

נושא המחקר: לימוד מנגנוני בקרת הסרוגיות באבוקדו 'האס'.
הצעת מחקר הקדמית מוגשת לקרו מדען ראשי – צוות עצי פרי.
שמות השותפים למחקר: ורד יריחימוביץ וירדנה דהן – בידוד גנים "מתזמני פריחה" ומעכבי פריחה" ובחינת דגם ביטויים. משה גורן – איסוף חומר צמחי וטיפולים במטע. כתובת הדוא"ל של החוקר הראשי: veredi@agri.gov.il

תקציר

תופעת הסרוגיות הקיימת בעצי פרי רבים הינה תופעה כללית הגורמת לתנודות עונתיות ביבולים במחזוריות של שנת שפע ושנת שפל. הזן 'האס' מהווה מרכיב עיקרי בין זני האבוקדו בארץ ומתאפיין בסירוגיות גבוהה ובגודל פרי קטן. תופעות אלו, המהוות בעיות חקלאיות, פוגעות בריווחיות הגידול ועשויות להיות קשורות אחת בשנייה. גודל הפרי הינו בעייתי בזן זה כיוון שאחוז גבוה מכלל הפירות הינם בעלי משקל סופי נמוך. פירות קטנים נבדלים מפירות גדולים ומתאפיינים ביצירת רמות (במהלך התפתחות הפרי. בעיית גודל פרי מחריפה בשנות שפע, ABA גבוהות של חומצה אבסיסית) כאשר אחוז גבוה יותר של פירות קטנים מתקבל בשנת שפע בהשוואה לשנות שפל. בעבודות קודמות דווח כי בשנת שפל קיים ייצור עודף של ענפים וגטטיבים לעומת ענפים רפרודוקטיבים, משמע סרוגיות באבוקדו מייצגת בעיית התמיינות. כמו כן נמצא כי הסרת פירות במהלך שנת שפע, גרמה במרסיטמות קודקודיות והעלתה את מספר הענפים הפורחים בשנה ABA ו IAA לירידה בריכוזי העוקבת. על-כן הוצע, כי מעבר של הורמונים מהפרי המתפתח בשנת שפע, עשוי לעכב תהליכי מעבר לפריחה בשנה העוקבת. מעבר התפתחותי מרקמה וגטטיבית לרפרודוקטיבית נחקר באופן אינטנסיבי בצמח המודל ארבידופסיס וידוע כי הוא מבוקר ע"י קבוצה קטנה של גנים "מתזמני פריחה" ו"מעכבי פריחה". סביר להניח כי קיים מנגנון אוניברסלי המבקר מעבר לפריחה. אנו מציעים כי גנים "מתזמני פריחה" ומעכבי פריחה" עשויים להיות מבוטאים בניצנים הקודקודיים באבוקדו ולבקר את המעבר לפריחה. ביטויים של גנים אלו עשוי להיות מושפע ממספר גורמים ביניהם שינויים במאזן ההורמונלי. בהתחשב במכלול הנתונים הידועים אודות תופעת הסירוגיות ומופע פרי קטן ב'האס', אנו סבורים כי בפירות קטנים בשנת שפע ובין עיכוב תהליך ABA יש טעם לבדיקת קשר בין העלייה בייצור ההתמיינות לפריחה בשנה העוקבת. לפיכך, מחקר זה מציע: א- בידוד ואיפיון גנים "מתזמני פריחה" ב- איפיון דגם הביטוי של גנים אלו בניצנים הקודקודים, בשנת שפע ו"מעכבי פריחה" מאבוקדו. על ABA ובשנת שפל ולאחר הסרה סלקטיבית של פירות קטנים בשנת שפע. ג- בדיקת השפעת התמיינות לפריחה ועל דגם הביטוי של הגנים המעורבים בבקרת פריחה. הבנה עמוקה יותר ברמה הביולוגית של תופעת הסרוגיות עשויה בטווח הרחוק לעזור בפיתוחן של פרוטוקולים שיאפשרו התמודדות יעילה עם בעייה זו.

מבוא ותאור הבעייה: תופעת הסרוגיות הקיימת בעצי פרי רבים (כגון זית, הדורים ואבוקדו), הינה תופעה כללית הגורמת לתנודתיות עונתית ביבולים במחזוריות של שנת שפע ושנת שפל. הזן 'האסי' מהווה מרכיב עיקרי בין זני האבוקדו בארץ. לזן זה פוריות סבירה, טעם ומירקם טובים ועונת שיווק מתאימה, אולם הוא מתאפיין בסירוגיות גבוהה ובגודל פרי קטן. תופעות אלו, המהוות בעיות חקלאיות, פוגעות בריווחיות הגידול ועשויות להיות קשורות אחת בשנייה. גודל הפרי הינו בעייתי בזן זה כיוון שאחוז גבוה מכלל הפירות המתקבלים (40%-60%) הינם בעלי משקל סופי הנמוך מ-220 גר'. נמצא כי פירות קטנים מתאפיינים ביצירת רמות גבוהות של ABA במהלך התפתחות הפרי. כמו כן, ידוע כי בעיית גודל פרי מחריפה ביתר שאת בשנות שפע בהשוואה לשנות שפל, כאשר אחוז גבוה יותר של פירות קטנים לעץ מתקבל בשנת שפע בהשוואה לשנות שפל (פרופ' קרול לווט- דיווח אישי). הסיבות לתופעת הסירוגיות הינן מורכבות ועשויות להיות מושפעות מגורמים חיצוניים, התלויים במשטר ההשקיה והדישון של העץ ומגורמים פנימיים המעכבים את המעבר לפריחה. באופן כללי, קיימות בצמחים תקופת גידול וגטטיבית, בה חלה התמיינות עלים במריסטמות הקודקודיות. מאוחר יותר, חל תהליך התמיינות נוסף ברקמות המריסטטיות ומעבר ליצירת ענפים נושאי פרחים (ענפים רפרודוקטיביים). מהספרות ומדיווחי מדריכים וחקלאים, ניתן ללמוד כי בשנת שפל קיים ייצור עודף של ענפים וגטטיביים לעומת ענפים רפרודוקטיביים ומכאן ניתן להניח כי בעיית הסרוגיות באבוקדו מייצגת, לפחות בחלקה, בעיית התמיינות. עבודות שנערכו בזן 'האסי' הראו כי הסרת פירות מתפתחים, במהלך שנת שפע, גררה שינויים במאזן ההורמונלי ובמאזן הקרבואידרטים בניצנים הקודקודיים. כך לדוגמא, דווח, כי הסרת פירות בחודשי הקיץ גרמה לירידה בריכוזי IAA ו ABA במריסטמות קודקודיות והעלתה את מספר הענפים הפורחים בשנה העוקבת באביב (1). ממצאים אלו עשויים להעיד כי ייתכן ומעבר ההורמונלי מהפרי המתפתח לעבר הניצנים הקודקודיים, בשנת שפע, מעכב את ההתמיינות לפריחה במריסטמות הקודקודיות בשנה העוקבת. המעבר ההתפתחותי מרקמה וגטטיבית לרפרודוקטיבית נחקר באופן אינטנסיבי בארבידופסיס. נמצא כי בצמח מודל זה קיימים קיימים מספר מסלולים המבקרים התמיינות לפריחה, מסלולים אלו עשויים להיות מופעלים בעקבות שינויים חיצוניים בתנאי סביבה (כגון: שינויים בטמפרטורה, באורך גל ובאיכות ההארה) או בעקבות שינויים אנדוגניים בצמח. האינדוקציה לפריחה, במסלולים השונים מבוקרת ע"י קבוצת קטנה של גנים הקרויים "מתזמני פריחה" (Floral integrator genes), גנים אשר הפעלתם מובילה לפריחה (2-3). גורם מרכזי בבקרת ביטויים של גנים אלו הינו החלבון "מעכב הפריחה" FLC (Flowering locus C), המדכא את שעתוקם של הגנים "מתזמני הפריחה". נמצא כי העיכוב המושרה על ידי FLC מוסר בדרכים שונות, לדוגמא, בצמחים בהם נדרשת חשיפה לטמפרטורות נמוכות (ורנליציה) בכדי לעודד פריחה, מושתק הגן FLC בדרך אפיגנטית ע"י מודיפקציה של היסוטונים באתר FLC. כמו כן נמצא כי פרופיל הביטוי של הגן המקודד ל FLC

משתנה במהלך עונות השנה. כך למשל דווח כי ביטוי של גן הומולוגי ל *FLC* בהדרים (*PtFLC*) עולה באופן חד בניצנים קודקודיים במהלך החורף ויורד במהלך האביב. (4).

סביר להניח כי קיים מנגנון אוניברסלי המבקר מעבר מרקמה וגטטיבית לרקמה רפרודוקטיבית, לפיכך, אנו מציעים כי גנים "מתזמני פריחה" ומעכבי פריחה" עשויים להיות מבוטאים בניצנים הקודקודים באבוקדו ולבקר את המעבר לפריחה. ביטויים של גנים אלו עשוי להיות מושפע ממספר גורמים ביניהם שינויים במאזן ההורמונלי. בהתחשב במכלול הממצאים אודות תופעת הסירוגיות ב'האס' ומופע פרי קטן שהוזכרו להלן, אנו סבורים כי יש טעם לבדיקת קשר אפשרי בין העלייה בייצור (ABA) בפירות קטנים בשנת שפע ובין עיכוב תהליך ההתמיינות לפריחה בשנה העוקבת. יש לציין כי בשנים האחרונות עולה מספר הדייחחים בספרות המציין כי ל ABA אפקט אינהיביטורי המונע פריחה ומדכא ביטוי גנים מבקרי פריחה, ממצאים אלו תומכים ברעיון המוצע להלן.

מטרות המחקר, התועלת הצפויה ומידת התאמתו לתחומי העדיפות : בעיית הסרוגיות בזן 'האס' מהווה בעייה חקלאית המשפיעה במידה ניכרת על ריווחיות המטע. ניסיונות רבים הכוללים יישום הורמונים צמחיים ומעכבי צימוח שונים עדיין לא נתנו פתרון יעיל לבעייה. במחקר זה אנו מציעים לימוד בסיסי של המנגנונים המולקולריים העשויים לבקר את מנגנון הסירוגיות בזן 'האס'. מחקר זה מציע: **א-** בידוד ואיפיון גנים "מתזמני פריחה" ו"מעכבי פריחה" מאבוקדו. **ב-** איפיון דגם הביטוי של גנים אלו בניצנים הקודקודים, בשנת שפע ושנת שפל ולאחר הסרה סלקטיבית של פירות קטנים בשנת שפע. **ג-** בדיקת השפעת ABA על התמיינות לפריחה ועל דגם הביטוי של הגנים המעורבים בבקרת פריחה. בטווח הקצר תוצאות מחקר זה יובילו להבנה עמוקה יותר ברמה הביולוגית של תופעת הסרוגיות וייתכן אף למציאת קשר בין בעיית גודל פרי ובעיית הסירוגיות. בטווח הרחוק, מידע זה עשוי לסייע לפיתוחן של פרוטוקולים שיאפשרו התמודדות יעילה יותר עם תופעת הסירוגיות באבוקדו. אחד מהיעדים שהוצבו השנה ע"י ועדת ההיגוי של המדען בעצי פרי הינו "פוריות יציבה - צמצום הסרוגיות ביבולים". אין ספק כי נושא המחקר המוצע להלן מתאים ביותר לתחומי העדיפות המוגדרים.

תקציר תוכנית המחקר: המעבר לפריחה יילמד בניצנים מתפתחים של גידול אביבי. בעבודות קודמות שנערכו בזן 'האס' אופיינו אחד-עשר שלבים של המעבר מרקמה וגטטיבית לרקמה רפרודוקטיבית (5), הגדרת שלבים אלו מקלה על איסוף החומר הצמחי. איסוף ודיגום חומר צמחי יתבצע בזן 'האס' הנטוע בתחומי מכון וולקני ובמטע 'האס' בקבוצת שילר. לאחר הפריחה האביבית ייסומו באקרעי 150-200 ענפים חדשים בעשרה עצים, מענפים אלו יידגמו ניצנים קודקודיים בפרקי זמן שונים, בהתאם לאחד-עשר השלבים שהוזכרו להלן. הניצנים יוקפאו בחנקו נוזלי וישמרו ב-80°C לצורך הפקת RNA ולצורך בדיקות רמות ABA בעזרת מכשירי HPLC ו GC-MS. במקביל, יקובעו חלק מהניצנים הנדגמים ב FAA לצורך הכנת חתכים היסטולוגיים ולימוד אנטומי. איסוף זהה יתבצע בשנה עוקבת (שתהיה שנת שפע או שפל). בנוסף, בשנת השפע ייבחרו עשרה עצים נוספים, בהם יסומו ענפים חדשים באביב. בעצים אלו יוסרו באופן סלקטבי הפירות בעלי פנוטיפ פרי קטן.

הסרת הפירות הקטנים תבוצע כ-75 יום לאחר פריחה מלאה, בפרק זמן בו ניתן לזהות בבירור הבדלים בין פירות גדולים ופירות. דיגום ניצנים קודקודים יבוצע בעצים אלו כמתואר מעלה. במקביל, נבודד מספריית cDNA, שהוכנה מפקעי פריחה של הזן 'האס' ומצוייה ברשותינו (התקבלה מפרופ' גדעון גרפי), את הגנים ההומולגים לגנים "מתזמני הפריחה" FLOWERING LOCUS T (FT), LEAFY (LFY) ו- SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS (SOC1). ולגן "מדכא הפריחה" FLC. בידודם של גנים אלו יבוצע על ידי שימוש בפרמרים דגנרטיבים כנגד איזורים שמורים והשלמת רצפיהם תיערך על ידי שימוש בשיטת 5'RACE ו-3'RACE. במידה ולא נצליח לבודד את הגנים מספרייה זו, ננסה לבודד מ-cDNA שיסונטז על ידינו תוך כדי שימוש ב-RNA שיזוק מהניצנים בשלבים השונים של המעבר לפריחה. דגם ביטויים של הגנים המבודדים במהלך התפתחות הניצנים, בשנת שפע ושפל ולאחר הסרה סלקטיבית של פירות קטנים בשנת שפע, ייבחן באנליזות Northern או ב-Real Time-RT-PCR. אנליזות *In situ* תבוצע במקביל לצורך אימות התוצאות. אנו צופים כי בשנות השפל התבטאותם של הגנים "מתזמני הפריחה" תעוכב במידה רבה. כמו כן הצפי הוא כי הסרה סלקטיבית של פירות קטנים בשנת שפע תשפיע על ביטויים של הגנים "מתזמני הפריחה" ו"מעכבי הפריחה" ועל רמת ההורמונים בניצנים הקודקודים. בהמשך ובהתאם לתוצאות שיתקבלו נשקול אפשרות בדיקת השפעת ABA על התמיינות לפריחה. לצורך לימוד השפעת ABA על המעבר לפריחה ירוססו ענפונים חדשים ב-ABA (+), שהינו צורתו הפעילה של הורמון זה. לצרכי ביקורת, ירוססו באופן זהה ענפונים חדשים בצורות האנלוגיות הבלתי פעילות של ההורמון ((-)-ABA, trans (+)-ABA). טיפולים אלו יבוצעו לאחר הסרה סלקטיבית של פירות קטנים בכדי לנטרל ככל האפשר את האפקט האנדוגני של ABA שעשוי להיות מעובר לניצנים הקודקודיים. לאחר ביצוע הטיפולים יבוצע דיגום ניצנים קודקודיים ואנליזות ביטוי גנים "מתזמני פריחה" ו"מעכבי פריחה" כמתואר מעלה.

מקורות מימון אחרים: אין למחקר זה מימון ממקור אחר. יש לציין כי במסגרת תוכנית מדען ממומנת (203-0708-08) אנו עוסקים בבחינת גורמים אנדוגנים המשפיעים על מאזן הורמונלי ועל גודל פרי ב'האס'. תוצאות עבודתנו מורות על עלייה חדה בביטוי גנים המקודדים לחלבונים הפעילים בביוסינטזת ABA במהלך התפתחות פירות קטנים. ועל כן ניתן להסיק כי בפרי קטן חלה סינטזה *de novo* של ABA. תוצאות אלו תומכות ברעיון המוצע בתוכנית זו. אנו רואים בתוכנית המוגשת להלן המשך "טבעי" של המחקר המתבצע במעבדתנו.

ספרות:

- 1- Lovatt, C. (2006). Proceeding of the California Research Symposium, 127-142.
- 2- Imaizumi, T. and Kay, S. (2006). Trends in Plant Science. Vol. 11 No.11
- 3- Dennis, E.S. and Peacock, W.J. (2007). Current Opinion in Plant Biology. 10:520-527
- 4- Zhang, J-Z., Li, Z-M., Mei, L., Yao, J-L. and Hu, C-G. (2009). Planta 229:847-859.
- 5- Salazar-Garcia, S., Lord, E.M. and Lovatt, C. (1998). J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123:537-544.