. A., Panchuk I. I. & Schoffl F. (2005): Small heat shock proteins are differentially regulated during pollen development and following heat stress in Tobacco. *Plant Mol. Biol.* 57: 487 - 502

- 88) Walkley N. A., Demaine A. G. & Malk A. N. (1996): Cloning, structure and mRNA expression of human Cctg, which encodes the chaperonin subunit CCT $\gamma$ . *Biochem. J.* 313: 381 - 389
- 89) Wang W., Vinocur B. & Altman A. (2003): Plant responses to drought, Salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1 - 14
- 90) Wang W., Vinocur B. & Altman A. (2003): Plant response to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 9: 244 - 252
- 91) Wang W., Vinocur B., Shoseyov O. & Altman A. (2004): Role of plant heat - shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 9: 244 - 252
- 92) Wehmeyer N., Hernandez L. D., Finkelstein R. R. & Vierling E. (1996): Synthesis of small heat - shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiol.* 112: 747 - 757
- 93) Wien H. C. (1997): *The Physiology of Vegetable Crops.* CAB International, pp 259 - 293
- 94) Yabe N., Takahashi T. & Komeda Y. (1994): Analysis of tissue specific expression of Arabidopsis Thaliana Hsp90 family gene Hsp81. *Plant Cell Physiol.* 35: 1207 - 1219
- 95) Young T. E., Ling J., Geisler - Lee C. J., Tanguay R. L., Caldwell I. C. & Gallie D. R. (2001): Developmental and thermal regulation of the maize heat shock protein Hsp101. *Plant Physiol.* 127: 777 - 791
- 96) Zhang C. & Guy C. L. (2005): Co - immunoprecipitation of Hsp101 with cytosolic Hsc70. *Plant Physiol. Biochem.* 43: 13 - 18
- 97) Zhang X. P. & Glaser E. (2002): Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone. *Trends Plant Sci.* 7: 14 - 21
- 98) Zhang Z., Quick M. K., Kanelakis K. C., Gijzen M. & Krishna P. (2003): Characterization of a plant homolog of Hop, a cochaperone of Hsp90. *Plant Physiol.* 131: 525 - 535
- 99) Zheng B., Halperin T., Heidingsfeldova O. H., Adam Z. & Clarke A. K. (2002): Characterization of Chloroplast Clp proteins in Arabidopsis: Localization, tissue specificity and stress responses. *Physiol. Planta.* 114: 92 - 101

## ח. נספחים

### נספח א' - הרחבה לפרק "חומרים ושיטות"

#### א. 1. הפקת RNA מאבקה

לרקמה קפואה בחנקן נוזלי הוסף 1 ml של TRI - Reagent (Sigma), ע"פ הוראות היצרן. לאחר הפשרת הרקמה בתוך הנוזל, הנוזל הועבר למבחנות אפנדורף והושאר בטמפי' החדר למשך 5 דקות. בתום האינקובציה, הוספו 200  $\mu$ l של כלורופורם אל המבחנות והן עורבבו למשך 15 שניות. לאחר מכן בוצעה אינקובציה בטמפי' החדר למשך 15 דקות וסרכוז בצנטריפוגה מקוררת ( $4^{\circ}\text{C}$  - 1) במשך 15 דקות במהירות של 12,000 g ע"מ להרחיק משקעים מוצקים.

בתום הסרכוז, הפאזה העליונה שמכילה RNA, הועברה למבחנות נקיות ואליה הוספו 500  $\mu$ l של propanol - 2. בוצע ערבוב ולאחריו אינקובציה בטמפי' החדר למשך 10 דקות וסרכוז נוסף בצנטריפוגה מקוררת למשך 10 דקות במהירות של 12,000 g. לאחר מכן, הנוזל העליון סולק ואל המשקע הוספו 1 ml 75% Ethanol (25% DDW + DEPC) ע"מ לנקות את המשקע. המשקע שוחרר מתחתית המבחנה ע"י טלטול מהיר בוורטקס והמבחנות סורכזו למשך 7 דקות בצנטריפוגה מקוררת במהירות של 7,500 g. לאחר מכן, סולק האתאנול והמשקע הושאר לייבוש במנדף כימי (טמפי' חדר) למשך 10 דקות. המשקע היבש הורחף במים מטופלים ב- DEPC (50  $\mu$ l) ולאחר המסה בבלוק חימום למשך 15 דקות בטמפי' של  $60^{\circ}\text{C}$ , הוא הוחזר לקרח.

#### א. 2. טיפול ב- DNase ל- RNA שהופק מאבקה

אל כל דוגמא של RNA (50  $\mu$ l), הוספו 5 יחידות של אנזים (5  $\mu$ l) RNase free, DNase RQI, ובופר ריאקציה בנפח של 5  $\mu$ l, בהתאם להוראות היצרן (Promega). בוצעה אינקובציה למשך 20 דקות בטמפי' של  $37^{\circ}\text{C}$  ולאחריה הפסקת הריאקציה ע"י הוספת 5  $\mu$ l של תמיסת Stop Solution, וחימום למשך 10 דקות בטמפי' של  $65^{\circ}\text{C}$ . בתום הריאקציה, בוצעה אינקובציה בטמפי' של  $4^{\circ}\text{C}$  למשך 5 דקות.

#### א. 3. הפקת RNA מעלים

מרקמה כתושה וקפואה (ליזאט) הופק RNA תוך שימוש ב- GenElute Mammalian Total RNA Kit של Sigma ע"פ הוראות היצרן. הליזאט שהיה שרוי בחנקן הנוזלי הועבר למבחנות פלקון בנפח של 15 ml, שבתוכן היו 700  $\mu$ l של בופר ליזיס ובתוכו 7  $\mu$ l של Beta Mercapto Ethanol. לאחר הפשרת הרקמה בבופר, היא עורבבה ע"י וורטקס. הליזאט שבבופר הועבר לקולונת סינון כחולה (בעזרת טיפ שנקטם ע"י סקלפל שחוטא באתאנול) וסורכז למשך 2 דקות בטמפי' החדר, במהירות של 13,000 rpm ע"מ לסלק את שברי התאים. לאחר מכן, הוסף אל הנוזל הצלול נפח שווה של 70% Ethanol (30% DDW + DEPC).

700 µl מן התערובת הועברו לקולונת קישור RNA אדומה, הורחפו בעדינות בעזרת טיפ ע"מ לאפשר הומוגנציה של הנוזל וסרכוזו למשך 20 שניות בטמפ' החדר במהירות של 13,000 rpm. לאחר הסרכוז, הנוזל סולק ויתרת התערובת הועברה לאותה קולונת קישור ע"מ לחזור על התהליך.

ה - RNA שקשור לקולונה נשטף עם 500 µl של תמיסת wash 1 ע"י סרכוזו למשך 20 שניות בטמפ' החדר, במהירות של 13,000 rpm. לאחר מכן, הקולונה הועברה למבחנת איסוף חדשה ועברה שטיפה ע"י הוספת 500 µl של תמיסת wash 2 (התמיסה מהולה ב - Ethanol ע"פ הוראות היצרן) וסרכוזו למשך 20 שניות בטמפ' החדר במהירות של 13,000 rpm. לאחר השטיפה, הנוזל סולק ובוצעה שטיפה נוספת באותה תמיסה ע"י סרכוזו במהירות ובטמפ' זהות למשך 2 דקות ע"מ לנקות את ה - RNA מן ה - Ethanol.

לאחר הסרכוז, הקולונה הועברה למבחנת איסוף חדשה והוספו אליה 50 µl של תמיסת אלוציה.

ה - RNA נשטף מן הקולונה ע"י סרכוזו למשך דקה בטמפ' החדר במהירות של 13,000 rpm. ע"מ לייעל את התהליך, הנוזל שנאסף הועבר בשנית דרך הקולונה ע"י סרכוזו בתנאים זהים לאלו שבהם בוצעה האלוציה הראשונה.

בתום ההפקה ה - RNA עבר אינקובציה בבלוק חימום למשך 15 דקות בטמפ' של 65°C ע"מ להרוס מבנים שניוניים שהוא יוצר ולאחר מכן הוא הונח בקרח למשך 5 דקות.

#### **א. 4. טיפול ב - DNase ל - RNA שהופק מעלים**

אל כל דוגמא של RNA (50 µl), הוספו 10 יחידות (1 µl) של אנזים DNase I, HVD BIOTECH (Deoxyribonuclease I) ובוצעה אינקובציה למשך 10 דקות בטמפ' של 37°C ע"פ הוראות היצרן (חברת דניאל ביוטק). הריאקציה הופסקה ע"י הרתחת דוגמאות ה - RNA למשך 10 דקות בטמפ' של 75°C.

#### **א. 5. סינתזת cDNA:**

RNA בכמות של 5 µg היווה את הבסיס לסינתזת cDNA, באמצעות האנזים SuperScript II RT של חברת invitrogen ע"פ הוראות היצרן. טרם הסינתזה הופשרו התמיסות הנלוות לאנזים, ועורבו ע"י ביצוע וורטקס. אל ה - RNA הוספו 10 mM של dNTP's mix (1 µl) ו - 200 ng של Random Primers (4 µl). במידת הצורך, נוספו אל ה - RNA מים מטופלים ב - DEPC ע"מ להגיע לנפח סופי של 10 µl. לאחר מכן, בוצע חימום למשך 5 דקות בטמפ' של 65°C ע"מ לפרוש את גדילי ה - RNA. במהלך החימום הוכן Reaction Mix בהתאם למספר הדוגמאות כמפורט בטבלה מס' 1:

## טבלה מס' 1 - הכנת Reaction Mix לצורך סינתזה של cDNA

| מרכיב             | ריכוז | נפח |
|-------------------|-------|-----|
| 10XRT Buffer      |       | 2µl |
| MgCl <sub>2</sub> | 25mM  | 4µl |
| DTT               | 0.1M  | 2µl |
| RNaseOUT          |       | 1µl |
| Total volume      |       | 9µl |

לכל דוגמת RNA הוספו 9 µl של Reaction Mix, עברו ערבוב עדין וסורכזו למשך מס' שניות בטמפי' החדר. בוצעה אינקובציה למשך 2 דקות בטמפי' של 42°C והוסף לכל דוגמא 1 µl של האנזים SuperScript II, ובוצע ערבוב. לאחר מכן בוצעה אינקובציה למשך 50 דקות בטמפי' של 42°C. לאחר מכן נעצרה פעילות האנזים ע"י אינקובציה למשך 15 דקות בטמפי' של 70°C.

### א. 6. ריאקצית Semi Quantitative PCR

#### שלבי הריאקציה

שלב 1: דנטורציה לשם פתיחת גדילי ה-DNA בטמפי' של 95°C למשך 2 דקות.  
שלב 2: שלב זה מתחלק לשלושה שלבים והוא חוזר על עצמו עד 40 פעמים (חזרה אחת של שלב 2 על כל חלקיו נקראת מחזור) ע"מ להגביר את התוצר הרצוי. בשלב הראשון יש דנטורציה למשך 10 שניות בטמפי' של 95°C. בשלב השני הטמפי' יורדת באופן הדרגתי בכדי לאפשר היצמדות של הפריימרים לתבנית ה-DNA בטמפי' ספציפית (60°C - 55°C). היצמדות הפריימרים לתבנית אורכת כ- 30 שניות. בשלב השלישי הטמפי' עולה ל- 72°C מכיוון שזו הטמפי' האופטימאלית לפעילות אנזים ה-polymerase. האנזים מסנתז גדילי DNA משלימים במשך 20 שניות.  
שלב 3: שלב זה מתחלק לשני שלבים והוא מביא לסיום הריאקציה. בשלב הראשון המכשיר מבצע אינקובציה בטמפי' של 72°C למשך 6 דקות ע"מ להשלים סינתזה של גדילי DNA שלא הספיקה להתרחש בשלב הקודם. בשלב השני המכשיר מוריד את הטמפי' ל- 4°C עד להוצאת הדוגמאות.  
במסגרת ה-Semi Quantitative PCR, נבדקה הגברה של גן הביקורת 18S rRNA בכל הדוגמאות, ע"מ לוודא שאכן מגבירים כמות שווה של DNA בכל דוגמא. לאחר כיוול כמויות ה-DNA בכל דוגמא באמצעות גן הביקורת, כוילו הגנים הנבדקים. הדוגמאות הוכנו בטריפליקטים כאשר בכל חזרה הריאקציה התבצעה במשך מס' מחזורים שונה, ע"מ לוודא שתוצרי הגנים נמצאים בשלב הליניארי של השכפול שלהם ושהמערכת לא ברוויה.

## א. 7. ריצוף תוצר PCR

לאחר ניקוי תוצר PCR והכנת מצע נוזלי לגידול חיידקים, מכינים מצע מוצק. לתמיסה הנוזלית מוסיפים (לפני אוטוקלאב) אגר לשיעור סופי של 1.5%. אל המצע יש להוסיף  $1 \mu\text{l}$  מתוך סטוק של 100 ppm Amp (sodium salt ampicillin) אנטיביוטיקה עבור 1 ml מצע. בנוסף לכך, כאשר מוזגים את המצע לצלחות, יש להוסיף לכל צלחת  $40 \mu\text{l}$  של IPTG בריכוז של 0.1 M ו-  $40 \mu\text{l}$  של X-gal בריכוז של 50 mg/ml (מומס ב-DMSO). כאשר המצע מוכן, יש להחדיר את תוצר ה-PCR לחיידקים קומפטנטיים תוך שימוש בערכה pGEM-T Easy vector system של חברת Promega, ע"פ הוראות היצרן. החדרת תוצר ה-PCR אל הפלסמיד pGEM, מתבצעת תוך התחשבות באורך המחדר, כמות הווקטור ואורך הווקטור ע"פ הנוסחה:

$$ng\_insert = \frac{ng\_vector \times insert\_size}{vector\_size} \times 3$$

מרכיבי ריאקציה הליגציה הם  $0.5 \mu\text{l}$  וקטור (פלסמיד P-GEM T),  $5 \mu\text{l}$  בופר,  $1 \mu\text{l}$  אנזים T4 Ligase, תוצר PCR נקי (עפ"י החישוב) ומים ע"מ להשלים את נפח הריאקציה ל-  $10 \mu\text{l}$ . מבצעים אינקובציה של כל מרכיבי הריאקציה למשך שעה בטמפ' של  $16^\circ\text{C}$ . לאחר מכן, מחדירים את הווקטור עם המחדר לחיידקים קומפטנטיים. החיידקים נשמרים בטמפ' של  $-80^\circ\text{C}$  במנות של  $100 \mu\text{l}$  ויש להשתמש בהם מיד לאחר ההפשרה. מערבבים  $100 \mu\text{l}$  של חיידקים עם  $5 \mu\text{l}$  של ריאקציה ליגציה ע"י הרחפה באמצעות טיפ. מבצעים אינקובציה למשך 10 דקות בקרח, 50 שניות בטמפ' של  $42^\circ\text{C}$  ואינקובציה נוספת בקרח למשך 2 דקות. לאחר מכן מוסיפים לכל מבחנת חיידקים עם מחדר,  $900 \mu\text{l}$  של מצע LB נוזלי. מבצעים אינקובציה בטלטול במהירות של 225 rpm למשך שעה וחצי בטמפ' של  $37^\circ\text{C}$ . בתום הטלטול, מסרכזים את מבחנות החיידקים למשך 30 שניות במהירות של 13,000 rpm ומסירים  $900 \mu\text{l}$  מן הנוזל העליון. מערבבים את הנוזל שנותר עם משקע החיידקים ע"י הרחפה באמצעות טיפ. זורעים את החיידקים על צלחות שמכילות LB, Agar, אמפיצילין, IPTG ו- X-gal באמצעות מקל דרוגלסקי. מגדלים את החיידקים למשך הלילה בטמפ' של  $37^\circ\text{C}$ .

### בדיקה לווידוא הכנסת המחדר

לאחר הגידול למשך הלילה, בודקים את הצלחות ומחפשים מושבות לבנות. רק חיידקים שקיבלו את הפלסמיד שמכיל עמידות לאנטיביוטיקה (אמפיצילין), יגדלו בנוכחותה ויתנו מושבות. במידה ויש מושבות לבנות, יש צורך לבצע ריאקציה PCR ע"מ לוודא שהחיידקים מכילים את התוצר הנקי. מכינים מבחנות ל-PCR תוך שימוש בערכה PCR Master Mix ופריימרים ספציפיים עבור המחדרים הנבדקים, ומבחנות אפנדורף שמכילות מצע LB נוזלי בנפח של 1 ml. מרימים בזהירות מושבות לבנות

(באמצעות טיפ סטרילי) מן הצלחות ונוגעים עם קצה הטיפ בנוזל של ריאקציה ה-PCR ולאחר מכן במצע ה-LB הנוזלי.

מבצעים ריאקציה PCR רגילה (פירוט התוכנית מופיע בסעיף מס' 9 של הפרק "חומרים ושיטות") למשך 40 מחזורים ובתום הריאקציה מריצים את התוצר על גיל אגרוז 1.5% במקביל לסמן (פירוט על מרכיבי הגיל, אופן ההרצה והסמן נמצאים בסעיף מס' 9 של הפרק "חומרים ושיטות") ע"מ לוודא שאכן מתקבל תוצר בגודל צפוי. במידה ומתקבל תוצר רצוי, מגדלים את החיידקים למשך הלילה במצע LB נוזלי (במבחנות האפנדורף שמכילות 1 ml של מצע) בטמפ' של 37°C תוך כדי טלטול במהירות של 225 rpm. לאחר גידול החיידקים למשך הלילה, שולחים דגימות שלהם לצורך ריצוף הפלסמיד שהוחדר אליהם, ומכיל את תוצר ה-PCR.

**טבלה מס' 2 - רשימת נוגדנים ששימשו במסגרת עבודה זו, בבדיקות Western Blot**

| נוגדן ראשוני   | נוגדן שניוני                                    |
|--|---|
| Mouse Anti Hsp70/Hsc70 Monoclonal Antibody (Stressgen), concentration: 1 µg/ml in 5% dry milk  | Anti - Mouse IgG + HRP produced in goat (Sigma) |
| Rabbit Anti Spinach Hsp21 (gift from Avi Perl, Volcani ctr), dilution: 1:3,500 in 5% dry milk  | Goat Anti Rabbit IgG + HRP (Bio - Rad)          |
| Goat Anti Chenopodium Mitochondrial sHsp (gift from Achim Gau, University of Hannover, Germany), dilution: 1:1,000 in 7.5% dry milk      | Rabbit Anti Goat +HRP (Sigma)                   |
| Rabbit Anti sHsp 17.6 Class I (Az101I), (gift from Elizabeth Vierling , University of Arizona, USA), dilution: 1:1,000 in 5% dry milk    | Goat Anti Rabbit IgG + HRP (Bio - Rad)          |
| Rabbit Anti sHsp 17.6 Class II (AZ102I), (gift from Elizabeth Vierling , University of Arizona, USA), dilution: 1:1,000 in 7.5% dry milk | Goat Anti Rabbit IgG + HRP (Bio - Rad)          |
| Rabbit Anti OsHsp101 (gift from Anil Grover, University of Delhi, India), dilution: 1:2,500 in 10% dry milk                              | Goat Anti Rabbit IgG + HRP (Bio - Rad)          |

**טבלה מס' 3 - רשימת תחלים עבור גנים שנבדקו במסגרת עבודה זו, באמצעות ריאקציות PCR**

| שם החלבון                                | מיקום בתא               | MW (kDa) | Seqence Accession | Data Base | Forward Primer 5-3          | Reverse Primer 5-3           |
|--|-------------------------|----------|-------------------|-----------|-----------------------------|------------------------------|
| sHsp Class I                             | ציטופלסמה               | 17.6     | TC1973            | TIGR      | TCGACATGTTT<br>GATCCATTCA   | TTCCTCTCTCC<br>GCTAATCTGA    |
| sHsp Class II                            | ציטופלסמה               | 17.6     | U72396            | NCBI      | GTGGATATGCC<br>AGGGTTGAAAT  | ACAAACTGCAG<br>AAATTGCATCAG  |
| Hsp20                                    | כלורופלסט               | 21       | AY224603          | NCBI      | GTCAAAACGG<br>TCAAGGAGGA    | CGTATTTCCCC<br>TGATCCTGA     |
| Mitochondrial sHsp                       | מיטוכונדריה             | 22       | TC157             | TIGR      | TGTTTTCCGATC<br>CTTCAATACT  | TCATCATCTGG<br>TCCATCATGT    |
| Hsp70                                    | ציטופלסמה               | 70.998   | TC15              | TIGR      | CACTGCTCAG<br>ACCACCATTG    | TTCTAGTGGA<br>GCCACCAACC     |
| Hsp70                                    | מיטוכונדריה             | 70.447   | TC5601            | TIGR      | ACGCCTTGCT<br>CAGATCTCTC    | CCAGCAGGTTT<br>GGAGCTAGA     |
| Hsp70                                    | כלורופלסט               | 75.515   | EF210358          | NCBI      | AGGTGGTGGG<br>AATTGACTTG    | GGACACATGC<br>TTGGACTCCT     |
| Hsp90 (Grp94)                            | ER                      | 93.492   | TC3781            | TIGR      | ATCAACCCTA<br>GGCACCCAAT    | TGGTTTCAGCC<br>TCAGGTTCT     |
| HsP90                                    | ציטופלסמה/<br>כלורופלסט | 80.159   | TC3244            | TIGR      | GCTGAAGAAGAA<br>GGGATATGAGG | CGTCCTTGATT<br>ACCTTGCAGA    |
| Hsp100 (ClpC) <sup>1</sup>               | כלורופלסט               | 102.711  | TC6487            | TIGR      | TGCCTACTGCA<br>GTGGTTACAT   | CGTTCCTAAGATT<br>CTTAACTCTCC |
| Hsp100 (ClpP <sub>2</sub> ) <sup>2</sup> | מיטוכונדריה             | 32.370   | TC5178            | TIGR      | GCCATCACGTT<br>CAGGAATTT    | TGGTATCGAA<br>TACGGCCATT     |
| Hsp100 (ClpP <sub>4</sub> ) <sup>2</sup> | כלורופלסט               | 32.316   | TC6545            | TIGR      | TTCCCAAACCTT<br>CACCTGCT    | GCATCAGCAAA<br>GAAGTCATCA    |
| Hsp60                                    | מיטוכונדריה             | 61.211   | TC5202            | TIGR      | GTTCGAGATG<br>CTGGGAACAT    | AACACAGCAA<br>CACCTCCAGA     |
| Hsp60 α subunit                          | כלורופלסט               | 62.072   | TC3741            | TIGR      | ACTTGGTCCTA<br>GGGGAAGGA    | CACTGGATTT<br>GCACCAGATG     |
| HsP60 β subunit                          | כלורופלסט               | 63.020   | TC3344            | TIGR      | AGTTGGCCTT<br>ACCTTGGACA    | CCTTTGTTGCA<br>TTGAGAGCA     |
| Hsp60 (TCP1) <sup>3</sup>                | ציטופלסמה               | 12.824   | TC4391            | TIGR      | AATGATGGTCCC<br>TGATTGTCA   | TCAAACAGCTT<br>CGCAACATC     |
| 18s rRNA                                 |                         |          | TC3276            | TIGR      | CTGAGAAACGG<br>CTACCACAT    | GACTCATTGAG<br>CCCGGTATTG    |

1 - תת יחידה רגולטורית

2 - תת יחידה פרוטאוליטית

3 - co - chaperone



## נספח ב' - תוצאות גולמיות של ריצוף תוצרי PCR המקודדים לחע"ח

ריצוף של נציגים ממשפחות חע"ח העיקריות המתבטאים בעלים ובאבקה של פלפל

ע"מ ללמוד את הביטוי של גנים השייכים למשפחות השונות של חע"ח בעלים ובאבקה של פלפל ברמת ה - RNA, תכננו תחלים מתאימים. התחלים תוכננו על סמך המידע במאגר ה - EST's של TIGR (The Institute for Genomic Research). רצפים באורך 100 - 300 bp בודדו באמצעות PCR על בסיס cDNA שהוכן מעלים צעירים מנותקים שנחשפו לעקת חום (3 שעות בטמפי של 40°C). התחלים המתאימים שימשו למעקב אחר רמת הביטוי של הגנים בשיטת Semi Quantitative PCR כמפורט בפרק חומרים ושיטות. הריצוף נעשה ע"מ לוודא שתוצרי ה - PCR שהתקבלו בניסויים שנעשו באבקה ובעלים מייצגים מקטעי גנים המקודדים לחע"ח.

במסגרת העבודה נבדקו 17 גנים :

- א. 18S rRNA : גן קונסטיטוטיבי המתבטא ברמות גבוהות בכל רקמות הצמח ומשמש כגן ביקורת.
- ב. sHsp's : ממשפחה זו נבחרו שני נציגים ל - sHsp's ציטופלסמטיים ( Class I, Class II), נציגי מיטוכונדריאלי ונציג כלורופלסטי (Hsp20).
- ג. Hsp60 (Chaperonin 60) : ממשפחה זו נבחרו 2 נציגים כלורופלסטיים המייצגים את שתי תת היחידות  $\alpha$  - ו -  $\beta$  ונציג מיטוכונדריאלי. מכיוון שהרצף של הנציג הציטופלסמטי לא ידוע בפלפל, נבחר רצף המייצג גן המקודד ל צ'אפרון הנלווה שלו.
- ד. Hsp/Hsc70 : ממשפחה זו נבחר נציג ציטופלסמטי ונציג מיטוכונדריאלי. מכיוון שהרצף של הנציג הכלורופלסטי לא היה ידוע בפלפל, תכננו תחלים עבור רצף של גן זה בעגבנייה וריצפנו את תוצרי ה - PCR עבור הגן המקודד בפלפל. תוצר הריצוף שלנו פורסם באתר ה - NCBI (National Center for Biotechnology Information).
- ה. Hsp/Hsc90 : ממשפחה זו נבחרו שני נציגים : נציג בעל הומולוגיה לרצפים ציטופלסמטי וכלורופלסטי, ונציג שמתבטא ב - ER.
- ו. Hsp100/Clp : מכיוון שהרצף של הנציג הציטופלסמטי לא ידוע בפלפל, ריצפנו מקטעים המקודדים לשני נציגים כלורופלסטיים ונציג מיטוכונדריאלי. אנו ריצפנו מקטעים המקודדים ל - ClpC (תת יחידה רגולטורית בכלורופלסט), ClpP<sub>2</sub> (תת יחידה פרוטאוליטית בכלורופלסט) ו - ClpP<sub>4</sub> (תת יחידה פרוטאוליטית במיטוכונדריה).

18S rRNA Amplicon Sequence:

התחלים תוכננו על סמך אזור שמור ברצף גנים של 18S rRNA מפלפל, שנמצאים במאגר המידע של  
TIGR Accession # EF564281 - NCBI Est - TC3276 במאגר המידע של

```
GACTCATTGAGCCCCGGTATTGTTATTTATTGTCACCTCCCCG  
TGTCAGGATTGGGTAATTTGCGCGCCTGCTGCCTTCCTGGATGTGGTAG
```

תוצאות הריצוף שלנו מראות 100% לרצף של שני הגנים הקיימים במאגר של NCBI

ב. משפחת sHsp's

ב. 1

cytoplasmatic sHsp Class I Amplicon Sequence:

התחלים תוכננו על סמך רצף שמור יחסית בין שני Est's של חע"ח מתת משפחה זו שבודדו מפלפל  
ונמצאים במאגר המידע של TIGR - TC1973, TC342

```
TTCCCTCTCTCCGCTAATCTGAAGAACACGATCCTCTTCGATCTCCACT  
TTCACCTTCTTCCCTTCTTGAGCCCTGGAAGATCAGCCTTGAACACATGTGC  
CTCAGGAGTTTCCCTCCAGTCGATTCGAGTGTGGCAAATGCAGAGGTCT  
CCCTTGAACCTGGAACCTGGGAAGCCTAATTCCTGAATGGATCAAACACG  
TCCATTGCGAAGGGATCGAACATGCTGCTGCTTCGTCGATCGCCGAA
```

הרצף שנמצא מראה 99% הומומולוגיה לרצף TC342 ו- 91% הומומולוגיה לרצף TC1973 במאגר של  
TIGR. כמו - כן, רצף זה הוא בעל 90% הומומולוגיה ל- Accession # AF123257 מ- NCBI המקודד  
לחע"ח בעגבנייה מתת משפחה זו. עבור גן זה, נבדקו אחוזי ההומומולוגיה במאגר של NCBI. הרצף שנמצא  
פורסם באתר NCBI ומספרו הוא Accession # EU311413

ב. 2

cytoplasmatic sHsp Class II Amplicon Sequence:

מקטע מן הגן הזה הוגבר לצורך הריצוף בעזרת פריימרים קיימים במעבדה, שתוכננו עבור גן של חע"ח  
מתת משפחה זו שבודדו מעגבנייה ונמצאים במאגר המידע של NCBI - Accession # U72396

```
ACAAACTGCAGAATTGCATCAGTATTAGCATTCTCTGGCAGAGTA  
AACTTCCTCATGAATTTCCCAACCCTTCTCTCCATTCTGATATACTTTGC  
ACCTTCTTTCTCTTCTTCCCTTCTTCCCTTTCCCGCTAATAAGCAGCACAT  
TTTCTCTTTCCACCTGCACCTTTGATGTCTCCAGATTTCAACCCTGGCATA  
TCCACAATC
```

תוצאות הריצוף שלנו מראות 93% זהות לרצף הגן הקיים במאגר של NCBI ו- 97% זהות לרצף ה - Est  
TC3893 (מייצג רצף נציג תת משפחה זו בפלפל ב - TIGR) במאגר של TIGR. הרצף שנמצא פורסם באתר  
NCBI ומספרו הוא Accession # EU311414

ב. 3

mitochondrial sHsp Amplicon Sequence:

התחלים תוכנו על סמך רצף שמור יחסית בין שני Est's של חע"ח מתת משפחה זו שבודדו מפלפל  
ונמצאים במאגר המידע של TIGR - TC157, TC158

```
TGTTTTCCGATCCTTCAATACTAACACTCAGATGACAACCTTAC  
GATGATGATGATCGCAGCGTTGAAGTTGAAAAGACGCCCTGATCGCTCTGT  
TTCTCGCCGCCAGGACGCTTTCCCCAGCTTCTTCTCAGATGTATTTCGATC  
CATTTTACCTCCAAGGAGCGTGAGTCAGCTGCTGAACATGATGGACCAG  
ATGATGAAT
```

הרצף שנמצא מראה 98% הומומולוגיה לרצף TC157 ו- 83% הומומולוגיה לרצף TC158 במאגר של TIGR.  
הרצף שנמצא פורסם באתר NCBI ומספרו הוא Accession # EU311415

ב. 4

chloroplast sHsp Amplicon Sequence:

התחלים תוכנו על סמך רצף הגן של חע"ח מתת משפחה זו שבודד מפלפל ונמצא במאגר המידע של NCBI  
Accession # AY224603 -

```
CGTATTTCCCCTGATCCTGATGCCCTGTTCCCTTCCCTGGGAATGTCATG  
GTATCCTCGAATAATCTGTCCATAGTGTCCATCATTTGCCGCATTGTTCT  
CATGGGTGACATTGGATCTAACAGTCCGAAAAGGGGAGACATCGAGAGCCA  
TCCTCCTAGGACGTTGCTCAACAGCAGTGCTTTTGTGTTTCCCTCCTTGA  
CCGTTTTGACA
```

הרצף שנמצא מראה 98% זהות לרצף הגן הקיים במאגר של NCBI. מכיוון שהרצף שנמצא אינו זהה  
במאה אחוזים לרצף שעבורו תוכנו התחלים, הרצף שנמצא פורסם באתר NCBI ומספרו הוא  
Accession # EU311416

ג. משפחת (Hsp60 Chaperonin 60)  
1. ג.

cytoplasmatic Hsp60 (TCP1) co - chaperone Amplicon Sequence:

התחלים תוכננו על סמך רצף Est של חעי"ח מתת משפחה זו שבודד מפלפל ונמצא במאגר המידע של  
TC4391 - TIGR

```
AATGATGGTCCCTGATTGTCACAAGCGCCTGGAAGCAGCAC
TAGAGGACCTTAAAGGAACTCTGGTTGAGTTAGAGGAGACGGACCAAAA
GAAGGCCATGAATTTGAAGAAGCTCGAAACATAGTAACAGATGTTGCGAA
GCTGTTTGAATC
```

הרצף שנמצא מראה 99% הומולוגיה לרצף הקיים במאגר של TIGR. הרצף שנמצא פורסם באתר NCBI  
ומספרו הוא Accession # EU311417

2. ג.

mitochondrial Hsp60 Amplicon Sequence:

התחלים תוכננו על סמך רצף Est של חעי"ח מתת משפחה זו שבודד מפלפל ונמצא במאגר המידע של  
TC5202 - TIGR

```
TTAACACAGCAACACCTCCAGAAATCTTAGCTAGTCTTTCCTGCAACTTCTCC
TTGTCATAGTCAGATGTGCTCGATTCAATGGCTGATCTAATCTGTGCACA
TCGTTCCCTCTATGGACTTCTTCTCACCAGCACCATCAAGAATGACAGTAT
CATCCTTGGAGATGGTCACCTTTTTACATGTTCCAGCATCTCGAAC
```

הרצף שנמצא מראה 97% הומולוגיה לרצף הקיים במאגר של TIGR. הרצף שנמצא פורסם באתר NCBI  
ומספרו הוא Accession # EU311418

3. ג.

chloroplast Hsp60 ( $\alpha$  subunit) Amplicon Sequence:

התחלים תוכננו על סמך רצף Est של חעי"ח מתת משפחה זו שבודד מפלפל ונמצא במאגר המידע של  
TC3741 - TIGR

```
ACTTGGTCCTAGGGGAAGGAACGTGGTGTGGACGAGTATGGCACCCTA
AGGTGGTTAATGACGGAGTTACAATTGCTCGAGCTATAGAGCTACCTGAT
GCTATGGAGAATGCTGGGGCTTCCCTTATCAGGGAGGTTGCAAGCAAAA
CCAATGATTCAGCTGGTGTGATGGAACCACAACCGCATCTGTTCTTGCTCGA
GAAATCATTAACCTTGGTCTGTTGAGTGTACATCTGGTGCAAATCCAGTG
```

הרצף שנמצא מראה 99% הומוולוגיה לרצף הקיים ו - 80% הומוולוגיה ל - TC מייצג נוסף (TC7343),  
במאגר של TIGR. הרצף שנמצא פורסם באתר NCBI ומספרו הוא Accession # EU311419

ג. 4

chloroplast Hsp60 ( $\beta$  subunit) Amplicon Sequence:

התחלים תוכננו על סמך רצף Est של חע"ח מתת משפחה זו שבודד מפלפל ונמצא במאגר המידע של  
TIGR - TC3344

```
CCTTTGTTGCATTGAGAGCATCTTCCACTCTAAGCTTTTTCTCTT  
TCAACTCAGTTTCAGTTTGTGCTCCAACCTGTATGACAGCCACACCTCCA  
GATAATTTTGCAATCCTTTTCATTTAGCTTTTCTTTTCATAATCTTGCTC  
TGCAGCCTCTATCAGGTTTTTAATCTGTGCAACACGCTTATTGACTGCTT  
CCTGAGTGCTACCATCACCAACAATTGTAGTGGCATCCTTAGTCAGCACT  
ACTTTAGCAGCATGGCCTAGAACTTCTTGTGTCAGCCTTGTCCAAGGTAAG  
GCCAACT
```

הרצף שנמצא מראה 99% הומוולוגיה לרצף הקיים במאגר של TIGR. כמו - כן, רצף זה הוא בעל 95%  
הומוולוגיה לגן Accession # STU46136 מ - NCBI המקודד לחע"ח בסולנום אחר, מתת משפחה זו.  
עבור גן זה, נבדקו אחוזי ההומוולוגיה במאגר של NCBI. הרצף שנמצא פורסם באתר NCBI ומספרו הוא  
Accession # EU311420

ד. Hsp/Hsc70

ד. 1

cytoplasmatic Hsp70 Amplicon Sequence:

התחלים תוכננו על סמך רצף שמור יחסית בין שני Est's של חע"ח מתת משפחה זו שבודדו מפלפל  
ונמצאים במאגר המידע של TIGR - TC121, TC15

```
TTCTAGTGGAGCCACCAACCAGAACAACATCATGAACTGTACTC  
TTGTCCATCTTAGCATCCCTCAAACACTTCTCAACTGGTTCCATACACTT  
CCTAAACAGATCCATGTTAAGCTCTTCAAATCTAGCACGTGTGATGGTGG  
AGTAGAAATCAATACCCTCATACAAAGAGTCAATTTCAATGGTGGTCTGA
```

הרצף שנמצא מראה 100% הומוולוגיה לרצף TC15 ו - 86% הומוולוגיה לרצף TC121 במאגר של TIGR.  
כמו - כן, רצף זה הוא בעל 95% הומוולוגיה לגן Accession # X54030 מ - NCBI המקודד לחע"ח  
בעגבנייה מתת משפחה זו. עבור גן זה, נבדקו אחוזי ההומוולוגיה במאגר של NCBI. הרצף שנמצא פורסם  
באתר NCBI ומספרו הוא Accession # EU311421

mitochondrial Hsp70 Amplicon Sequence:

התחלים תוכנו על סמך רצף Est של חעי"ח מתת משפחה זו שבודד מפלפל ונמצא במאגר המידע של  
TC5601 - TIGR

```
TTCCAGCAGGTTTGGAGCTAGATGGTCTAGCCAGACCAGCCCATT  
AGCACCAACTGATGGACACCAGGAAGGCTTGGTGTGGAAGCAAAAGTT  
CTATAAGTGGAGAGAGAAGAGGTTAAATTCGCGGCGACGGAGAGATCTGAG
```

הרצף שנמצא מראה 97% הומומולוגיה לרצף הקיים במאגר של TIGR. הרצף שנמצא פורסם באתר NCBI  
ומספרו הוא Accession # EU311422

chloroplast Hsp70 Amplicon Sequence:

מקטע מן הגן הוגבר ע"ס פריימרים שתוכנו עבור רצף Est בעגבנייה (TIGR: TC185059) מכיוון שהרצף  
עבור גן זה בפלפל, אינו ידוע.

```
GGACACATGCTTGGACTCCTCATCCACCTCATTTCATCTTCCTCCCAATA  
AACCTCTTCACCGAAAAGAAGGTATTCTCCGATTACCCACGGCCTGACG  
TTTCGCAATTTGTCCAACAAGCCTATCCCCGCTTGGTATACGCCACGA  
CTGAAGGAGTCGTCCGTTGCCCTCCGCGTTCGTTACTATAGTCGGCTTC  
CCTCCTTCCATAGCAGCCACAGCTGAATTAGTCGTCCCAAGTCAATTCC
```

תוצר הריצוף הוא בעל 80% הומומולוגיה לגן מ - NCBI, המקודד ל - HSP70 כלורופלסטי בתרד  
(Accession # AF035456) ו - 87% הומומולוגיה ל - Est מעגבנייה שעבורו תוכנו הפריימרים. בדיקת  
אחוזי ההומומולוגיות התבצעה במאגר של NCBI. משמעות התוצאות הללו היא שריצפנו מקטע מתוך גן  
שהרצף שלו לא היה ידוע עד כה בפלפל. פרסמנו את התוצאות הנ"ל באתר ה - NCBI וקיבלנו מספר עבור  
המקטע: Accession # EF210358.

ה. Hsp/Hsc90

cytoplasmic + chloroplast Hsp90 Amplicon Sequence:

התחלים תוכנו על סמך רצף Est של חעי"ח מתת משפחה זו שבודד מפלפל ונמצא במאגר המידע של  
TC3244 - TIGR. רצף זה הוא בעל 55% הומומולוגיה לגן Accession # AY705371 מ - NCBI המקודד  
ל - Hsp90 כלורופלסטי ב - Chlamydomonas. בנוסף לכך, הרצף הוא בעל 67% הומומולוגיה לגן

Accession # BC007989 המקודד ל - Hsp90 ציטופלסמטי באדם. עבור רצף זה, נבדקו אחוזה ההומולוגיה במאגר של NCBI. ע"ס העובדות הנ"ל התייחסתי לרצף זה כמייצג גנים כלורופלסטיים וציטוזולים של חלבוני Hsp90.

```
CGTCCTTGATTACCTTGCAGAGCCCCCTCGAACTTCTCCTTCAAT
TCCTCCTTCTTTTTCTTCTCATCCTCGCTTTCATCGAGTTTGAGACCTTC
CTTGGTAGCAGAAACACGCTTCTTACCTTCAAATTCCTTCAGCTGACCGA
TACAGTACTCGTCAATAGCATCAACCATGTAAAGAACCTCATATCCCTTC
```

הרצף שנמצא מראה 99% הומולוגיה לרצף הקיים במאגר של TIGR. כמו - כן, רצף זה הוא בעל 85% הומולוגיה לגן Accession # AY368906 מ - NCBI המקודד לחע"ח בעגבנייה מתת משפחה זו. עבור גן זה, נבדקו אחוזה ההומולוגיה במאגר של NCBI. הרצף שנמצא פורסם באתר NCBI ומספרו הוא Accession # EU311424

ה. 2

ER Hsp90 (Grp94) Amplicon Sequence:

התחלים תוכננו על סמך רצף Est של חע"ח מתת משפחה זו שבודד מפלפל ונמצא במאגר המידע של TIGR - TC3781

```
TTGGTTTCAGCCTCAGGTTCTTTCAGCTACGTCTTCTTCTTCATCGACTGT
TGCATCAGGGCTAATGTTTAGACTGCTCTTAACTGAGCTGTAGATTTGGG
AGGCAAAATTCTTTGGATCACTGAGCTCGAAGCCACTCTCCATTAAGCT
GTTTGGTAAATAAGTTTTGCTGTCAGCTTCACTCTCATCCTCTGGGTC
AGTTACTACTTTCTCCAGAAGCCCTTTGATAAATTGGGTGCCTAGGGTTGA
```

הרצף שנמצא מראה 100% הומולוגיה לרצף הקיים במאגר של TIGR. הרצף שנמצא פורסם באתר NCBI ומספרו הוא Accession # EU311423

ו. Hsp100/Clp

ו. 1

chloroplast Hsp100 (ClpC) Amplicon Sequence:

התחלים תוכננו על סמך רצף Est של חע"ח מתת משפחה זו שבודד מפלפל ונמצא במאגר המידע של TIGR - TC6487

```
TTTGCCTACTGCAGTGGTTACATGGTATACTACTATTTCTCTTTTTTG
AGTAGACTGGGCTGGGCTATATTGCTTATATNTGCCTTTATGAGACACAA
CCATTCAAGCCTCCTTTCAAGCATTTATATATCTCTAGGAGCAGTTAAA
```

הרצף שנמצא מראה 95% הומולוגיה לרצף הקיים במאגר של TIGR. הרצף שנמצא פורסם באתר NCBI ומספרו הוא Accession # EU311427

2 .1

chloroplast Hsp100 (ClpP<sub>4</sub>) Amplicon Sequence:

התחלים תוכנו על סמך רצף Est של חע"ח מתת משפחה זו שבודד מפלפל ונמצא במאגר המידע של TIGR - TC6545

```
TTTTCCCAAACCTTTACCTGCTTTCTCCCCATACCCATCTCGGAAAACCTC
TTTATCACTCAAATCTTCACTCACTTCCCACCAACCCACTTCAAAAACAC
TTTCTGATGACAAGTTTTTCATTGCTACTTGCATCGGCTCCTCAGACACCC
GGGACGGCTATGGCTGGTGC GGGAGCTGACGCAATGGGGCTGTTGTTTAG
GGAGAGGATTGTTTTCTTGGGTAATAATATTGATGACTTCTTTGTGATGC
```

הרצף שנמצא מראה 99% הומולוגיה לרצף הקיים במאגר של TIGR. הרצף שנמצא פורסם באתר NCBI ומספרו הוא Accession # EU311426

3 .1

mitochondrial Hsp100 (ClpP<sub>2</sub>) Amplicon Sequence:

התחלים תוכנו על סמך רצף Est של חע"ח מתת משפחה זו שבודד מפלפל ונמצא במאגר המידע של TIGR - TC5178

```
GCCATCACGTTTCAGGAATTTGGTCTATCAGAGATGACGTGCAAATGCC
ATCATCACCTTATTTTCTACATATGCCAAGGTCAAGGACCACCGCCGA
TGGTTCAAGAACGATTTTCAGAGTGTGATCAGCCAGCTCTTTC AATATAGG
ATCATAACGATGTGGTGGAGCAGTTGATGATGATATGGCTAATATCATAGT
CGCTCAGCTTCTTTATCTTGATGCTGTTGATCCCACAAAGGACATTTGTC
TGTATGTCAACTCTCCAGGAGGTTTCAGTAACAGCAGGAATGGCCGTATTC
```

הרצף שנמצא מראה 99% הומולוגיה לרצף הקיים במאגר של TIGR. כמו - כן, רצף זה הוא בעל 95% הומולוגיה לגן Accession # AJ308540 מ - NCBI המקודד לחע"ח בעגבנייה מתת משפחה זו. עבור גן זה, נבדקו אחוזי ההומולוגיה במאגר של NCBI. הרצף שנמצא פורסם באתר NCBI ומספרו הוא Accession # EU311425



## Summary

Pepper (*Capsicum annuum*) is a thermophilic species and is very sensitive to low night temperatures where the vegetative and reproductive development are affected. The compensation method, which constitutes the basis of this work, is based on the idea that plant exposure to moderate heat stress during the day will activate defense mechanisms against the low night temperatures of the winter.

The pollen is the plant's most sensitive organ to abiotic stresses. Very little is known about defense mechanisms against stress in developing pollen grains. Heat shock proteins are related to maintaining the conformation, prevention sedimentation and aggregation of proteins in response to the exposure to heat stress or other abiotic stresses. These proteins may also be involved in the defense mechanisms of the developing pollen grains.

In order to find out the role of heat shock proteins, in the defense against cold stress in pepper, their expression profile was examined in leaves of young plants, following a heat treatment. In addition, the expression profile was examined in pollen and leaves of mature plants, exposed to higher day temperatures. As controls, plants were exposed to optimal conditions (high night temperatures) or to non heating conditions during day or night.

In contrast to the common opinion that pollen is lacking in expression of Hsp's, the results of this study indicates that Hsp's are induced by exposure to compensation treatments. Organelles' sHsp's, Hsp70 and Hsp60 were induced in pollen grains, following their exposure to heat treatments of the compensation method.

In leaves, organelles' sHsp's and Hsp60 were induced during the compensation treatments. Differences in the Hsp's expression profiles have been observed between the young leaves from young or mature plants. For example the induction of Hsp70 due to the exposure to heat which occurred in leaves of young plants but not of mature plants or the expression of sHsp class I in young plants but not in mature plants.

There is a correlation between Hsp's expression in leaves and pollen and between the positive effects of the compensation treatments on the plants, which can indicate on possible involvement of Hsp's at this mechanism, but not at unequivocal way. The heat response network at cells is very complex and it will be very interesting to learn more about additional factors, which are involved in this mechanism. In future, it will be feasible to explore the expression profile of plant hormones, Hsf's and APX, since there is a cross - talk between different abiotic stresses.

**High day temperatures prevent the adverse effects of  
low night temperatures in pepper: The involvement  
of heat shock proteins**

**Thesis submitted to the Faculty of agriculture, Food  
and Environmental Quality Sciences, The Hebrew  
University of Jerusalem, For the degree of "Master  
of Science"**

**By: Sarit Cohen Michael**

**June 2008**

**Rehovot, Israel**