

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

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

מוגש לקרן המדע הראשי במשרד החקלאות ולהנהלת מועצת הצמחים – ענף פירות

ע"י

ורד יריחמוביץ : המחלקה למטעים מינהל המחקר החקלאי בית דגן

ליאו וינר : שה"ם

גד איש עם : מ"ופ גליל מערבי – מ"ופ צפון

ירדנה דהן : המחלקה למטעים מינהל המחקר החקלאי בית דגן

משה גורן : המחלקה למטעים מינהל המחקר החקלאי בית דגן

Vered Irihimovitch. : Horticulture Department. The Institute of Plant Sciences –ARO
Bet Dagan 50250 E-mail: veredi@agri.gov.il

Leo Viner : E-mail: Extension service, Israel, Ministry of Agriculture, leowin@shaham.moag.gov.il

Gad Ish-Am: E-mail: Agricultural R&D Western Galilee, Agricultural experimental farm, D.N Oshrat
ishamgad@macam.ac.il25212 , Israel

Yardena Dahan. : Horticulture Department. The Institute of Plant Sciences –ARO Bet Dagan 50250
yardenad@agri.gov.il E-mail:

Moshe Goren: Horticulture Department. The Institute of Plant Sciences –ARO
Bet Dagan 50250 E-mail: goren@agri.gov.il

אפריל 2010

סיוון תש"ע

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים כן/לא

חתימת החוקר :

רשימת פרסומים: ראה פירוט בסיכום עם שאלות מנחות.

אחת הבעיות העיקריות בזן האבוקדו 'האס' הינה בעיית גודל פרי. אחוז גבוה מכלל הפירות הינם בעלי משקל סופי נמוך. מחקר אנטומי השוואתי שנערך בזן 'האס' הראה כי הגורם המגביל את התפתחות הפירות הקטנים אינו גידול התאים אלא עיכוב בתהליך חלוקתם. נמצא כי בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרי, פירות קטנים מתאפיינים ברמות סוכרוז ואוקסין (IAA) נמוכות וברמת חומצה אבסיסית (ABA) גבוהה, בהשוואה לפירות גדולים ולכן נטען כי שינויים אלו עשויים להשפיע על מערך חלוקת התאים ועל גודל הפרי. גודלו הסופי של פרי תלוי בין היתר בבקרת מנגנון מחזור התא וביטויים של גנים הקשורים למערך חלוקת התאים, מושפע משינויים במאזן הסוכרים וההורמונים בפרי. לפיכך, מחקר זה הציע: 1- שיבוט, אפיון ולימוד השעתוק של גנים מאבוקדו המעורבים במסלול הביוסנטזה של ABA במהלך התפתחות הפרי. 2- זיהוי ואפיון גנים הקשורים למערך חלוקת התאים ואיפיון במהלך ההתפתחות הפרי. 3- שילוב טיפולי PGRs ובדיקת השפעתם על גודל הפרי ועל ביטוי הגנים הנ"ל. שלב 1 של המחקר המוצע, בוצע בשנת המחקר הראשונה (ראה דו"ח 2009). בהמשך, בעבודה שערכנו בשנה זו התמקדנו בשלבי המחקר 2 ו-3. במסגרת זו שיבטנו מאבוקדו באופן מלא שני גנים: *PaCYCA1* ו-*PaCYCB1* המקודדים לחלבוני ציקלין A1 ו-B1 ומבקרים את המעבר $M \leftarrow 2G \leftarrow S$ במהלך חלוקת תאים וגן שלישי *PaPCNA*, המקודד לחלבון PCNA, המשתתף בשכפול ה-DNA ומשמש כסמן לחלוקת תאים. אנליזת Northern שערכנו הראתה, כי בהתאם לצפי, ביטוי גנים אלו היה גבוה במיוחד ברקמות של חנטים, עלים ושורשים צעירים, בהם חלה פעילות מיטוטית גבוהה. כמו כן הראנו כי במהלך התפתחות פירות גדולים חלה ירידה הדרגתית בביטוי גנים אלו, במקביל לירידה בפעילות חלוקת תאים. מאידך, ברקמת פירות 'האס' קטנים, ביטויים של גנים אלו היה נמוך מלכתחילה ובהתאם גם נצפתה עצירה מוקדמת של חלוקת תאים בפרי. במקביל, וכפי שדווח בדו"ח הקודם איתרנו גן נוסף מאבוקדו *like*, *Pafw2.2* החולק הומולוגיה גבוהה לגן *fw2.2* מעגבנייה, המשמש כבקר שלילי של חלוקת תאים בפרי. אנליזות חוזרות שערכנו בשנה זו אששו את ממצאנו הקודמים והראו כי במהלך התפתחות הפרי *Pafw2.2-like* מתבטא ביתר ברקמות פרי קטן, בהשוואה לרקמות פרי גדול, ממצא המרמז כי *Pafw2.2-like* עשוי לקודד לחלבון הפועל באופן דומה ל- *FW2.2* מעגבנייה ולבקר, בהתאם, באופן שלילי את חלוקת התאים בפרי האבוקדו. אופן בקרתם של ארבעת הגנים ששיבטנו אינו ידוע ואנו משערים כי קיים קשר בין שינויים במאזן הסוכרים ומאזן ההורמונלי בפרי ובין ביטוי גנים אלו. במקביל, בניסיונות שדה, שנערכו בשנה זו, בוצע ניסוי חוזר של יישום ציטוקינין (בפורמולציות של "בנזיל אדנין" ושל "גולית") לצורך הגדלת פרי. תוצאות הניסוי הראו כי בניגוד לשנה הקודמת, לא התקבלה עלייה ביבול הכללי בעקבות הטיפול. מאידך, לטיפולים הורמונליים אשר כללו טריפטפאן (חומצה אמינית המהווה פרקוסור של אוקסין) הייתה השפעה חיובית שהובילה לעלייה במספר הפירות לעץ (ללא עליה בגודל הפירות), וכתוצאה מכך לעלייה ביבול הכללי לעומת הביקורת. אנו סבורים כי המשך שילוב מחקר בסיסי המתמקד בהבנת הבסיס המולקולרי של בעיית גודל פרי ומחקר יישומי המתמקד בבדיקת השפעת טיפולים הורמונליים על גודל פרי עשויים להגדיל את הסיכויים למציאת פרוטוקולים שיאפשרו התמודדות יעילה עם בעיית חקלאית זו.

1. מבוא: בעיית פרי קטן בזן 'האס': הזן 'האס' (*Persea americana cv 'Hass'*) מהווה מרכיב חשוב בין זני האבוקדו בארץ. הבעיה העיקרית בזן זה הינה בעיית גודל הפרי: אחוז גבוה מכלל הפירות לעץ (כ 40%-60%) הינם בעלי משקל סופי נמוך. הבדלי הגודל בין פירות גדולים וקטנים ניתנים לזיהוי בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרי. ידוע כי התפתחות וגידול פרי תלויים בקצב חלוקת התאים ובגידולם. ברוב מיני הפירות חלוקת התאים 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 מטבוליים בפירות קטנים, אשר עשויים להשפיע על מערך חלוקת התאים (ראה 9-2). נמצא כי פירות קטנים מתאפיינים ברמת סוכרוז נמוכה, בהשוואה לפירות גדולים. כמו כן דווח כי בזרעי פירות קטנים חלה עלייה בייצור/צבירת ABA וירידה בייצור/צבירת IAA. אוקסין ידוע כהורמון צמחי המעודד התרחבות וחלוקת תאים, ואילו ABA ידוע כהורמון המעכב חלוקת תאים, לכן נטען כי במקביל לעלייה ברמת ABA, חוסר היכולת ליצור/לצבור IAA, מהווה גורם מכריע המשפיע על גודל הפרי הסופי. למרות הידע הקיים אודות השינויים במאזן ההורמונלי החלים במהלך התפתחות הפרי, המידע אודות הסיגנלים המולקולאריים הקושרים בין פעילות מחזור התא בפרי האבוקדו ובין השינויים הורמונאליים בפרי הינו מועט. **מחזור חלוקת התא ובקרתו בתאי הצמח:** המנגנון הבסיסי המבקר את תהליך חלוקת התאים הינו מנגנון שמור אבולוציוני בכל היצורים האאוקריוטים. הפעילות הבסיסית של מחזור התא תלויה ביצירת קומפלקסים חלבוניים בין חלבונים הנקראים ציקלינים (Cyclins) ו-CDKs (Cyclin-dependent protein kinases) אשר אחראיים לזרחון סובסטרטים ספציפיים ובכך מאפשרים את התקדמות מחזור חלוקת התא. נקודות הביקורת העיקריות במהלך חלוקת התא הן המעבר מ-G1 ל-S וכן מ-G2 ל-M. בצמחים פועלים מספר סוגים של חלבוני ציקלינים. ככלל, משפחת חלבוני CYCA חשובה למעבר משלב S ל-M, משפחת חלבוני CYCB מבקרת את המעבר משלב G2 לשלב M ומשפחת חלבוני CycD, מבקרת את המעבר משלב G1 לשלב S (10,11). שעתוקם של הגנים המבקרים את מחזור התא (Cell-proliferating-related-genes) משתנה בהתאם לשלבי התפתחות הפרי וקשור לשינויים במאזן חומרי הצמיחה והסוכרים. כך לדוגמה בעגבנייה, פרופיל הביטוי של משפחת גנים המקודדים לחלבוני CDKs, ושל גנים המקודדים לחלבוני ציקלין שונים עולה באופן חד בתחילת הפריחה ולאחר חנטת הפרי ויורד באופן משמעותי במהלך התפתחות הפרי (12). באבוקדו לא זוהו עדין באופן מלא גנים הפעילים במהלך מחזור התא ולא אופייין אופן ביטויים במהלך התפתחות הפרי. יש לציין כי בקרת מחזור התא הצמחי מושפעת משינויים במאזן הסוכרים ובמאזן ההורמונאלי. לדוגמה, במחקר שנעשה בארבידופסיס, דווח כי מתן חיצוני של CK בנוסף לסוכרוז הביא לעלייה ברמת השעתוק של *CycD3*, ולעלייה בפעילות המיטוטית (13). מאידך, הורמונים כגון ABA וחומצה ג'סמונית, מבקרים באופן שלילי את תהליך חלוקת התאים (14). כך לדוגמה דווח כי הוספת הורמונים אלו לתאי תרבית של צמחי טבק (BY-2 cells) מנעה את מהלך שכפול ה-DNA.

FW2.2 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 "הגדולה" המתורבתת, לבין עגבניית זן-הבר בעלת פרי קטן. שיבוט *fw2.2* חשף כי QTL זה משפיע באמצעות גן יחיד (*fw2.2 (ORFX)*), המקודד לחלבון ממברנאלי, הפועל כבקר שלילי של חלוקת תאים בפרי (15, 16). בתחילה שמשו שני קווים כמעט איזוגנים, בעלי אללים של פרי 'קטן' ו- 'גדול' להבנת דפוס הביטוי של *fw2.2* במהלך התפתחות הפרי. תוצאות עבודה זו הראו כי בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרי, רמת השעתוק של *fw2.2* הייתה גבוהה באופן מובהק ברקמות הפרי של הקו הכמעט איזוגני בעל אלל 'פרי קטן' (Small fruit NIL) (15). בעבודה נוספת נמצא כי השונות ברמת הביטוי של ה-mRNA עבור *fw2.2* בין הקווים אינה

רק כמותית, אלא באה לידי ביטוי גם בתזמון שונה של ביטוי הגן. תזמון העלייה בביטוי ה mRNA של *fw2.2* נמצא בקורלציה הפוכה עם הפעילות המיטוטית בפרי המתפתח (17). הגן *fw2.2* חולק הומולוגיה עם ESTs צמחיים נוספים המקודדים לכאורה לחלבונים בעלי תפקיד שאינו מוגדר, למיטב ידיעתנו לא דווח על EST מקביל באבוקדו.

2. מטרות המחקר: בעיית התפלגות גודל פרי בזן 'האסי' הינה אחת הבעיות המרכזיות של גידול זה. 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 שינויים במאזן ההורמונלי ביניהם עלייה ביצירת/ צבירת ABA, בשלבים מוקדמים של התפתחות פרי עשויים להשפיע על גודל הפרי ולהוביל לפנוטיפ פרי קטן בזן 'האסי'. בהצעת המחקר שהוגשה הצענו לעסוק בלימוד בסיסי של הגורמים המשפיעים על יצירת ABA ועל חלוקת תאים במהלך התפתחות הפרי. שלבי המחקר שהוצעו כללו: 1- אפיון ולימוד השעתוק והבקרה של גנים מאבוקדו המעורבים במסלול הביוסינטזה של ABA במהלך התפתחות הפרי. שלב זה בוצע בשנת המחקר הראשונה (ראה דו"ח 2009 אפריל). 2- זיהוי ואפיון גנים הקשורים למערך חלוקת התאים המבוטאים בפירות הקטנים במהלך ההתפתחות. 3- שילוב טיפולי PGRs ובדיקת השפעתם על גודל הפרי ועל ביטוי הגנים הנ"ל. מטרות 2, 3 הוגדו כמטרות יעד לשנה זו.

3. פירוט עיקרי הניסויים שבוצעו ותוצאות: חלק I – מחקר בסיסי

א. ביסוס מערכת המחקר - פירות גדולים וקטנים נדגמו במועדים שונים במהלך תקופת הגידול ממטע 'האסי' הנטוע בקבוצת שילר. דגימות ראשונות נלקחו 47 ימים לאחר פריחה מלאה (DAFB), אולם, חלוקה לקבוצת דיגום של פירות גדולים וקטנים בוצעה כ 90 יום לאחר מועד הפריחה, בשלב שבו 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 לצורך ספירת התאים וקביעת שטחם. מעקב אחר קינטיקת התפתחות הפרי הראה הבדלים מובהקים במדדי הרוחב (איור 1), האורך והמשקל (לא מוצג) בין הפירות הגדולים והקטנים.

תוצאות חישוב שטח ומספר התאים הממוצע, ברקמת הציפה (בוצעו בשנת המחקר הראשונה) והזרע (בוצעו בשנה זו) של פירות גדולים וקטנים, במהלך התפתחות הפרי מוצגים באיור 2. כפי שניתן לראות, במהלך התפתחות הפרי חלה ברקמת הפירות הגדולים והקטנים גדילה במימדי שטח התאים, שבמהלכה לא נצפו הבדלים מובקים בגודל התאים בין פירות גדולים וקטנים. מאידך, מספר התאים הממוצע, לרוחב ציפת הפרי והזרע היה קטן באופן מובהק בפירות קטנים לעומת בפירות גדולים.

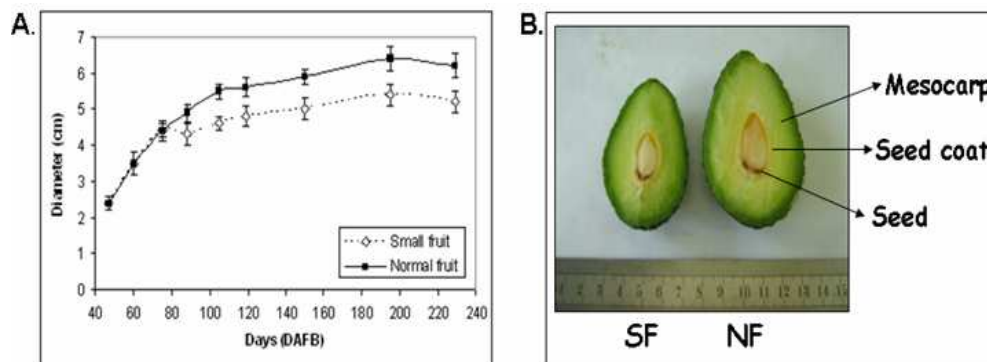


Fig 1. A. Increase in normal fruit (NF) and small fruit (SF) width. Arrow indicates visible appearance of SF phenotype. Fruit collections were recorded as days after full bloom (DAFB). Values are means \pm SE of 12 detached fruits. B. NF and SF avocado fruits (105 DAFB).

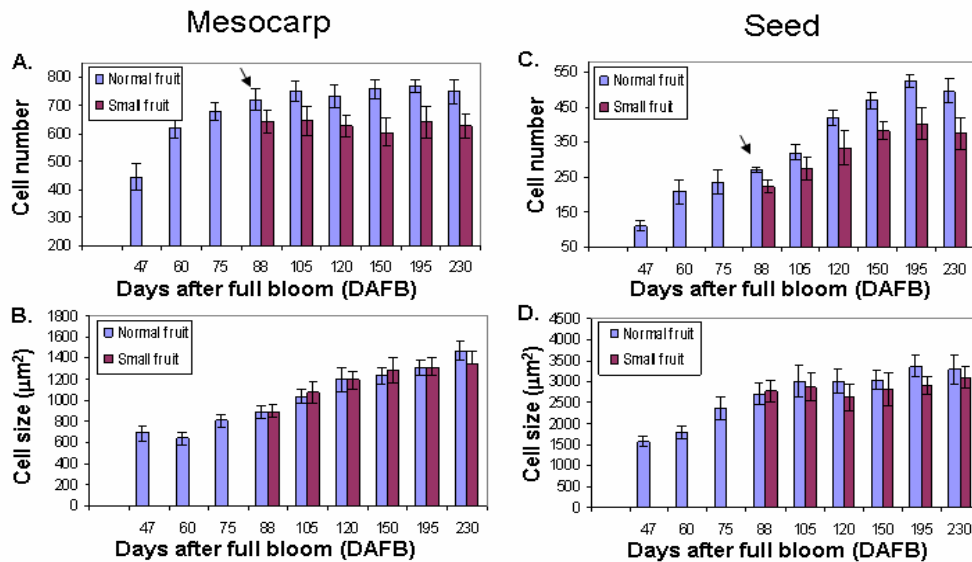


Fig. 2. Changes in calculated mean mesocarp cell number (A) and cell size (B) during normal fruit (NF) and small fruit (SF) development. Changes in calculated mean seed cell number (C) and cell size (D) during NF and SF development. Values are means \pm SE of 54 samples.

ג. שיבוט גנים מאבוקדו המקודדים לחלבוני ציקלין A1 ו-B1 וחלבון PCNA (Proliferating-cell-nuclear-antigen)

ואיפיון דגם ביטויים ברקמות צמחיות וברקמות פרי ובמהלך התפתחות פירות גדולים וקטנים.

בעזרת אנליזת BLAST שנערכה כנגד מאגר רצפי ESTs מאבוקדו נמצאו מספר ESTs המקודדים לכאורה לקטעי חלבונים דמויי ציקלין A ו-B וחלבון PCNA. שימוש בשיטת RT-PCR הוביל לאימות הרישום של רצפים אלו ולאחר מכן רצפי הגנים המלאים הושלמו בשיטת 5'RACE ו-3'RACE. אנליזה שערכנו לרצפי החלבונים המקודדים ע"י הגנים ששובטו הראתה הומולגיה גבוהה לחלבוני ציקלין A1, ציקלין B1 וחלבון PCNA. אנליזות פילוגנטיות שערכנו אימתו גם הן את זהות הגנים (לא מוצג). בהתאמה, כונו גנים אלו: *PaCYCA1*, *PaCYCB1* ו-*PaPCNA* ונרשמו במאגר הגנים (GeneBank) תחת מספרי גישה: GU27023, GU27024 ו-GU27022. אנליזת Northern שנערכה הראתה כי, בהתאם לצפי, ביטוי גנים אלו היה גבוה במיוחד ברקמות צמחיות של עלים ושורשים צעירים, זאת בהשוואה לרקמות צמחיות בוגרות. כמו כן ביטוי גנים אלו נצפה ברקמות שונות של חנטים צעירים, כאשר רמת הביטוי גבוהה ביותר נצפתה

ברקמת הזרע (איור 3).

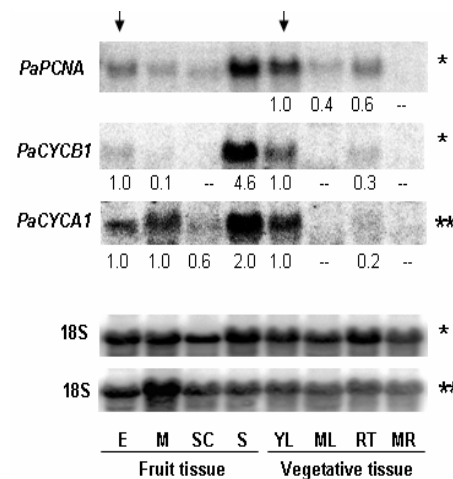
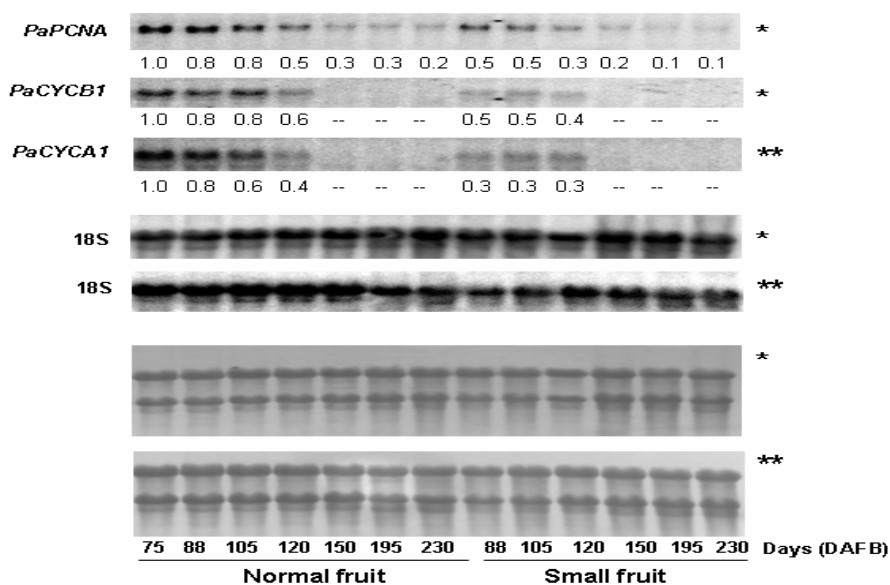


Fig. 3. Accumulation of *PaPCNA*, *PaCYCA1* and *PaCYCB1* mRNAs in various young fruit tissues collected 60 days after full bloom (E; exocarp, M; mesocarp, SC; seed coat, S; seed) and in vegetative tissues (YL; young leaf, ML; mature leaf, RT; root tips, MR; mature roots). RNA isolated from the indicated samples were separated by electrophoresis, blotted onto a membrane and initially hybridized with the probes shown on the right. The signals corresponding to the mRNAs were normalized to 18S rRNA levels, and the initial times were set to 1.0 (marked by arrows). The number beneath each lane shows the ratio of mRNA accumulation for each track. Two filters were used, and the 18S rRNA re-probing of each sample is shown. The identity of each filter is denoted by the one or two asterisks to the right of the blots

יש לציין כי לא נצפתה הצטברות mRNA של *PaCYCB1* ברקמות הציפה, קליפת הזרע והאקסוקרפ של חנטים צעירים, ממצא המעיד כי ככל הנראה קיים איזופורם נוסף של *CYCB1* הפועל באופן ספציפי ברקמות אלו.

בנוסף וכפי המוצג באיור 4, נמצא כי במהלך התפתחות הפרי חלה ירידה הדרגתית בביטוי גנים אלו, בזרעי פירות גדולים, במקביל לירידה בפעילות חלוקת התאים. לעומת זאת, ברקמות הזרע של פירות קטנים, ביטויים של גנים אלו היה נמוך

מלכתחילה. תוצאות דומות הושגו כאשר נערכה אנליזה בציפת הפרי (לא מוצג). ממצאים אלו עומדים בקנה אחד עם



תוצאות ספירת התאים (איור 2) ומורים כי הן ברקמת הזרע והן ברקמת הציפה של פירות קטנים חלה עצירה או האטה מוקדמת של חלוקת התאים.

Fig. 4. Northern blot analysis of *PaPCNA*, *PaCYCB1* and *PaCYCA1* transcripts in seed tissues collected from normal fruit (NF) and small fruit (SF) at different stages of fruit development. Filters, stained with Methylene blue and used in RNA gel blot analysis, are denoted by either one or two asterisks, as in described in the legend to Fig 3.

ג. בידוד גן ההומולוגי ל- *Lefw2.2* מאבוקדו 'האס' - איפיון דגם ביטוי הגן במהלך התפתחות הפרי בפירות גדולים וקטנים: כפי שהוזכר במבוא, *fw2.2* הינו גן המקודד לחלבון הפועל כבקר שלילי של חלוקת תאים בעגבנייה (17-18). בהילקח בחשבון הידע הקיים בהקשר לפנוטיפ 'פרי קטן' באבוקדו 'האס', והתוצאות שמוצגות לעיל נראה סביר כי באבוקדו קיים גן ההומולוגי לגן זה המתבטא ביתר בפרי קטן ומעכב את חלוקת התאים בפרי. כפי שתארנו בדו"ח הקודם, באמצעות שימוש בפרימרים דגנרטיבים כנגד איזורים שמורים ב *fw2.2* ושימוש בשיטת RT-PCR, בודדנו גן מאבוקדו מקודד ל- 180 חומצות אמיניות וחולק ההומולוגיה של 62% ברמת החלבון עם *FW2.2*. גן זה כונה על ידינו *Pafw2.2-like* ונרשם במאגר הגנים תחת מספר גישה: GU272026. בדיקת דפוס ביטוי הגן, בפירות גדולים וקטנים, הראתה כי

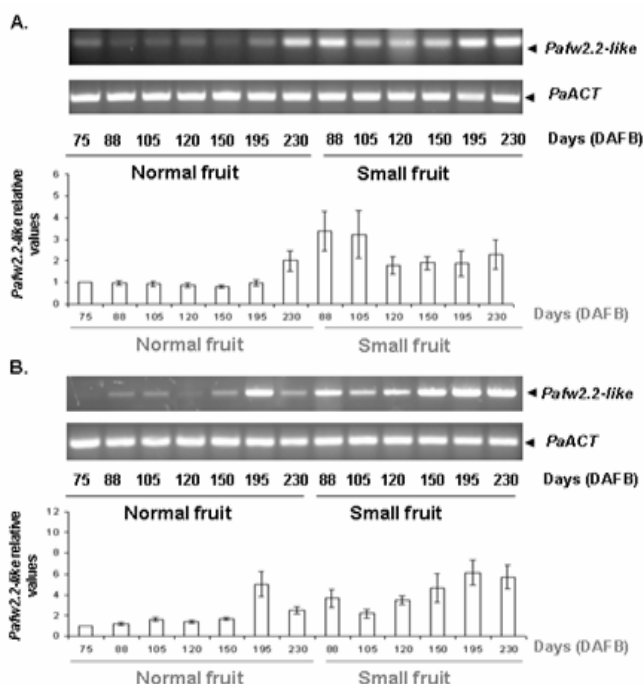


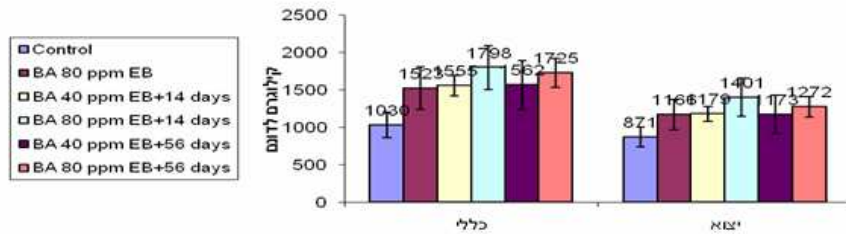
Fig 5 Expression profile of *Pafw2.2* during development of normal and small fruit. RT-PCR analysis of *Pafw2.2* in seed (A) and mesocarp (B) tissues. *Pafw2.2*-like cDNA was amplified by 42 PCR cycles. Actin cDNA (*PaACT*) was used as an internal standard, using 25 PCR cycles. Data was also analyzed quantitatively, with graphs presenting collective data shown. Relative *Pafw2.2*-like values are presented as a percentage of those values attained at 77 and 88 DAFB (for seed and mesocarp tissues, respectively). Each value was normalized to its corresponding *ACT* mRNA level and the initial times were set to 1.0. Each bar represents the average \pm SE of three independent experiments.

במהלך התפתחות הפרי *Pafw2.2-like* מתבטא ביתר ברקמות פרי קטן (ציפה וזרע), זאת בהשוואה לאותן רקמות בפרי הגדול (איור 5). תפקידו האפשרי של *Pafw2.2-like* נידון בהמשך.

חלק II - ניסיונות שטח: א. ישום בנזיל אדנין לצורך הגדל פרי ב'האס': ידוע כי ישום PGRs שונים עשוי להשפיע בצורה חיובית על גודל הפרי באבוקדו, אם כי האפקטיביות של הטיפולים משתנה ותלויה בגורמים כגון: עומס פרי בעץ, גורמים סביבתיים וגורמים בלתי ידועים. בעבודה זו נבחנה השפעת התכשיר בנזיל אדנין BA (כתכשיר "בונגריו") על

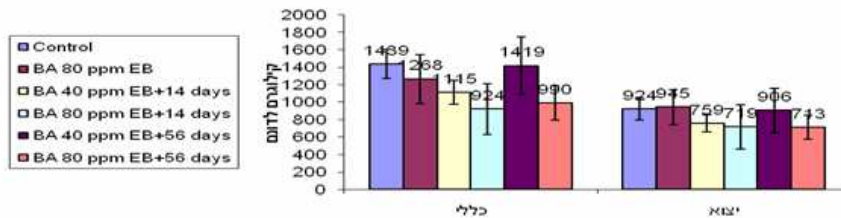
א. היבול ועל כמות הפרי הגדול בון 'האס'. הטיפולים שניתנו כללו

השפעת בנזיל אדנין על יבול הכללי וליצוא - יד חנה 2008/9



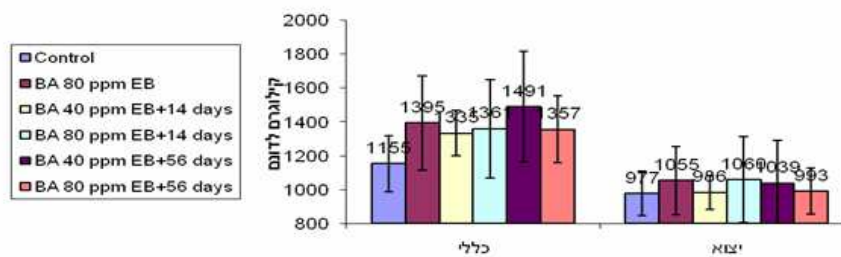
יישום BA בסוף פריחה ב-14 וב-56 יום לאחר פריחה. בשנה שעברה נמצא כי ישום בנזיל אדנין שבועיים לאחר סוף פריחה ו-56 יום לאחר סוף פריחה הגבירו את היבול הכללי מעל

השפעת בנזיל אדנין על יבול כללי וליצוא - יד חנה 2009/10



ב. הביקורת הן בריכוז 40 ח"מ והן בריכוז 80 ח"מ (איור 6). בהמשך בשנה זו בוצע ניסוי במתכונת דומה, אולם כפי שניתן לראות באיור 6, בעונת 2009/10 לא נצפתה השפעה חיובית של טיפולים אלו על היבול הכללי.

השפעת בנזיל אדנין על יבול כללי וליצוא - יד חנה 2008/9-2009/10



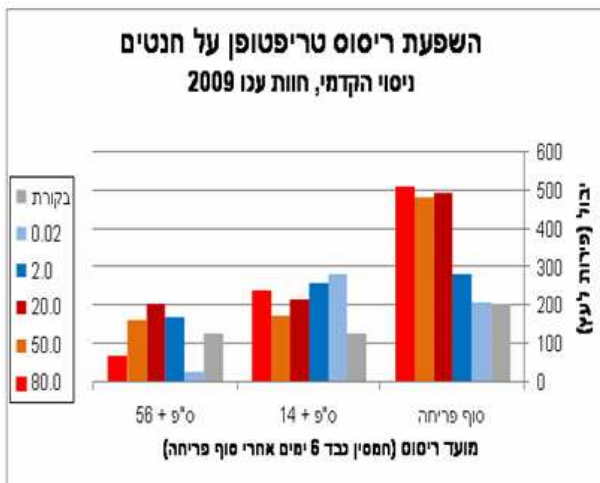
יחד עם זאת סך ממוצעי הנתונים, לגבי שתי העונות, עדין מצביע על מגמה חיובית ועל הגדלת יבול כללי לאחר טיפול בציטוקינין בריכוזים של 40 ו-80 ח"מ. מהלך הניסוי לוה בדיגום פירות גדולים וקטנים ובבדיקת פרמטרים של התפתחות הפרי.

איור 6. השפעת בנזיל אדנין בשלבים ובריכוזים שונים על היבול הכללי היבול ליצוא ביד חנה בעונות 2008/9; 2009/2010 ובסיכום שתי העונות. הטוחים מציינים שגיאת התקן של הממוצע.

במהלך התפתחות הפרי לא נמצאו הבדלים מובהקים בקוטר, אורך ומשקל הפירות בין פירות ביקורת גדולים ופירות מטופלים גדולים, ובין פירות ביקורת קטנים ופירות קטנים מטופלים (לא מוצג). ניסיונות אלו בוצעו במטע 'האס' ביד-חנה וריכוז הנתונים בוצע ע"י ד"ר ליאו וינר.

ב. ישום טריפטופאן לצורך הגדלת פרי ב'האס': טריפטופאן

הינה חומצה אמינית המשמשת כפרקורסור ליצירת אוקסין בצמח. לאחרונה דווח על שימוש בטריפטופאן לצורך הגדלת פרי במספר גידולים חקלאיים. בניסוי פרלימנרי שערכנו ריססנו עם תמיסת טריפטופאן (L-Tryptophan; Sigma) בחמישה ריכוזים שונים, בשלושה מועדים. בכל מועד הושארו גם עצי ביקורת. סה"כ היו בניסוי 15 טיפולים + 3 ביקורות. כל טיפול וביקורת יושם על שלושה עצי 'האס' הצמודים זה לזה. התוצאות שהתקבלו הראו אפקט חיובי בולט של הטיפול, בשלושת הריכוזים הגבוהים (20, 50, 80 ח"מ), כאשר הטיפול ניתן בסוף פריחה. כפי שניתן לראות באיור 7, התקבלה



איור 7. השפעת טריפטופאן בשלבים ובריכוזים שונים על היבול הכללי (פירות לעץ).

ביחידות של פירות לעץ עליה של עד פי 2.5 בעצים מטופלים לעומת הביקורת. נסיון זה בוצע במטע 'האס' בחוות הניסיונות בעכו וריכוז הנתונים בוצע ע"י ד"ר גד איש-עם.

4. דיון והצעות להמשך: בדיקת גודל התאים ומספר התאים בפירות גדולים וקטנים, שערכנו בעבודה הן בציפה והן בזרע מורים 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? והאם קיים פקטור כלשהו המבקר באופן כללי את מהלך חלוקת התאים בפרי? בכדי לנסות ולענות על שאלות אלו בחרנו להתמקד בבחינת דגם הביטוי של גנים המקודדים לאנזימים הפועלים בשלבים שונים של מסלול סינתזת ABA במהלך התפתחות הפרי ובמקביל בזיהוי ואפיון דגם הביטוי של גנים הקשורים במערך חלוקת התאים בפרי ובאפיון דגם ביטויים בפירות גדולים וקטנים.

א. בקרת מסלול ביוסינתזת ABA במהלך התפתחות הפרי: בעבודה שבוצעה בשנת המחקר הראשונה, הראנו כי בציפה, בקליפת הזרע ובזרע של פירות קטנים חלה עלייה חדה ברמת ה- mRNA עבור *PaNCED3*, המקודד לחלבון NCED3 (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase) הפועל במהלך סינתזת ABA (18-20). עלייה בביטוי הגן החלה עם מופע פנוטיפ הפרי הקטן (88 ימים לאחר פריחה מלאה), ושיאה נצפה בשלבים מאוחרים של התפתחות הפרי. יש לציין כי בעבודות קודמות נמצא נמצא מתאם ישיר בין עלייה בשעתוק גני *NCED* ועלייה ברמת ABA לאחר עקת יובש ובמהלך הבשלת פרי באבוקדו (21). האנליזות שביצענו אמנם לא לוו בבדיקות מקבילות למדידת רמת ה- ABA, אולם, מנתונים אלו הסקנו כי העלייה ברמת ABA בפירות הקטנים, אשר עליה דווח בעבר, מקורה מסינתזה *de novo* של ABA ברקמות הפרי, עלייה המבוקרת ברמת השעתוק ותלויה בעיקר בשעתוקו של הגן המקודד לאיזופורם- NCED3. ידוע כי ל ABA השפעה שלילית על מחזור חלוקת התאים (10-11). כך לדוגמה, בעבודות שנערכו בצמחי מודל דווח על מתאם חיובי בין עלייה ברמת ABA ועלייה בביטוי גנים המקודדים לחלבונים המעכבים פעילות ציקלינים (ICKs Inhibitors of CDKs) (22-23), ייתכן כי מנגנון דומה מופעל בפירות קטנים לאחר ייצור ABA. בכדי לבדוק אופציה זו יש להתמקד בעתיד בשיבוט ואפיון 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.

ב. שיבוט ואפיון גנים המקודדים לחלבוני ציקלין A1 ו-B1 ולחלבון PCNA במהלך התפתחות הפרי. בעבודה זו אנו מדווחים על שיבוטם של שלושה גנים מאבוקדו המקודדים לחלבוני ציקלין A1 ו-B1 ולחלבון PCNA. אפיון דגם ביטוי הגנים בפירות גדולים הראה כי ביטויים יורד בהדרגה במהלך התפתחות הפרי, בד בבד עם ירידה בחלוקת התאים. מאידך, בפירות קטנים ביטויים של גנים אלו היה נמוך מלכתחילה, במקביל לעצירה מוקדמת בחלוקת התאים ברקמות הציפה והזרע. בהתבסס על תוצאות אלו ניתן להניח כי שינויים כלשהם (או במאזן הסוכרים או במאזן ההורמונלי) החלים בפירות הקטנים מבקרים את ביטויים של גנים אלו, גורמים לרפרסיה מוקדמת של שעתוקם ומשפיעים על גודלו הסופי של הפרי. לחילופין, (ו/או בנוסף) ניתן לשער כי ביטויים של גנים אלו מבוקר, בצורה ישירה או עקיפה ע"י רגולטור חלבוני כדוגמת FW2.2 הפועל בעגבנייה ומבקר באופן שלילי את חלוקת התאים בפרי.

ג. אפיון גן ההומולוגי ל- *fw2.2* באבוקדו 'האס' - ביטוי הגן במהלך התפתחות הפרי ומעורבותו האפשרית בעיכוב תהליך חלוקת תאים בפרי. - כפי שדיווחנו בשנה הקודמת במהלך מחקר זה שיבטנו גן רביעי מאבוקדו (*Pafw2.2*) החולק הומולוגיה לגן *fw2.2* מעגבנייה. אפיון דגם ביטוי הגן הראה כי *Pafw2.2-like* מתבטא ביתר ברקמות של

פירות 'האס' קטנים, זאת בהשוואה לאותן רקמות בפירות גדולים. אנליזות חוזרות שערכנו בשנה זו הראו תמונה דומה (ראה סיכום ממוצעי בדיקות באיור 6). יש לציין כי בעגבנייה חל תהליך חלוקת תאים בפרי ב"חלון פיסיוולוגי" קצר, לפני ואחרי אנטזיס. בהתאמה, דווח על עלייה ברמת הביטוי של *fw2.2*, בקו הכמעט איזוגני בעל אלל 'פרי קטן', בפרק זמן זה (19). בפרי האבוקדו, בו חלוקת התאים נמשכת עד ל 120-150 יום לאחר פריחה מלאה, ביטוי גבוה של *Pafw2.2* בפירות קטנים בפרק זמן זה, עשוי להעיד כי *Pafw2.2* פועל בדומה ל-*fw2.2* ומבקר באופן שלילי את חלוקת התאים. יחד עם זאת יש לציין כי ביטוי גבוה של *Pafw2.2* נצפה גם בשלבים מאוחרים של התפתחות הפרי (בהם חלוקת התאים פחותה או כמעט נפסקת לחלוטין). לפיכך יש לנקוט בשלב זה במשנה זהירות בהסקת מסקנות כלשהם לגבי אופי פעילותו של *PaFW2.2*. בהמשך ניתן יהיה לשאול מהם הגורמים המבקרים את העלייה בביטוי *Pafw2.2* בפרי הקטן. אחת ההיפותזות בנוגע לאופן פעילותו של *FW2.2* טוענת כי תפקידו של *FW2.2* הינו להתאים את פעילות מחזור התא בפרי לתנאי הצמח הקיימים (כגון לשינויים באספקת קרבוהידרטים). 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 וכן בירידה ברמת הביטוי של *fw2.2* (24). מכיוון שבאבוקדו פירות קטנים מתאפיינים בירידה ברמת הסוכרוז ובעלייה ביצירת ABA (9-2), 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'. בעבודה זו נבחנה השפעת BA במועדים ובריכוזים שונים על היבול וכמות הפרי הגדול ב'האס'. הרציונאל שעליו התבססנו במתן טיפול מאוחר (56 יום לאחר סוף פריחה) מבוסס על הממצא כי חלוקת תאים מסיבית בפרי נמשכת עד כ 120-150 יום לאחר פריחה מלאה. תוצאות הניסוי ביד חנה בעונת 2008/09 אמנם מדגימות כי המגמה להעלאת היבול של פרי גדול בולטת בעיקר 14 ו 56 - יום לאחר סוף פריחה, אולם הניסוי שנערך במתכונת דומה בעונת 2009/10 לא הראה תוצאות דומות. ע"מ לקבל תמונה ברורה יותר הניסוי יבוצע באותה המתכונת בעונת 2010/11 – וסך הנתונים התלת שנתיים ישוקללו בהמשך בכדי לקבוע את מידת יעילות הטיפול.

ה. בחינת השפעת טריפטופאן על היבול וכמות הפרי הגדול בזן 'האס'. כאמור שימוש בטרפטופאן לצורך הגדלת ייבול דווח במספר גידולים חקלאיים (25). התוצאות שהתקבלו בעבודה זו מניסוי הקדמי עם טריפטופאן באבוקדו 'האס' הראו אפקט חיובי בולט בריכוזים של 20, 50, 80 ח"מ, כאשר יישום הטיפולים בוצע בסוף פריחה בלבד. הניסוי שבוצע היה אמנם פרלימנרי והתבסס על מעט עצים לטיפול. תוצאות ניסויים אלה מצביעות על כך שהגדלת היבול בטיפולים אלו לא חלה כתוצאה מהגדלת גודל הפירות כי אם כתוצאה ממניעת נשירה חנטים מיד לאחר פריחה. יש לציין כי עם סוף פריחה חלו תנאי שרב במטע ונראה כי ריסוס בטרפטופאן מנע נשירת חנטים מסיבית אשר הודגמה בעצי ביקורת. ניסויים חוזרים לצורך ביסוס התוצאות מתוכננים לעונת 2010/11. מכיוון שעל פניו נראה כי הטיפול מנע בעיקר נשירת חנטים, ולכן העלה את היבול הכללי, תיבדק במקביל בעונת 2010/11 השפעת הטיפולים על אינדקס נשירת החנטים/פירות בעצי בקורת לעומת עצים מטופלים. בעתיד ניתן יהיה לבדוק כיצד טיפול מסוויים משפיע על דגם הביטוי של הגנים השונים ששיבטנו, בכדי לבדוק את השפעת הטיפולים על מהלך חלוקת התאים בפרי. כמו כן יש לשקול את האפשרות של שילוב טיפולי טריפטופאן + ציטוקינין. הטיפול בטרפטופאן לצורך הגדלת יבול עשוי להוות אלטרנטיבה יעילה ובטוחה לעומת שימוש באוקסינים סינטטים כדוגמת 2,4 D אשר לא נמצאו יעילים לשימוש באבוקדו.

1. Schroeder CA: Growth and development of the 'Fuerte' avocado fruit. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 1953, 68:253-258.
2. Cowan AK, Moore-Gordon CS, Bertling I, Wolstenholme BN: Metabolic control of avocado fruit growth. *Plant Physiol* 1997, 114:511-518.
3. Cowan AK, Cripps RF, Richings EW, Taylor NJ: Fruit size: Toward an understanding of metabolic control of fruit growth using avocado as a model system. *Physiologia Plantarum* 2001, 111:127-136.
4. Cowan AK, Taylor NJ, van Staden J: Hormone homeostasis and induction of the small-fruit phenotype in 'Hass' avocado. *Plant Growth Regulation* 2005, 45:11-19.
5. Moore-Gordon CS, Cowan AK, Bertling I, Botha CEJ, Cross RHM: Symplastic solute transport and avocado fruit development: a decline in Cytokinin/ABA ratio is related to appearance of the 'Hass' small fruit variant. *Plant & Cell Physiology* 1998, 39:1027-1038.
6. Taylor NJ, Cowan AK: Plant hormone homeostasis and control of avocado fruit size. *Plant Growth Regulation* 2001, 35:247-255.
7. Taylor NJ, Cowan AK: Xanthine dehydrogenase and aldehyde oxidase impact plant hormone homeostasis and affect fruit size in 'Hass' avocado. *J Plant Res* 2004, 117:121-130.
8. Cowan AK, Cairns ALP, Bartels-Rahm B: Regulation of abscisic acid metabolism: towards a metabolic basis for abscisic acid-cytokinin antagonism. *Journal of Experimental Botany* 1999, 50:595-603.
9. Richings EW, Cripps RF, Cowan AK: Factors affecting 'Hass' avocado fruit size: Carbohydrate, abscisic acid and isoprenoid metabolism in normal and phenotypically small fruit. *Physiologia Plantarum* 2000, 109:81-89.
10. Inze, D: Green light for the cell cycle. *The EMBO Journal* 2005, 24: 657-662.
11. Inze, D and Veylder, L : Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genetics* 2006, 40: 77-105.
12. Joubes , D, Walsh D, Raymond P, Chevalier C : Molecular characterization of the expression of distinct classes of cyclins during the early development of tomato fruit. *Planta* 2000, 211: 430-439.
13. Riou-Khamlichi, C., Menges, M., Healy, J.M., and Murray, J.A. Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Molecular and Cellular Biology* 200, 20: 4513-4521.
14. Sa´nchez, M.P., Gurusinghe, S.H., Bradford, K.J., and Va´zquez-Ramos, J.M. Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination. *Journal of Experimental Botany* 2005, 56: 515–523.
15. Frary, A., Nesbitt, T.C., Grandillo, S., Knaap, E., Cong, B., Liu, J., Meller, J., Elber, R., Alpert, K.B and Tanksley, S.D *fw2.2*: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* 2000, 289: 85-88.

16. Cong, B and Tanksley, S.D: FW2.2 and cell cycle control in developing tomato fruit: a possible example of gene co-option in the evolution of a novel organ. *Plant Molecular Biology* 2006, 62: 867-880.
17. Cong, B., Liu, J and Tanksley, S.D : Natural alleles at a tomato fruit size quantitative trait locus differ by heterochronic regulatory mutations. *Proceeding of the National Academy of Science, USA* 2002, 99: 13606-13711.
18. Seo, M., and Koshiba, T :Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* 2002, 7: 41-48.
19. Zeevaart, J.A.D., Heath, T.G., and Gage, D.A : Evidence for a Universal Pathway of Abscisic Acid Biosynthesis in Higher Plants from O Incorporation Patterns. *Plant Physiology* 1989, 91: 1594-1601.
20. Liotenberg, S., Northa, H., and Marion-Poll, A : Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants. *Plant physiology and biochemistry* 1999, 37: 341-350.
21. Chernys, J.T., Zeevaart, J.: Characterization of the 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado. *Plant Physiol* 2000, 124:343-353.
22. Wang, H., Qi, Q., Schorr, A., Cutler, A.J., Crosby, W. L., Fowke, L.C: ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *The Plant Journal* 1998, 15: 501-510.
23. Wang, H., Zhou, Y., Bird, D.A., Fowke, LC: Functions, regulation and cellular localization of plant cyclin-dependent kinase inhibitors. *Journal of Microscopy* 2008, 231: 234-246.
24. Baldet, P., Hernould, M., Laporte, F., Mounet, F., Just, D., Mouras, A., Chevalier, C and Rothan, C : The expression of cell proliferation-related genes in early developing flowers is affected by a fruit load reduction in tomato plants. *Journal of Experimental Botany* 2006, 57: 961-970.
25. Pillitteri, L.J., Chao, C.T and Lovatt, C.J. Foliar-applied Tryptophan increases total yield and fruit size of Citrus reticulata (Blanco) cv. Fina Sodea Clementine Mandarin. In ISHS 11th. Symp. on Plant Bioregulators in Fruit Production.2009 Abstract book pg.63.