

בחינת גורמים אנדוגניים המשפיעים על מאזן הורמונלי ועל גודל פרי באבוקדו 'האס'

Endogenic factors affecting 'Hass' avocado hormonal homeostasis and fruit size

ורד יריחימוביץ : המחלקה למטעים מינהל המחקר החקלאי בית דגן

ליאו וינר : שה"ם

גד איש עם : מ"ופ גליל מערבי

אפריל 2009

סיוון תשס"ט

תקציר

הבעיה העיקרית בזן האבוקדו 'האס' הינה בעיית גודל פרי. אחוז גבוה מכלל הפירות לעץ הינם בעלי משקל סופי נמוך, תופעה המהווה בעיה חקלאית המשפיעה על רווחיות המטע. בעבודות קודמות נמצא כי בפירות קטנים חלה עלייה חדה ביצירת / צבירת חומצה אבסיסית (ABA) והוצע כי עלייה זו עשויה להוות גורם המעכב את חלוקת התאים בפרי. המידע הקיים לגבי סינטזת ABA בפרי האבוקדו ואופן בקרתה מצומצם. מחקר זה הציע: 1- שיבוט, אפיון ולימוד השעתוק של גנים מאבוקדו המעורבים במסלול הביוסנטזה של ABA במהלך התפתחות הפרי. 2- זיהוי ואפיון גנים ייחודיים המבוטאים בפרות הקטנים במהלך ההתפתחות. 3- שילוב טיפולי PGRs ובדיקת השפעתם על גודל הפרי ועל ביטוי הגנים הנ"ל. להלן מוצגות תוצאות העבודה: **חלק 1** - עד כה שיבטנו מקטע גן מאבוקדו המקודד לכאורה ל-MoCo Sulfurase, אנזים הפועל בשלבים אחרונים של סינטזת ABA. נתונינו מורים כי במהלך התפתחות פרי קטן חלה עלייה ברמת השעתוק של הגן המקודד ל-NCED3 בעוד ביטוי של הגן המקודד ל-MoCo Sulfurase הינו כמעט קונסטטיטטיבי עם עלייה מתונה בביטוי תעתיק הגן בשלבים אחרונים של התפתחות הפרי. מכאן ניתן להסיק כי העלייה ברמת ABA בפירות הקטנים, אשר עליה דווח בעבר, מקורה מסינתזה *de novo* של ABA, עלייה זו מבוקרת ברמת השעתוק ותלויה בשעתוק הגן המקודד לאיזופורם-NCED3. לגן המקודד לכאורה ל-*PaMoCo Sulfurase* כנראה תפקיד בקרת משני בבקרת יצור ABA. **חלק 2** - בעגבנייה זוהה הגן *Lefw2.2*, כגן המקודד לחלבון הפועל כבקר שלילי של חלוקת תאים בפרי. באמצעות שימוש בשיטת RT-PCR איתרנו גן מאבוקדו (*Pafw2.2*) החולק הומולוגיה גבוהה לגן *Lefw2.2*. מצאנו כי במהלך התפתחות הפרי *Pafw2.2* מתבטא ביתר ברקמות פרי קטן, ממצא המרמז כי *Pafw2.2* עשוי לקודד לחלבון הפועל באופן דומה ל-*LeFW2.2*. קשר אפשרי בין שינויים ברמת ABA בפרי קטן, עלייה ברמת הביטוי של *Pafw2.2* ועיכוב בתהליך חלוקת התאים מוצגים בדיון. **חלק 3** - נבחנה השפעת בנוזל אדנין על היבול וכמות הפרי הגדול ב'האס'. תוצאות ניסויי שבוצע ביד חנה הראו כי יישום בנוזל אדנין שבועיים לאחר סוף פריחה ו-56 יום לאחר סוף פריחה הגבירו את היבול הכללי מעל הביקורת הן בריכוז 40 ח"מ והן בריכוז 80 ח"מ. ניסוי במתקונת דומה יבוצע בשנה הבאה ביד חנה ובנגבה - הניסוי ילווה בדיוגם פירות גדולים וקטנים ובבדיקת דגם ביטויים של גנים ספציפיים

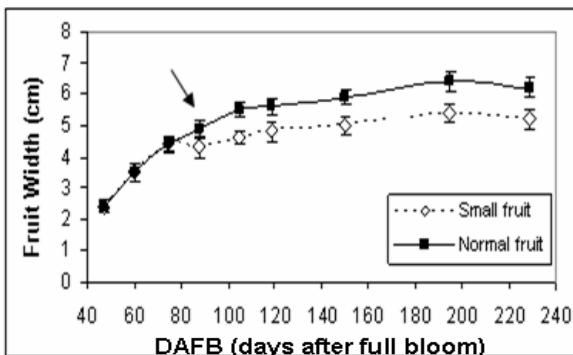
1. מבוא ותיאור הבעיה: הזן 'האס' מהווה מרכיב חשוב בין זני האבוקדו בארץ. לזן זה פוריות סבירה, טעם ומירקם טובים ועונת שיווק מתאימה. הבעיה העיקרית בזן זה הינה בעיית גודל פרי, אחוז גבוה מכלל הפירות לעץ (כ 40%-60%) הינם בעלי משקל סופי נמוך, תופעה המהווה בעיה חקלאית המשפיעה על רווחיות המטע. הבדלי הגודל בין פירות גדולים וקטנים ניתנים לזיהוי בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרי. אפיון פירות קטנים הראה שקליפת הזרע של פירות אלו מתנוונת בשלבי התפתחות מוקדמים וקצב גידולם מואט. ידוע כי התפתחות וגידול פרי תלויים בקצב חלוקת התאים ובגידולם, ברוב מיני הפירות חלוקת תאים נמשכת במשך תקופה קצרה לאחר החנטה, אולם באבוקדו חלוקת התאים נמשכת במהלך כל שלבי התפתחות הפרי (1). מחקר אנטומי השוואתי שנערך בזן 'האס' הוביל למסקנה כי הגורם המגביל את התפתחות הפירות הקטנים אינו גידול התאים אלא עיכוב בתהליך חלוקתם (2). ממצא זה הוביל לסדרת עבודות שנערכה במטרה לנסות ולאפיין שינויים במאזן ההורמונלי בפירות קטנים, אשר עשויים להשפיע על מערך חלוקת התאים (ראה 9-2).

מאזן הורמונלי והשפעתו על התפתחות פרי באבוקדו 'האס': ככלל, מהלך חלוקת התאים בפרי מבוקר על ידי הורמונים צמחיים המיוצרים בחלקי הצמח השונים, בעובר ובחלקי פרי נוספים. בתחילת שנות השבעים הודגמה לראשונה חשיבות ציטוקינינים (CK) בהתפתחות פרי האבוקדו. רמות גבוהות של ציטוקינינים נמדדו ברקמת הציפה ונמצא מתאם חיובי בין רמת הציטוקינינים לבין קצב גידול הפרי (10). במחקרים מאוחרים נמצא, כי במהלך התפתחות הפרי, חלה עלייה חדה ברמת חומצה אבסיסית (ABA) ברקמת הציפה של פירות קטנים (2). ידוע כי ציטוקינינים מעודדים חלוקת תאים ואילו חומצה אבסיסית עשויה לעכב תהליך זה. לכן, הוצע כי שינוי ביחס בין רמת הציטוקינין לבין רמת ABA, הנובע מעליה בסינטזת ABA, גורם לעיכוב בתהליך חלוקת התאים ולהאטת גידול הפרי. בדיקות נוספות הראו כי בזרעי פירות קטנים חלה עלייה בייצור/צבירת ABA וירידה בייצור/צבירת IAA. אוקסין ידוע כהורמון צמחי המעודד התרחבות וחלוקת תאים, ולכן נטען כי במקביל לעלייה ברמת ABA, חוסר היכולת ליצור/לצבור IAA, מהווה גורם מכריע המשפיע על גודל הפרי הסופי (4). למרות המידע הקיים אודות השינויים במאזן ההורמונלי החלים במהלך התפתחות הפרי, הידע אודות הסיגנלים המולקולארים הקושרים בין פעילות מחזור התא בפרי האבוקדו ובין השינויים הורמונאליים החלים בפרי הינו מועט ביותר. ידוע כי ל-ABA תפקיד מרכזי בבקרת הסתגלות צמחים לתנאי עקה ובבקרת תהליכי התפתחות שונים ביניהם תהליך חלוקת תאים. מסלול סינתזת ABA הינו מסלול אוניברסלי המשותף לצמחים עילאיים (11,12). השלבים הראשונים של סינתזת ABA מתרחשים בפלסטידות, בהן חל ביקוע הפרקורסור הקרטנואידי - 9-cis-violaxanthin, המוביל ליצירת קסנטוקסין (Xanthoxin), שהינו חומר ביניים במסלול סינתזת ABA (13). המשך מסלול הסינתזה מתרחש בציטוזול לאחר מעבר קסנטוקסין לציטופלסמה, כאשר חמצונו של ABA-aldehyde הינו השלב האחרון במסלול סינתזת ABA, תהליך זה מקוטלז ע"י האנזים Aldehyde oxidase (AO). מספר היבטים, הקשורים בבקרת סינתזת ABA נחקרו בשנים האחרונות במערכות מודל צמחיות שונות. בעבודות אלו זוהו מספר משפחות גנים המקודדות לאנזימים המעורבים במסלול סינתזת ABA ואופיין שעתוקם ברקמות שונות ובתנאי עקה שונים. המידע הקיים לגבי סינתזת ABA בפרי האבוקדו ואופן בקרתה במהלך התפתחות הפרי מצומצם. בקרת מסלול סינתזת ABA נחקרה באבוקדו בעיקר בהקשר להבשלת פרי, כאשר המניע למחקר היה הממצא שהראה כי באבוקדו רמת ייצור ABA עולה במהלך תהליך ההבשלה. מחקרים אלו, הובילו לשיבוט ולאפיון משפחת הגנים המקודדים לשלושה איזופורמים שונים של האנזים 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED). גנים אלו כונו

בהתאם *PaNCED1-2-3*. דגם הביטוי של גנים אלו נבדק בעלים בתגובה ליובש ובמהלך הבשלת פרי (14), נמצאה קורלציה ישירה בין עלייה בשעתוק גני *NCED* ועלייה ברמת ABA. למיטב ידיעתנו, דגם הביטוי של *PaNCED1-2-3* לא נלמד עד כה בפרי המתפתח, וניתן להניח כי קיימים הבדלים בביטוי גנים אלו בפרי גדול וקטן במהלך התפתחות הפרי. כמו כן, גנים נוספים המקודדים לאנזימים הפעילים בשלבים סופיים של סינטזת ABA כגון ABA-aldehyde oxidase ו-MoCo sulfurase לא זוהו עדין באבוקדו. אנזימים אלו עשויים לשחק תפקיד בבקרת סינטזת ABA במהלך התפתחות הפרי.

Lefw2.2 בקר שלילי של חלוקת תאים בפרי: גודל פרי הינה תכונה כמותית התלויה בביטויים של מספר גנים. בעגבנייה מופו מספר QTLs (Quantitative trait locus), אחד מהם, מופה בכרומוזום 2 ונקרא *fw2.2* (Fruit weight 2.2) (15). QTL זה אחראי לשונות של כ-30% בין גודל העגבנייה ה"גדולה" המתורבתת, לבין עגבניית זן-הבר בעלת פרי קטן (16,17). שיבוט *fw2.2* חשף כי QTL זה משפיע באמצעות גן יחיד (*Lefw2.2 (ORFX)*), המקודד לחלבון ממברנאלי, הפועל כבקר שלילי של חלוקת תאים בפרי (16-18). בתחילה שמשו שני קווים כמעט איזוגנים, בעלי אללים של פרי 'קטן' ו-'גדול' להבנת דפוס הביטוי של *Lefw2.2* במהלך התפתחות הפרי. תוצאות עבודה זו הראו כי בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרי, רמת השעתוק של *Lefw2.2* הייתה גבוהה באופן מובהק ברקמות הפרי של הקו הכמעט איזוגני בעל אלל 'פרי קטן' (Small fruit NIL) (16). בעבודה נוספת נמצא כי השונות ברמת הביטוי של ה-*Lefw2.2* mRNA בין הקווים אינה רק כמותית, אלא באה לידי ביטוי גם בתזמון שונה של ביטוי הגן. תזמון העלייה בביטוי *Lefw2.2* mRNA נמצא בקורלציה הפוכה עם הפעילות המיטוטית בפרי המתפתח (18). הגן *Lefw2.2* חולק הומולוגיה עם ESTs צמחיים נוספים המקודדים לכאורה לחלבונים בעלי תפקיד שאינו מוגדר, למיטב ידיעתנו לא דווח על EST מקביל באבוקדו.

2. מטרת המחקר: בשנים האחרונות חלה תנופת נטיעות גדולה של אבוקדו בארץ, ובשל דרישות השוק רוב הנטיעות הן של 'האס'. בעיית התפלגות גודל פרי בזן זה, הייתה ונותרה אחת הבעיות המרכזיות של הגידול. ניסיונות רבים שנערכו עד כה, וכללו יישום של הורמונים צמחיים שונים לא נתנו מענה יעיל לבעיה. כאמור, על פי ממצאי עבודות שנערכו בשנים האחרונות נראה כי יצירת/צבירת ABA, בשלבים מוקדמים של התפתחות פרי עשויים להשפיע על גודל הפרי ולהוביל לפנוטיפ פרי קטן בזן 'האס'. הצעת המחקר שהוגשה הציעה לעסוק בלימוד בסיסי של הגורמים המשפיעים על יצירת ABA ועל חלוקת תאים במהלך התפתחות הפרי. שלבי המחקר שהוצעו כללו: 1- שיבוט, אפיון ולימוד השעתוק והבקרה של גנים מאבוקדו המעורבים במסלול



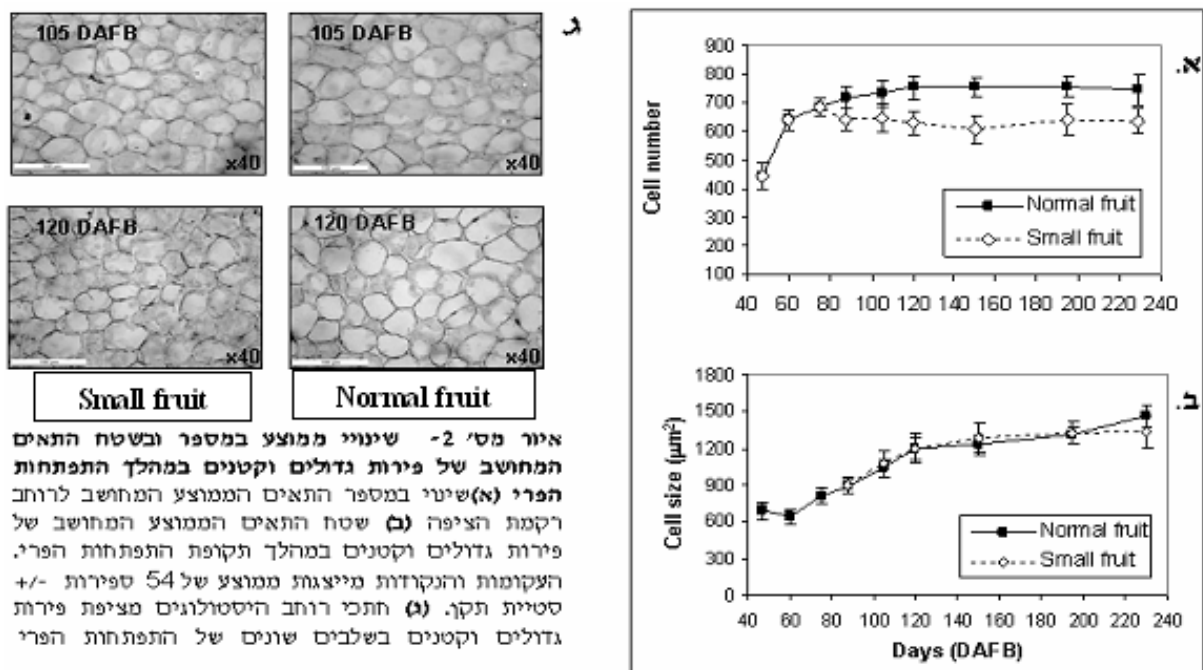
איור מס' 1 – שינויים בקוטר פירות גדולים וקטנים מהזן 'האס' במהלך עונת הגידול. העקומות מייצגות ממוצע של 36 פירות +/- סטיית תקן. החץ מתאר את נקודת הזמן בה בוצעה חלוקה לקבוצות דיגום של פירות גדולים ופירות קטנים.

הביוסינטזה של ABA במהלך התפתחות הפרי. 2- זיהוי ואפיון גנים ייחודיים המבוטאים בפירות הקטנים במהלך ההתפתחות. 3- שילוב טיפולי PGRs ובדיקת השפעתם על גודל הפרי ועל ביטוי הגנים הנ"ל.

3. פירוט עיקרי הניסויים שבוצעו ותוצאות:

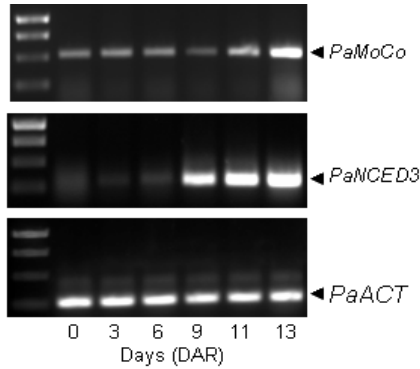
א. ביסוס המערכת המחקרית - כשלב ראשון בעבודתנו, ערכנו בדיקות לקביעת גודל ומספר התאים במהלך התפתחות הפרי. פירות גדולים וקטנים נגדמו במועדים שונים במהלך תקופת הגידול ממטע 'האס' הנטוע בקבוצת שילר. דגימות ראשונות נלקחו 47 ימים לאחר פריחה מלאה (DAFB), אולם, חלוקה לקבוצת דיגום של פירות

גדולים וקטנים התבצעה כ 90 יום לאחר מועד הפריחה, בשלב בו ניתן היה לזהות בברור הבדלים בין פירות גדולים וקטנים (ראה איור 1). הפירות הובאו למעבדה לצורך מדידות אורך, קוטר ומשקל רטוב. בנוסף, הוכנו מפירות גדולים וקטנים חתכי רוחב היסטולוגיים בשלבי התפתחות שונים. חתכים אלו, נסרקו במיקרוסקופ אור לצורך ספירת התאים ומדידת גודלם כמתואר בעבודות קודמות. במעקב אחר קינטיקת התפתחות הפרי ניתן היה לראות הבדלים מובהקים במדדי האורך והרוחב של הפירות הגדולים וקטנים, כמו כן נמצא שינוי מובהק במשקל הפירות הגדולים והקטנים במהלך התפתחות הפרי (לא מוצג). תוצאות חישוב גודל התאים הממוצע, בפרי גדול וקטן, במהלך התפתחות הפרי מוצגים באיור 2. כפי שניתן לראות, במהלך התפתחות הפרי, חלה בפירות הגדולים והקטנים גדילה במימדי התא, אולם, לא נצפו הבדלים מובקים בגודל התאים בין פירות גדולים וקטנים (איור 2ב' ו ג'). חישוב מספר התאים הממוצע, בקוטר ציפת הפרי, הראה כי בפירות קטנים, מספר התאים קטן באופן מובהק מאשר בפירות גדולים (איור 2א'). תוצאות המורות כי, כפי שדווח בעבר, הגורם המעכב את התפתחות הפרי הקטן אינו עיכוב בגידול התאים אלא עיכוב בתהליך חלוקתם.



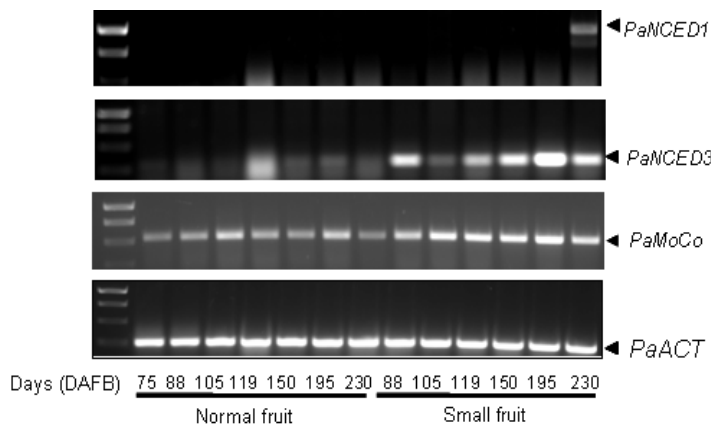
איור מס' 2- שינויי ממוצע במספר ובשטח התאים המחושב של פירות גדולים וקטנים במהלך התפתחות הפרי (א) שינוי במספר התאים הממוצע המחושב לרוחב רקמת הציפה (ב) שטח התאים הממוצע המחושב של פירות גדולים וקטנים במהלך תקופת התפתחות הפרי. העקומות והנקודות מייצגות ממוצע של 54 ספירות +/- סטיית תקן. (א) חתכי רוחב היסטולוגיים פציפת פירות גדולים וקטנים בשלבים שונים של התפתחות הפרי

ב. שיבוט ואפיון חלקי של הגן MoCo sulfurase מאבוקדו המקודד לאנזים הפעיל בשלב מאוחר של מסלול סינטזת ABA. האנזים Aldehyde oxidase (AO) המקטלו את השלב האחרון של סינטזת ABA, דורש לצורך פעילותו שינויים הכוללים הוספת שייר מוליבדן ושייר גופריתי. שינויים אלו, החלים לאחר התרגום ומאפשרים את הפעלת האנזים, מקוטלזים ע"י האנזים MoCo sulfurase. הגן המקודד ל-MoCo sulfurase זוהה ושובט עד כה בעגבנייה ובארבידופסיס, זיהויו של הגן התאפשר בעקבות מחקרים שנערכו בצמחים המוטנטים *flacca* בעגבנייה ו-*aba3* בארבידופסיס, בהם נמצא פגם בתהליך שפעול AO בשל מוטציות בגנים המקודדים לאנזים MoCo sulfurase. גנים אלו נקראים בהתאמה *FLACCA* ו-*ABA3* (19-20). באופן מעניין נמצא כי בארבידופסיס רמת הביטוי של *ABA3* עולה בעלים בתגובה ליובש ובתגובה לקור, ממצאים המרמזים כי לאנזים זה תפקיד בבקרת סינטזת ABA (20, 21). אחת ממטרות עבודה זו הייתה שיבוט הגנים מאבוקדו המקודדים לאנזימים הפעילים בשלבים האחרונים של מסלול סינטזת ABA, ואפיון ביטויים בפירות גדולים וקטנים במהלך התפתחות הפרי. בשלב ראשון בחרנו להתמקד בשיבוט ואפיון הגן המקודד ל-MoCo-Sulfurase. תחילה הושוו רצפי הגנים *FLACCA* ו-*ABA3* מבעגבנייה ומארבידופסיס ותוכנו זוגות פרימרים



איור מס' 3 – אפיון ביטוי הגנים *PaNCED3* ומקטע הגן המקודד לכאורה ל-*PaMoCo sulfurase* בציפת פרי לאחר קטיף: אנליזת sq-RT-PCR לאפיון ביטוי הגנים *PaNCED3* ומקטע הגן המקודד לכאורה ל-*PaMoCo sulfurase* ברקמת ציפת פרי של פרי לאחר קטיף. אקטיין שימש כביקורת פנימית

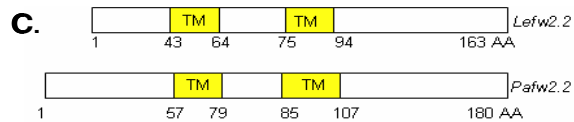
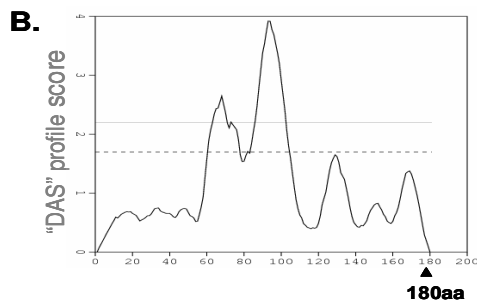
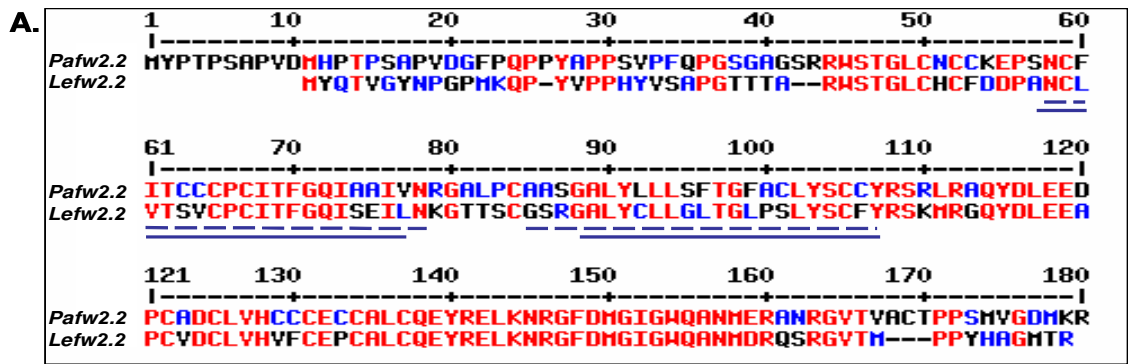
פנימית נבדק גם כן דגם הביטוי של ה- mRNA עבור *PaNCED3*. כפי שניתן לראות באיור 3 במהלך תהליך הבשלת הפרי הודגם ביטוי קונסטיטוטיבי של מקטע ה- mRNA המקודד לכאורה ל- *MoCo sulfurase*, אם כי עלייה מתונה בביטוי חלה לקראת סוף תהליך ההבשלה. במקביל, וכפי שדווח בעבודות קודמות (14), הודגמה עלייה חדה ברמת *PaNCED3* כתשעה ימים לאחר קטיף הפרי.



איור מס' 4 – אפיון ביטוי הגנים *PaNCED3*, *PaNCED1* ומקטע הגן המקודד לכאורה ל-*PaMoCo sulfurase* בציפת פרי גדולים וקטנים. אנליזת sq-RT-PCR לאפיון ביטוי הגנים *PaNCED3*, *PaNCED1* ומקטע הגן המקודד לכאורה ל-*PaMoCo sulfurase* בציפת פרי גדולים וקטנים.

התפתחות הפרי. כמו כן, בפירות קטנים עלה ביטוי הגן *PaNCED1* בציפת הפרי ברמה מסויימת לקראת סוף תקופת התפתחות הפרי. בדיקת דגם הביטוי של הגן המקודד לכאורה ל- *PaMoCo sulfurase* הראתה ביטוי כמעט קונסטיטוטיבי בפירות גדולים וקטנים במהלך התפתחות הפרי, אם כי, עלייה מתונה בביטוי תעתיק הגן נצפתה בשלב II של התפתחות הפרי. תוצאות דומות התקבלו כאשר בחנו את דגם הביטוי גנים אלו בקליפת זרע ובזרע של פירות גדולים וקטנים (לא מוצג).

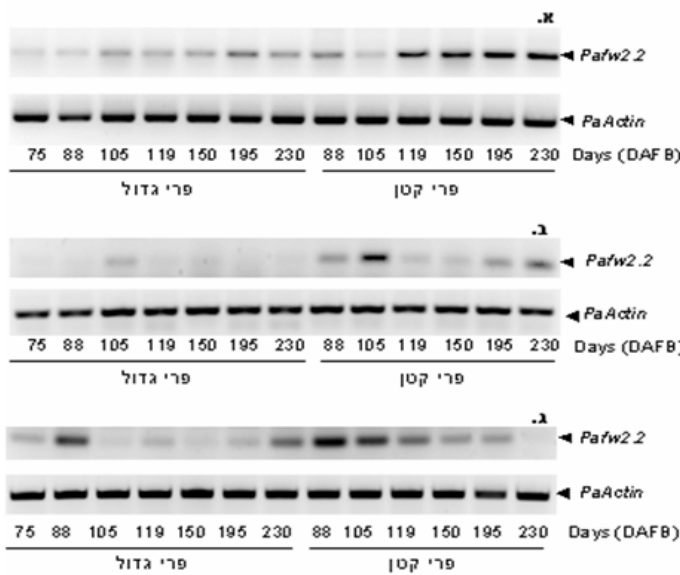
ד. בידוד גן ההומולוגי ל- *Lefw2.2* מאבוקדו 'האס' - אפיון דגם ביטוי הגן במהלך התפתחות הפרי בפירות גדולים וקטנים: *Lefw2.2* הינו גן המקודד לחלבון הפועל כבקר שלילי של חלוקת תאים בפרי העגבנייה (16-18). בהילקח בחשבון הידע הקיים בהקשר לפנוטיפ 'פרי קטן' באבוקדו 'האס', נראה סביר ואף מעורר להניח כי באבוקדו קיים גן ההומולוגי לגן זה המתבטא ביתר בפרי קטן ומעכב את חלוקת התאים בפרי. לפיכך, ניסינו לזהות ולאפיין גן ההומולוגי לגן *Lefw2.2* באבוקדו 'האס'. באמצעות שימוש בשיטת sq-RT-PCR אותר מקטע גן מאבוקדו (*Pafw2.2*) החולק ההומולוגיה גבוהה לגן *Lefw2.2*. רצף הגן המלא הושלם בשיטת 5'RACE



איור מס' 5 - (A) השוואת רצף הגן המתורגם *Lefw2.2* עם רצף הגן המתורגם *Pafw2.2* (B) חיזוי אזורים הידרופוביים, חוצי ממברנה ב *PaFw2.2*. (C) דיאגרמות סכמטיות המשוות בין מבנה *LeFW2.2* ו *PaFw2.2*

ו 3'RACE. הגן אשר בודדנו מקודד ל-180 חומצות אמיניות וחולק הומולוגיה של 62% ברמת החלבון עם *LeFW2.2* (ראה איור 5א), בהתאם גן זה כונה על ידינו *Pafw2.2*. שימוש בתוכנה לחיזוי אזורים חוצי

ממברנה בחלבון, מורה כי ב- *Pafw2.2* כמו ב- *Lefw2.2* קיימים שני אזורים (domains) הידרופוביים העשויים להוות אזורים טרנס-ממברנליים (איור 5ב). בדיקת דפוס ביטוי של הגן אשר בודד, בפירות גדולים וקטנים, הראתה כי במהלך התפתחות הפרי *Pafw2.2* מתבטא ביתר ברקמות פרי קטן (ציפה, קליפת זרע וזרע), זאת בהשוואה לאותן רקמות בפרי הגדול (איור 6). ממצאים אלו מרמזים כי *Pafw2.2* עשוי לקודד לחלבון הפועל באופן דומה ל- *LeFW2.2*, קרי, כבקר שלילי של חלוקת תאים בפרי. תפקידו של *Pafw2.2* בבקרת חלוקת תאים בפרי האבוקדו והקשר האפשרי בין שינויים ברמת ABA בפרי קטן ועלייה ברמת הביטוי של *Pafw2.2* נידונים בהמשך.

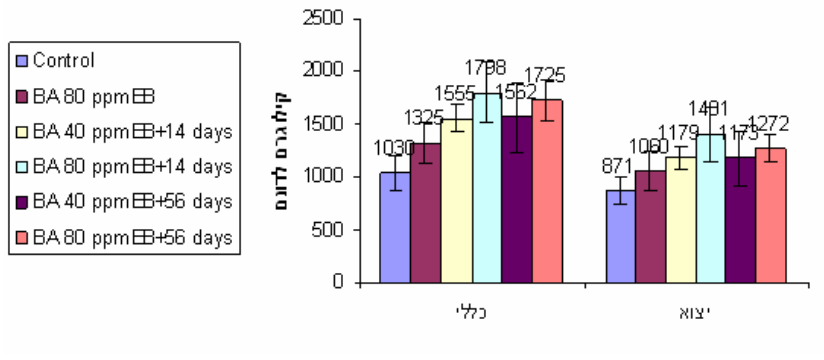


איור מס' 6 - אנליזת sq-RT-PCR לאפיון ביטוי הגן *Pafw2.2* במהלך תקופת התפתחות הפרי בפירות גדולים וקטנים. cDNA מרקמת הציפה (א), קליפת זרע (ב) וזרע (ג) שימש להגברת מקטע הגן *Pafw2.2* ע"י 42 מחזורי PCR ולהגברת מקטע הגן *PaActin*, על ידי 27 מחזורי PCR.

ה. ניסיונות שטח - ידוע כי יישום PGRs שונים עשוי להשפיע בצורה חיוביות על גודל הפרי באבוקדו, אם כי האפקטיביות של הטיפול משתנה ותלויה בגורמים כגון: עומס פרי בעץ, גורמים סביבתיים וגורמים בלתי ידועים. בעבודות קודמות שנערכו בזן 'האס' דווח כי גודל הפרי הושפע באופן ניכר לאחר מתן ציטוקינים סינטטיים כגון: 6-BA (6-benzyladenine), ו- CPPU (N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea), טיפולים

אלו העלו את גודל הפרי הממוצע והפחיתו את מספר הפירות שאינם מתאימים ליצוא. בהמשך, בעבודה זו נבחנה השפעת התכשיר בנוזיל אדנין BA (כתכשיר בונגרו) על היבול ועל כמות הפרי הגדול בזן 'האס'. הטיפולים שניתנו כללו יישום BA בסוף פריחה וב-14 ו-56 יום לאחר פריחה. בוצעו ניסיונות ביד חנה (רוכז ע"י ד'רליאו וינר) ובכברי (רוכזו ע"י ד'ר ג'ד איש-עם). תוצאות הטיפולים שבוצעו ביד חנה מוצגות באיור 7.

השפעת בנוזיל אדנין על היבול הכללי וליצוא - יד חנה 2008/9



איור 7. השפעת בנוזיל אדנין בשלבים ובריכוזים שונים על היבול הכללי והיבול ליצוא ביד חנה בעונת 2008/9. הטווחים מציינים שגיאת התקן של הממוצע

כפי שניתן לראות, יישום BA-14 יום ו-56 יום לאחר סוף פריחה הן בריכוז 40 ח"מ והן בריכוז 80 ח"מ הגבירו את היבול הכללי באופן מובהק.

*תוצאות הניסוי המקביל בכברי אינן מוצגות מכיוון שלא ניתן היה להסיק מסקנות מהניסוי עקב בעיות טכניות (20% מהיבול נקטף בקטיף מוקדם ולכן המיון לא היה אמין).

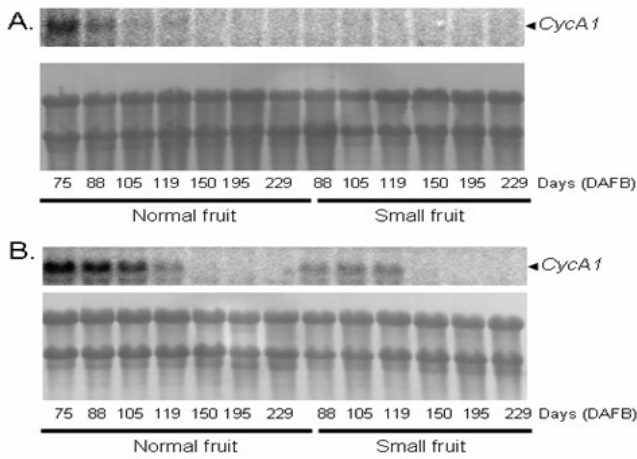
4. דיון והצעות להמשך: מופע פרי קטן בזן 'האס' הינה תופעה כללית הבאה לידי ביטוי בכל אזורי הגידול של הזן. בעייה חקלאית זו מחריפה ביתר שאת בשנות שפע בהשוואה לשנות שפל, כאשר אחוז גבוה יותר של פירות קטנים לעץ מתקבל בשנת שפע (פרופ' קרול לווט- דיווח אישי). פנוטיפ 'פרי קטן' עשוי להתקבל כתוצאה ממספר גורמים הכוללים: עיכוב בתהליך גדילת התאים, עיכוב בתהליך חלוקת התאים או שילוב שני גורמים אלו. בדיקת גודל התאים ומספר התאים בפירות גדולים וקטנים, שנערכה בעבודה זו, מורה כי מופע פרי קטן באבוקדו 'האס' הינו תולדה של עיכוב בתהליך חלוקת התאים ולא בגדילתם, לפיכך, תוצאותינו מאששות ממצאים מעבודות קודמות שפורסמו בנושא. בהמשך, ניתן לשאול מהם הגורמים המבקרים באופן שלילי את תהליך חלוקת התאים בפרי קטן? האם קיים קשר בין שינוי ברמת ABA ועיכוב בתהליך חלוקת התאים בפרי? וכמו כן האם קיים פקטור המבקר באופן כללי את מהלך חלוקת התאים בפרי? בכדי לנסות ולענות על שאלות אלו בחרנו להתמקד תחילה בבחינת דגם הביטוי של גנים המקודדים לאנזימים הפועלים בשלבים שונים של מסלול סינתזת ABA במהלך התפתחות הפרי ובמקביל בזיהוי ואפיון גן הומולוגי לגן *Lefw2.2* באבוקדו 'האס' ובבחינת דגם ביטוי בפירות גדולים וקטנים.

א. בקרת מסלול ביוסינתזת ABA באבוקדו: עבודות קודמות שנערכו באבוקדו הראו כי בקרת ביוסינתזת ABA בעקבות עקת יובש בעלים, ובציפת פרי במהלך תהליך הבשלתו, תלויה בעיקר בשעתוקם של הגנים המקודדים לאיזופורמים שונים של MoCo sulfurase. NCED. ABA אינו אנזים המשחק תפקיד מפתח בסינתזת ABA. אנזים זה, פועל כזרז המאפשר הוספת שייר גופרית לחלבונים המכילים קו-פאקטור MoCo. מודיפקציה זו, מאפשרת בין היתר, את הפעלת האנזים ABA-AO המקטלו את השלב האחרון של סינתזת ABA. הגן *ABA3*, המקודד לאנזים MoCo sulfurase בארבידופסיס, מתבטא באופן קונסטיטוטבי, ברמה נמוכה, בחלקי הצמח השונים, אולם רמתו עולה ברקמות השונות כתוצאה מעקת יובש, ועקת מלח, ממצא המרמז על תפקידו הבקרתי של גן זה במסלול סינתזת ABA (20,21). בהתבסס על המידע הקיים בספרות, ניתן היה להניח כי גן הומולוגי לגן המקודד ל- MoCo sulfurase, קיים באבוקדו ועשוי לשחק תפקיד בבקרת

סינתזת ABA . בעבודה שערכנו שיבטנו מקטע גן מאבוקדו זה ואפינו את דגם ביטוי במהלך הבשלת פרי. התוצאות שבידינו הינן פרלימינריות אולם הן מורות כי ככל הנראה לגן זה תפקיד בקרתי משני בבקרת יצור ABA במהלך הבשלת פרי. בעתיד בכדי להמשיך ולאפיין את פעילות *PaMoCo sulfurase* יהיה צורך לסיים את ריצופו ולבדוק האם עלייה ברמתו מתרחשת במקביל לעלייה בפעילות ABA-AO, זאת לדוגמא ע"י שימוש בגילים הבדוקים פעילות ABA-AO .

ב. בקרת מסלול ביוסינטזת ABA במהלך התפתחות הפרי: כאמור, בעבודות קודמות דווח כי במהלך התפתחות הפרי, חלה עלייה חדה ברמת ABA ברקמת הציפה והזרע של פירות קטנים (9-2) מעקב אחר דגם הביטוי של הגנים המקודדים ל- *PaNCED1*, *PaNCED3* ולגן המקודד לכאורה ל- *PaMoCo sulfurase* שערכנו הראה כי בציפה, בקליפת הזרע ובזרע של פירות קטנים חלה עלייה חדה ברמת ה- mRNA עבור *PaNCED3*, עלייה אשר החלה עם מופע פנוטיפ הפרי הקטן (88 ימים לאחר פריחה מלאה), ושיאה נצפה בשלבים מאוחרים של התפתחות הפרי. בנוסף, הודגמה ברקמות הפירות הקטנים עלייה מסוימת בביטוי הגן *PaNCED1* לקראת סוף תקופת התפתחות הפרי בעוד דגם הביטוי של הגן המקודד לכאורה ל- *PaMoCo sulfurase* הראה ביטוי כמעט קונסטיטוטיבי. האנליזות שביצענו לא לוו בבדיקות מקבילות למדידת רמת ה- ABA, בדיקות אשר מטבע הדברים נדרשות ויבוצעו בהמשך, אולם, מנתונים אלו ניתן להסיק כי העלייה ברמת ABA בפירות הקטנים אשר עליה דווח בעבר, מקורה מסינתזה *de novo* של ABA ברקמות השונות של הפרי, עלייה זו מבוקרת ברמת השעתוק ותלויה בעיקר בשעתוקו של הגן המקודד לאיזופורם- *NCED3*. ידוע כי ל ABA, השפעה שלילית על מחזור חלוקת התאים (23). כך לדוגמה, בעבודות שנערכו בצמחי מודל דווח על קורלציה בין עלייה ברמת ABA ועלייה בביטוי גנים המקודדים לחלבונים המעכבים פעילות ציקלינים ICKs (Inhibitors of CDKs) (24-25), ייתכן כי מנגנון דומה מופעל בפירות קטנים לאחר ייצור ABA. בכדי לבדוק אופציה זו יש להתמקד בעתיד בשיבוט ואיפיון גנים הומולוגים ל ICKs באבוקדו. כמו כן, יש לציין כי על פי התוצאות שקיבלנו העלייה המקסימלית בשעתוק *NCED3* מתרחשת בשלבים מאוחרים של התפתחות פרי (150-230 יום לאחר פריחה מלאה), בשלבים בהן חלוקת התאים הינה מתונה (ראה איור 2) ממצאים אלו מעלים את האפשרות כי עלייה ברמת ABA בפירות קטנים אינה הגורם העיקרי התורם לעיכוב בחלוקת התאים, וכי מופעלים מנגנונים נוספים המעכבים את תהליך חלוקת התאים.

ג. אפיון מקטע גן ההומולוגי ל- *Lefw2.2* באבוקדו 'האס' - ביטוי הגן במהלך התפתחות הפרי ומעורבותו האפשרית בעיכוב תהליך חלוקת תאים בפרי. - בעבודות שנערכו בעגבנייה, זוהה הגן *Lefw2.2 (ORFX)* כגן האחראי על כ- 30% מהשונות בין העגבנייה ה"גדולה" מתורבתת, לבין עגבניית זן- הבר קטנת המימדים (16). הגן *Lefw2.2* מקודד לחלבון הפועל כבקר שלילי של חלוקת התא בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרי (16-18). בעבודה שערכנו שיבטנו גן מאבוקדו (*Pafw2.2*) החולק הומולוגיה לגן *Lefw2.2*. אפיון דגם ביטוי הגן הראה כי *Pafw2.2* מתבטא ביתר בשלב II של התפתחות הפרי, ברקמות של פירות קטנים, זאת בהשוואה לאותן רקמות בפירות גדולים. תוצאות אלו עשויות להעיד כי *Pafw2.2* פועל בדומה ל- *Lefw2.2*, קרי, כגן המקודד לחלבון הפועל כבקר שלילי של חלוקת תאים בפרי. בכדי לחזק טענה זו יהיה צורך להוכיח בהמשך כי העלייה ברמת ביטוי של *Pafw2.2* נמצאת בקורלציה הפוכה עם הפעילות המיטוטית בפרי. דרך אפשרית לבדיקת קשר זה הינה ע"י בדיקת הפרופיל ההתפתחותי של גנים המבקרים את מהלך חלוקת התאים בפרי והשוואתו לפרופיל הביטוי של *Pafw2.2*. בכדי להשיג מטרה זו אנו מתמקדים כעת בשיבוט ואיפיון דגם



איור מס' 8 – אנליזת Northern לאיפיון ביטוי הגן *CycA1* במהלך התפתחות הפרי. ציפת פרי (A) זרע (B) של פירות גדולים וקטנים

המבקר/ים את העלייה בביטוי *Pafw2.2* בפרי הקטן ולבדוק האם קיים קשר בין בקרת שעתוק *Pafw2.2* ובין שינויים במאזן ההורמונלי או במאזן הקרבוהידרטס. אחת ההיפותזות בנוגע לאופן פעילותו של *LeFW2.2* טוענת כי תפקידו של *LeFW2.2* הינו להתאים את פעילות מחזור התא בפרי לתנאי הצמח הקיימים וכי אספקת קרבוהידרטס לפרי המתפתח עשויה, בתיווכו של *LeFW2.2*, לבקר את פעילות מחזור התא (26). טענה זו, נתמכת בתוצאות מחקר השוואתי שנערך בצמחי עגבנייה מתורבתת שגודלו תחת משטרים שונים של עומס פרי. נמצא כי הפחתת עומס הפרי גרמה לעלייה בגודל הפרי, לוותה בעלייה במספר התאים, בעלייה בביטוי גנים המבקרים את מחזור התא ובירידה ברמת הביטוי של *Lefw2.2* (26). באבוקדו פירות קטנים מתאפיינים בעלייה ביצירת ABA, בירידה ברמת הסוכרוז ועלייה ברמת הגלוקוז מתוך כלל הסוכרים (9), לפיכך, ניתן לשער כי ביטוי *Pafw2.2* עשוי להיות מבוקר ע"י שינויים במאזן הסוכרים ו/או ההורמונים, אחת הדרכים להמשך המחקר הינה אנליזה של אזור הפרומוטור של *Pafw2.2*.

ד. בחינת השפעת ציטוקינין (בנזיל אנדנין-כתכשיר בונגרו) על היבול וכמות הפרי הגדול בזן 'האס'. בעבר דווח כי טיפולי BA בסוף פריחה השפיעו באופן חיובי על גודל הפרי בזן 'האס'. בעבודה זו נבחנה השפעת BA במועדים ובריכוזים שונים. הרציונאל שעליו התבססנו במתן טיפול מאוחר (56 יום לאחר סוף פריחה) מבוסס על הממצא כי חלוקת תאים מסיבית בפרי נמשכת עד כ-120 יום לאחר פריחה מלאה, לכן, טיפול בציטוקינין בנקודת זמן זו, שעד כה לא נוסתה בניסויים קודמים, עשוי להשפיע באופן חיובי על גודל הפרי. תוצאות הניסוי ביד חנה אמנם מדגימות כי המגמה להעלאת היבול של פרי גדול בולטת 14 יום לאחר סוף פריחה (בהתאמה לתוצאות שקיבל ליאו וינר בעבר בניסוי שנערך בנחשולים ובלהבות חביבה) וגם 56 ימים לאחר סוף פריחה. ניסוי במתקונת דומה יבוצע בשנה הבאה ביד חנה ובנגבה, כמו כן תישקל האפשרות של מתן טיפול כפול : 14 + 56 יום לאחר פריחה מלאה. הניסוי ביד חנה ילווה בדיגום פירות גדולים וקטנים ובבדיקת דגם ביטויים של *Pafw2.2*, *PaNCED3* וגנים ממשפחת הציטוקלינים המבקרים את מחזור התא, במהלך תקופת התפתחות הפרי במטרה לבדוק את השפעת הטיפולים על מהלך חלוקת התאים בפרי.

הביטוי של גנים השייכים למשפחת הציטוקלינים ברקמות פירות גדולים וקטנים במהלך התפתחות הפרי. תוצאות פרלימינריות הבודקות את דגם הביטוי של הגן *CycA1*, המקודד לחלבון המבקר את המעבר של *G2/M* במהלך מחזור התא, מוצגות באיור 8. תוצאותינו מורות כי ביטוי הגן יורד במהלך התפתחות הפרי בזרע ובציפה וכי ברקמת פירות קטנים ביטוי הגן נמוך בהשוואה לפירות גדולים. מכאן, ניתן להסיק כי הפעילות מיטוטית בפירות קטנים קטנה מאשר בפירות גדולים ונמצאת בקורלציה הפוכה עם ביטוי *Pafw2.2*. בהמשך, אנו מנסים לאפיין את הגורמים