

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

הזן 'האס' מהווה מרכיב חשוב בין זני האבוקדו בארץ. הבעיה העיקרית בזן היא אחוז גבוה של פירות קטנים בעלי משקל סופי נמוך. תופעה זו, מהווה בעיה חקלאית מרכזית המשפיעה במידה ניכרת על רווחיות המטע. כשלב ראשון בעבודה זו בדקנו והשוונו את גודל התאים ומספרם בפירות גדולים וקטנים, במהלך התפתחות הפרי, תוצאותינו מורות כי מופע פרי קטן באבוקדו 'האס' הינו תולדה של עיכוב בתהליך חלוקת התאים ולא בגדילתם, תוצאות המאששות ממצאים מעבודות קודמות שפורסמו בנושא.

התפתחות תקינה של הפרי תלויה ביצירת/צבירת רמות גבוהות של ציטוקינינים (CK) ואוקסין (IAA). ממצאים מעבודות שנערכו בשנים האחרונות, מלמדים כי בפירות קטנים חלה עלייה חדה ביצירת/ צבירת חומצה אבסיסית (ABA), בזרע ובציפה. בניגוד לאוקסין וציטוקינינים המעודדים חלוקת תאים, ABA עשוי לעכב תהליך זה, לכן הוצע כי עלייה ביצירת/ צבירת ABA, בשלבים מוקדמים של התפתחות פרי, עשויה להיות אחד מהגורמים המרכזיים התורמים לעיכוב תהליך חלוקת התאים ולפנוטיפ פרי קטן בזן 'האס'. בכדי לבחון היפוטזה זו מחקרזה הציע א. בידוד אפיון ולימוד הביטוי והבקרה של גנים מאבוקדו המעורבים במסלול הביוסניטזה של ABA במהלך התפתחות הפרי.

ב. בחינת השפעות טיפולים בחומרים המעכבים סינטזת ABA על גודל הפרי.

תוצאות המעקב שערכנו אחר דגם הביטוי של הגנים המקודדים לאנזימים NCED ו NCED3, המשתתפים בשלבי סינטזה מוקדמים של ABA ושל מקטע הגן המקודד ל-MoCo-Sulfurase, אנזים המשתתף בשלבי סינטזה מאוחרים של ABA, מורים כי בפירות קטנים עלייה ברמת ABA, חלה כתוצאה מסינטזה *de novo* של הורמון זה ותלויה בעיקר בשעתוק הגן המקודד ל-NCED3. עלייה מקסימלית בשעתוק NCED3 בציפה ובקליפת הזרע של פירות קטנים נצפתה בשלבים מאוחרים של התפתחות פרי (150-230 יום לאחר פריחה מלאה), בשלבים אלו חלוקת התאים הינה מתונה ולכן עולה האפשרות כי עלייה ברמת ABA בפירות קטנים אינה הגורם העיקרי התורם לעיכוב בחלוקת התאים. גורמים נוספים עשויים לתרום לעיכוב בתהליך חלוקת התאים ויש לבדוק כיוונים נוספים. טיפול במעכב הצימוח אנזימימדי לא תרם באופן מובהק לעלייה במשקל פירות 'האס' קטנים. על סמך תוצאות בדיקות רמות ה ABA שיתבצעו בהמשך, יישקלו מועדי טיפולים נוספים וכמו כן שילוב טיפולי ציטוקינינים (איזופנטילאדנין ו/או זאטין) בזמנים שונים לאחר חנטת הפרי.

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

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 היא אחוז גבוה של פירות קטנים, כ 40%-60% מכלל הפירות הינם בעלי משקל סופי נמוך מ- 220 גר'. הפירות הקטנים נבדלים מהפירות הגדולים בצורה ובגודל, הבדלים אלו ניתנים לזיהוי בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרי. אפיון פירות קטנים הראה כי בפירות אלו קליפת הזרע מנוונת וקצב גידולם מואט, למרות זאת, היבטים נוספים הקשורים בהתפתחות הפרי כגון תהליכי הבשלה והזדקנות אינם מושפעים. תופעה זו, מהווה בעיה חקלאית מרכזית ומשפיעה במידה ניכרת על רווחיות המטע.

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 הפרי אינו גידול התאים אלא עיכוב בתהליך חלוקתם (2). ממצא זה הוביל לסדרת עבודות שנערכה במטרה לנסות ולאפיין שינויים במאזן ההורמונלי ובתכולת קרבוהידרטים, בפירות גדולים וקטנים, אשר עשויים להשפיע על מערך חלוקת התאים (ראה 9-2). ממצאים מעבודות אלו, מהווים בסיס להצעת המחקר שהוגשה.

ככלל, מהלך חלוקת התאים בפרי מבוקר על ידי הורמונים צמחיים המיוצרים בחלקי הצמח השונים, בעובר ובחלקי פרי נוספים. עוד 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 נוספים נמצא, כי במהלך התפתחות הפרי, חלה עלייה חדה ברמת חומצה אבסיסית (ABA) ברקמת הציפה של פירות קטנים (2). לציטוקינינים וחומצה אבסיסית השפעות סותרות, 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 שנערכו בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרי, הראו כי דרושות רמות גבוהות של אוקסין (IAA) לצורך התפתחות תקינה של הפרי. לעומת זאת, בזרעי פירות קטנים נמדדה עלייה בייצור/צבירת ABA וירידה בייצור/צבירת IAA.

ל-ABA תפקיד מרכזי בבקרת הסתגלות צמחים לתנאי עקה שונים. מספר היבטים הקשורים בבקרת סינטזת ABA נחקרו בשנים האחרונות במערכות מודל צמחיות שונות. בעבודות אלו זוהו מספר משפחות גנים המקודדות לאנזימים המעורבים במסלול סינטזת ABA ואופיין שעתוקם ברקמות שונות ובתנאי עקה שונים. המידע הקיים לגבי

סינטזת ABA בפרי האבוקדו ואופן בקרתה במהלך התפתחות הפרי מצומצם. בקרת מסלול סינטזת ABA נחקרה באבוקדו בעיקר בהקשר להבשלת פרי, כאשר המניע למחקר היה הממצא לפיו 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) (ראה איור 1). גנים אלו כונו בהתאם *PaNCED1-2-3*. דגם הביטוי של גנים אלו נבדק בעלים בתגובה ליובש ובמהלך הבשלת פרי, לעומת זאת 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 מרכזי בבקרת סינטזת ABA במהלך התפתחות הפרי.

בשנים האחרונות חלה תנופת נטיעות גדולה של אבוקדו בארץ, ובשל דרישות השוק רוב הנטיעות הן של 'האס'. למרות היקף הנטיעות הנרחב של אבוקדו 'האס', בעיית התפלגות גודל פרי בזן זה, הייתה ונותרה אחת הבעיות המרכזיות של הגידול. ניסיונות רבים ומגוונים שנערכו עד כה, וכללו יישום של הורמונים צמחיים שונים לא נתנו מענה סופי 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'. בעקבות עבודות אלו סברנו כי לימוד הבקרה של יצירת ABA במהלך התפתחות הפרי, והשפעתה על תהליך חלוקת התאים ועל גודל הפרי חיוני בכדי לנסות לפתור בעיה זו. לפיכך הצעת המחקר שהוגשה הציעה לעסוק בלימוד בסיסי של הגורמים המשפיעים על יצירת ABA במהלך התפתחות הפרי. שלבי המחקר שהוצעו כללו: 1- שיבוט, אפיון ולימוד השעתוק והבקרה של גנים מאבוקדו המעורבים במסלול הביוסנינטזה של ABA במהלך התפתחות הפרי. 2- שילוב טיפולים המעכבים את סינטזת ABA ובדיקת השפעתם הן על ביטוי הגנים הנ"ל והן על גודל הפרי בזן האס.

תוצאות – פירוט עיקרי הניסויים שבוצעו.

א. ביסוס המערכת המחקרית - כאמור, בעבודות קודמות נטען כי הגורם המגביל את התפתחות הפרי בזן 'האס' אינו גידול התא אלא עיכוב בתהליך חלוקת תאים. בעקבות ממצא זה, וכשלב ראשון בעבודתנו, ערכנו בדיקות לקביעת גודל התאים ומספר התאים במהלך התפתחות הפרי. לצורך בדיקות אלו, דגמנו פירות גדולים וקטנים במועדים שונים במהלך תקופת הגידול. דיגום הפרי התבצע במטע 'האס' הנטוע בקבוצת שילר. דגימות ראשונות נלקחו 47 ימים לאחר פריחה מלאה, אולם, חלוקה לקבוצת דיגום של פירות גדולים וקטנים התבצעה כ-90 יום לאחר מועד הפריחה, בשלב בו ניתן היה לזהות ברור הבדלים בין פירות גדולים וקטנים. 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, הבדלים אלו נצפו כ - 90 יום לאחר פריחה מלאה. כמו כן נמצא שינוי מובהק במשקל הפירות הגדולים והקטנים במהלך התפתחות הפרי ובמשקל הפרי הסופי (תמונה 1 א-ג). תוצאות חישוב גודל התאים הממוצע, בפרי גדול וקטן, במהלך התפתחות הפרי מוצגים בתמונה 2. כפי שניתן לראות, במהלך התפתחות הפרי, חלה בפירות הגדולים והקטנים גדילה במימדי התא, גדילה זו התמתנה במהלך תקופת התפתחות הפרי והגיעה לפלטו כ 150 יום לאחר פריחה מלאה. לא נצפו הבדלים מבחינת גודל התאים בין פירות גדולים וקטנים (תמונה 2 ב' ו ג'). לעומת זאת תוצאות חישוב מספר התאים הממוצע, בקוטר הפרי, הראו כי בפרי הקטן מספר התאים קטן באופן מובהק מאשר בפירות גדולים (תמונה 2 א'). המסקנה המתבקשת הינה כי אמנם הגורם המעכב את התפתחות הפרי הקטן אינו עיכוב בגידול התאים אלא עיכוב בתהליך חלוקתם. תוצאה זו מאששת תוצאות שהתקבלו בעבודות קודמות ומהווה בסיס לשלבי העבודה הנוספים שבוצעו.

ב. שיבוט ואפיון חלקי של הגן MoCo sulfurase מאבוקדו המקודד לאנזים הפעיל בשלב מאוחר של מסלול

סינטזת ABA. נקודות הבקרה של מסלול סינטזה ABA כוללות א. שלבי בקרה מוקדמים - בקרה ברמת

השעתוק. שלבי בקרה אלו תלויים בעיקר בשעתוקם של הגנים המקודדים לאנזים 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) (ראה איור 1).

ב. שלבי בקרה מאוחרים – בקרה ברמת השעתוק וברמה שלאחר שעתוק. חמצונו של ABA-aldehyde הינו השלב

האחרון במסלול סינטזת ABA, תהליך זה מקוטלז ע"י האנזים Aldehyde oxidase (AO) הדורש לצורך פעילות

שינויים הכוללים הוספת שייר מוליבדן ושייר גופריתי.

שינויים אלו, החלים לאחר תרגום מאפשרים את

הפעלתו של האנזים ומקוטלזים ע"י האנזים MoCo

sulfurase. הגן המקודד ל- MoCo sulfurase זוהה

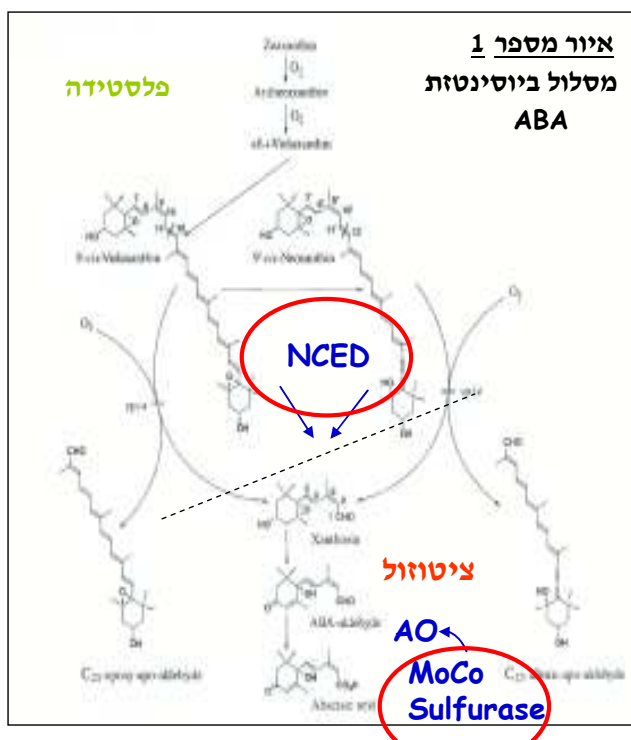
ושובט עד כה בעגבנייה ובארבידופסיס. זיהוי זה

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



Adapted from : Chernys and Zeevaart. Plant Physiol. 2000

נקראים בהתאמה *FLACCA*-ו-*ABA3* (12,13). באופן מעניין נמצא כי בארבידופסיס רמת הביטוי של 3 *ABA* עולה בעלים בתגובה ליובש ובתגובה לקור, ממצא המרמז כי לאנזים זה תפקיד מרכזי בבקרת סינטזת *ABA*. 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*. לצורך כך השוו רצפי הגנים *FLACCA*-ו-*ABA3* מבעגבנייה ומארבידופסיס ותוכנו מספר זוגות פרימרים דגנרטבים כנגד אזורים שמורים. על ידי שימוש בפרימרים אלו, הצלחנו לבודד מקטע גן מאבוקדו המקודד ל-263 חומצות אמיניות ומראה הומולוגיה של 62% לחלבוני *MoCo-Sulfurase* מעגבנייה ומארבידופסיס (ראה תמונה 3A-B). אנו מנסים כעת להשלים את רצף הגן המלא על ידי שימוש בשיטת 5'RACE ו-3'RACE. למרות שעדין לא ריצפנו את הגן השלם, בכדי לקבל אינדיקציה ראשונית לגבי תפקודו בבקרת סינטזת *ABA*, בדקנו את דגם הביטוי של מקטע הגן שבודדנו, בעלים לפני ואחרי עקת יובש ובציפת פרי במהלך הבשלת הפרי באמצעות אנליזת sq-RT-PCR. כביקורת נבדק דגם הביטוי של ה mRNA עבור *PaNCEDI-3* באותן רקמות. התוצאות שהתקבלו הראו כי בעלים, בתגובה ליובש, חלה עלייה חדה בביטוי *PaNCEDI*, אך לא נצפתה עלייה בביטוי ה mRNA עבור *PaNCED3*. ממצאים אלו עולים בקנה אחד עם ממצאים מעבודות קודמות בהן דווח כי באבוקדו *PaNCEDI* אחראי לעלייה בסינטזת *ABA* בעלים בעקבות עקת יובש (11). כמו כן, בתנאים בהם עבדנו, לא נצפתה עלייה בביטוי ה mRNA עבור *MoCo-Sulfurase* בעקבות עקת היובש (תמונה 4A). מאידך, בדיקת דגם הביטוי של הגנים המקודדים לאנזימים הפעילים במסלול הביוסינטזה של *ABA* במהלך הבשלת פרי, הראתה, כי בנוסף לעלייה ברמת *PaNCED3* אשר דווחה בעבר (11), חלה עלייה מתונה בביטוי מקטע ה mRNA המקודד ל *MoCo-Sulfurase*. ממצאים אלו מורים כי גם לגן המקודד ל *MoCo-Sulfurase* תפקיד בבקרת סינטזת *ABA* במהלך הבשלת הפרי. בנוסף, באופן מפתיע ובניגוד לממצאים בפרסומים קודמים, בבדיקות שערכנו במהלך הבשלת הפרי לא ניתן היה לראות עלייה בביטוי ה mRNA עבור *PaNCEDI* הן באנליזת sq-RT-PCR (תמונה 4B) והן באנליזת Northern (תמונה 4C), ממצא המרמז כי ככל הנראה באבוקדו עלייה ביצירת *ABA* בפרי ובעלה מבוקרת באופן שונה. (ראה דיון). יש לציין כי עדין לא ביצענו בדיקות מקבילות למדידת רמות ה-*ABA* ברקמות העלה והפרי אשר מהן הופק ה RNA. אנו מתכננים לבצע בדיקות אלו בעתיד הקרוב בכדי להשלים את התמונה.

ג. בחינת דגם הביטוי של *PaNCEDI-3* ושל מקטע הגן המקודד לכאורה ל-*MoCo-Sulfurase* באבוקדו

במהלך התפתחות הפרי. כאמור, בעבודות קודמות דווח על עלייה ברמת *ABA* בפירות 'האס' קטנים. בכדי לאפיין

את דגם הביטוי של גנים המקודדים לאנזימים הפעילים במסלול סינטזת ABA במהלך התפתחות הפרי ולבדוק, האם קיים דגם ביטוי ספציפי של תעתיק מסוים בפירות הקטנים, ערכנו שימוש ברקמות הפירות הגדולים והקטנים שנדגמו בזמנים השונים. לצורך כך, הופק RNA מרקמת קליפת הזרע והציפה ונבדק דגם הביטוי של גנים המקודדים ל *NCEDI-3* ולגן המקודד לכאורה ל *MoCo-Sulfurase* באנליזת sq-RT-PCR. תוצאות אנליזה זו הראו כי בציפה ובקליפת הזרע של פירות קטנים חלה עלייה חדה ברמת ה mRNA עבור *PaNCED3*. עלייה זו החלה עם מופע פנוטיפ הפרי הקטן (88 ימים לאחר פריחה מלאה), ושיאה נצפה בשלבים מאוחרים של התפתחות הפרי (תמונה 5A ו 5B). לא התקבלה דטקציה של התעתיק המקודד ל *PaNCEDI* (לא מוצג). בדיקת דגם הביטוי של הגן המקודד לכאורה ל *MoCo-Sulfurase* הראתה ביטוי כמעט קונסטיטוטיבי של תעתיק הגן בקליפת הזרע ובציפה של פירות גדולים וקטנים במהלך התפתחות הפרי. בשלב זה אנו חוזרים על הבדיקות שערכנו וכמו כן בכוונתנו להשלים את התמונה על ידי ביצוע אנליזה זהה ברקמות הזרע של פירות קטנים וגדולים ובדיקות מקבילות של רמות ABA ברקמות הפירות הגדולים והקטנים.

ד. בחינת השפעת מעכב הצימוח אנצימידול על גודל פרי. קיימים דיווחים בספרות, המורים כי חומרי צמיחה שונים משפיעים על הצטברות ABA בפרי האבוקדו. לדוגמא, דווח כי אנלוגים סיננטיים של ציטוקינינים כמו איזופנטילאדנין (2iP) וזאטין (Z), מזרזים תהליכי פירוק ABA ועל ידי כך תורמים לירידה בריכוזה בפרי. לעומת זאת, דווח כי הזרקת מעכב הצימוח אנצימידול לציפת הפרי במהלך ההבשלה מעכבת את ביוסינטזת ABA וגורמת להצטברות קסנטוקסין (9,14) כשלב ראשון במסגרת עבודה זו בדקנו את השפעת הטיפול באנצימידול על גודל הפרי. לצורך זה נערך ניסיון ראשוני במסגרת מצומצמת במטע 'האס' בקבוצת שילר. לשם כך סומנו באופן אקראי פירות קטנים ופירות גדולים ב 12 עצים, הסימון ניערך כ- 90 יום לאחר פריחה מלאה, בשלב בו ניתן לזהות בברור הבדלים בין פירות גדולים וקטנים. הפירות הקטנים, טופלו ע"י טבילה בריכוזי אנצימידול שונים (5, 30 ו 80 ppm) ובתוספת 0.05% Triton -X, כקבוצות ביקורת שימשו פירות קטנים ופירות גדולים ללא טיפול. מכיוון שבתחילת הניסוי לא היו בידינו נתונים לגבי דגם הביטוי של הגנים הפעילים בסינטזת ABA וכמו כן של רמות ABA בפירות הגדולים והקטנים, טיפולי האנצימידול ניתנו בשתי נקודות זמן (100 ו-130 יום לאחר פריחה מלאה), זאת בהתחשב בנתונים מעבודות קודמות המורים על עלייה ברמת ABA בשלב זה. במהלך תקופת התפתחות הפרי נערך איסוף נתונים הקשורים לקינטיקת התפתחות פרי, נתונים אלו נאספו מפירות לא מנותקים שהושארו על העצים. הפירות המסומנים שטופלו באנצימידול ופירות הביקורת, מכלל העצים, נקטפו בסוף תקופת הגידול והובאו למעבדה לצורך קביעת משקל. תוצאות הניסוי מוצגות בתמונה 6. התוצאות מראות כי טיפול האנצימידול שניתן בריכוז של

30ppm השפיע באופן מתון על קוטר הפרי (גרם לגידול מסוים בקוטר הפירות הקטנים המטופלים), אולם לא נצפתה השפעה על אורך הפרי וכמו כן על משקל הפרי הסופי. טיפולים בריכוזי אנצימידול האחרים לא השפיעו על גודל הפרי.

דיון והצעות להמשך

פנוטיפ פרי קטן באבוקדו 'האס' – מהו הגורם המגביל? פנוטיפ פרי קטן יכול להתקבל כתוצאה ממספר גורמים הכוללים: עיכוב בתהליך גדילת התאים, עיכוב בתהליך חלוקת התאים או שילוב שני גורמים אלו יחדיו. תוצאות בחינת גודל התאים ומספר התאים במהלך התפתחות הפרי, שהתקבלו על ידינו, מורים באופן חד משמעי כי מופע פרי קטן באבוקדו 'האס' הינו תולדה של עיכוב בתהליך חלוקת התאים ולא בגדילתם. תוצאות אלו מאששות ממצאים מעבודות קודמות שפורסמו בנושא זה. בהמשך נשאלת השאלה מהו הגורם לעיכוב בחלוקת התאים ומהי תרומתו הפוטנציאלית של ABA בתהליך זה, שכן בעבודות קודמות דווח על עלייה ברמת ABA בפירות קטנים בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרי. בכדיי לנסות ולענות על שאלה זו בחרנו להתמקד בבחינת דגם הביטוי של גנים הפעילים במסלול הביוסינטזה של ABA באבוקדו בכלל ובמהלך התפתחות הפרי בפרט.

בקרת מסלול ביוסינטזת ABA באבוקדו – עבודות קודמות הראו כי באבוקדו, כמו במינים נוספים, בקרת ביוסינטזת ABA תלויה בעיקר בשעתוקם של הגנים המקודדים לאיזופורמים שונים של NCED. שעתוק גנים נוספים הפועלים במסלול הביוסינטזה של ABA עשויי להוות שלב בקרתי נוסף. אחד מהגנים המשתתפים במסלול זה הינו הגן המקודד ל-MoCo-Sulfurase. גן זה עדין לא שובט ואופיין באבוקדו. בעבודה שערכנו שיבטנו מקטע מגן זה ואפיינו את דגם ביטויו בתנאי עקת יובש בעלים ובמהלך הבשלת פרי. התוצאות שבידינו הינן פרלימינריות אולם הן מורות כי ככל הנראה לגן זה תפקיד בקרתי משני בבקרת יצור ABA במהלך הבשלת פרי. יתרה מזאת וכפי שפורסם בעבר, התוצאות שבידינו מורות כי בקרת ייצור ABA בעלים תלויה בשעתוק הגן המקודד ל-NCED1 וכי בקרת סינטזת ABA בפרי תלויה אך ורק בשעתוק *NCED3* (כיוון שבניגוד לפירסומים קודמים לא נצפתה עלייה בביטוי mRNA עבור *NCED1*). ממצאים אלו מרמזים כי עלייה ביצירת ABA בפרי ובעלה מבוקרת באופן שונה לחלוטין. בכדיי לחקור לעומק בקרת סינטזת ABA בפרי יש להתמקד בעתיד בריצוף הפרומוטר של *NCED3* ובחיפוש רצפי בקרה ספציפים המאפשרים ביטוי בתנאים מסוימים (כגון מצבי יובש, עקות חום, או כתלות במאזן הסוכרים), ואימות תיפקודם *In vitro*.

בקרת מסלול ביוסינטזת ABA במהלך התפתחות הפרי. מעקב אחר דגם הביטוי של הגנים המקודדים ל-NCEDI-3 ולגן המקודד לכאורה ל-MoCo-Sulfurase מורים כי עלייה ברמת ABA, המתרחשת בפירות קטנים, חלה כתוצאה מסינטזה *de novo* של הורמון זה ברקמות הפרי ותלויה בעיקר בשעתוק הגן המקודד ל-NCED3.

יצוין כי על פי התוצאות שקיבלנו העלייה המקסימלית בשעתוק NCED3 מתרחשת בציפה ובקליפת הזרע של פירות קטנים בשלבים מאוחרים של התפתחות פרי (150-230 יום לאחר פריחה מלאה), בשלבים בהן חלוקת התאים הינה מתונה (ראה תמונה א2). ממצאים אלו מעלים את האפשרות כי עלייה ברמת ABA בפירות קטנים אינה הגורם העיקרי התורם לעיכוב בחלוקת התאים. גורמים נוספים עשויים לתרום לעיכוב בתהליך חלוקת התאים ויש לבדוק כיוונים נוספים כגון מאזן קרבוהידרטים בפירות גדולים וקטנים במהלך התפתחות הפרי. כיוון שאין בידינו עדין תוצאות נוספות (קרי, בדיקת דגם הביטוי של הגנים הנ"ל בזרע במהלך התפתחות הפרי וכמו כן תוצאות רמות ABA) לעת עתה מסקנה זו צריכה להילקח בזהירות יתרה.

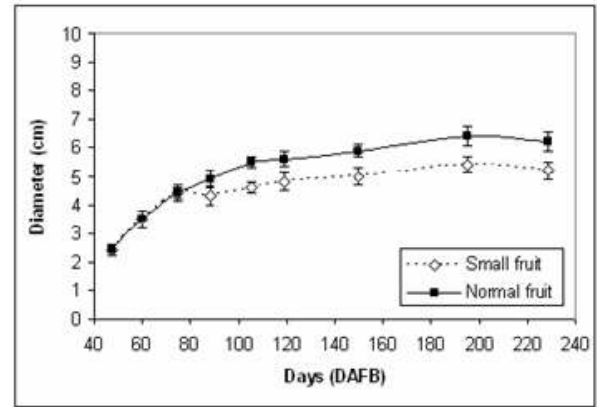
בחינת השפעת מעכב הצימוח אנצימידול על גודל פרי - הרציונאל שעליו התבססנו במתן טיפול באנצימידול היה מבוסס על ההנחה כי עלייה ברמת ABA בפרי קטן מעכבת את תהליך חלוקת התאים ועל כן, טיפול באנצימידול המעכב יצירת ABA, עשוי לגרום לירידה ברמת הורמון זה ולהסרת עיכוב תהליך חלוקת התאים. תוצאות ניסוי השטח שביצענו מורים כי טיפול במעכב הצימוח אנצימידול לא תרם באופן מובהק לעלייה במשקל פירות 'האסי' קטנים. לפיכך רעיון זה צריך להיבחן מחדש במיוחד לאור התוצאות שקיבלנו המורות כי עלייה בביטוי הגן המקודד ל-NCED3, המבקר עלייה בסינטזת ABA, חל בעיקר בשלבים האחרונים של התפתחות הפרי ולא בשלבים בהן חלוקת התאים הינה נמרצת. בחינת תפקיד ABA בעיכוב חלוקת התאים תתבצע לאחר קבלת סך התוצאות ובהמשך על סמך תוצאות בדיקות רמות ה ABA ניתן יהיה לשנות את מועד הטיפול ו/או את מספר הטיפולים ולכלול שילוב טיפולי ציטוקינינים (איזופנטילאדנין ו/או זאטין) בזמנים שונים לאחר חנטת הפרי.

8 רשימת ספרות מצוטטת -

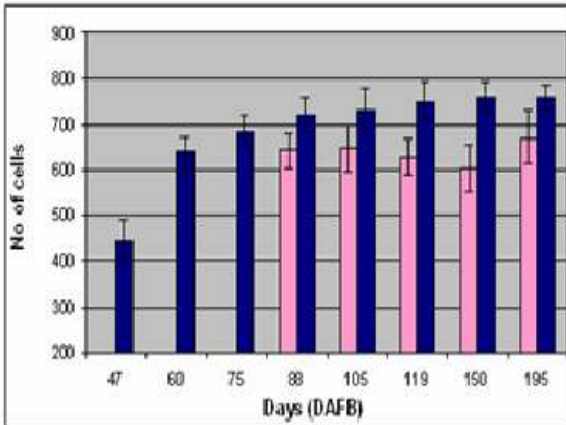
1. Schroeder CA: Growth and development of the "Fuerte" avocado fruit. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 1953, 68:253-258.
2. Cowan AK, Moore-Gordon CS, Bertling I, Wolstenholme BN: Metabolic control of avocado fruit growth. *Plant Physiol* 1997, 114:511-518.
3. Cowan AK, Cripps RF, Richings EW, Taylor NJ: 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. Blumenfeld A, Gazit S: Cytokinin activity in avocado seeds during fruit development. *Plant Physiol* 1970, 46:331-333.
11. Chernys JT, Zeevaart JA: Characterization of the 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado. *Plant Physiol* 2000, 124:343-353.
12. Sagi M, Scaccocchio C, Fluhr R: The absence of molybdenum cofactor sulfuration is the primary cause of the flacca phenotype in tomato plants. *Plant J* 2002, 31:305-317.
13. Bittner F, Oreb M, Mendel RR: ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 2001, 276:40381-40384.
14. Cowan AK, Railton ID: Cytokinins and Ancymidol inhibit Abscisic acid biosynthesis in *Persea gratissima*. *J. Plant Physiol.* 1987, 130:273-277.

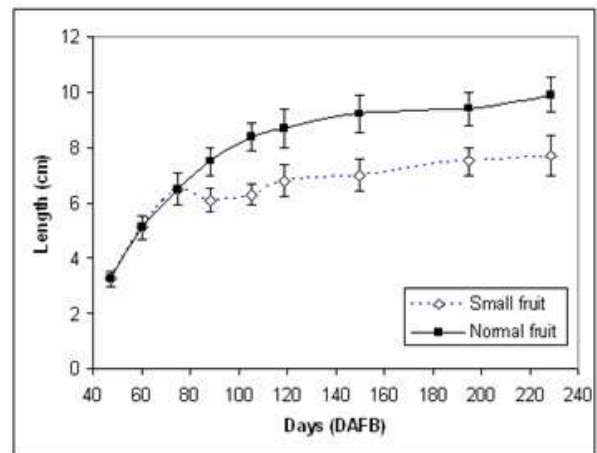
א.



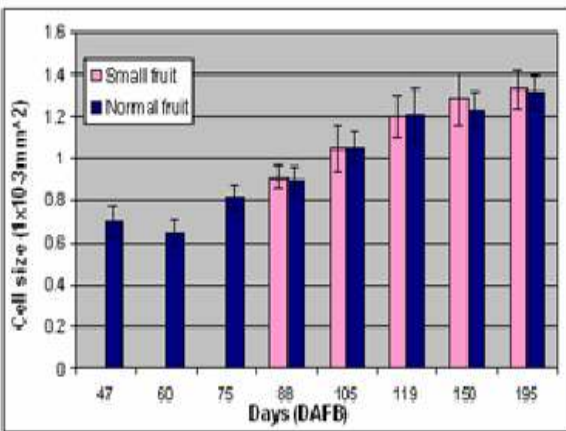
א.



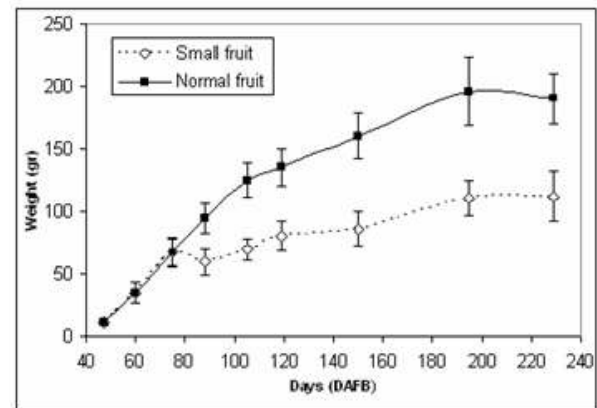
ב.



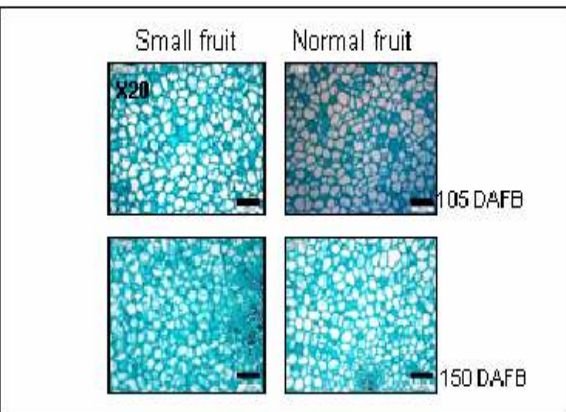
ב.



ג.



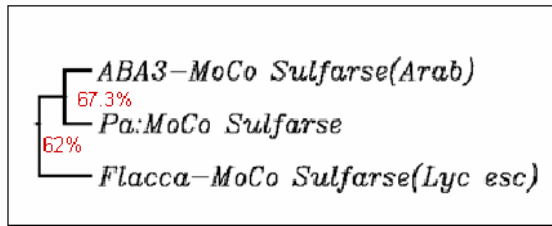
ג.



תמונה 1- קניטיקת התפתחות פירות 'האס' גדולים וקטנים. מעקב אחר שינוי קוטר, אורך ומשקל פרי רטוב של פירות קטנים וגדולים אשר נותקו מהעץ בשלבים שונים במהלך תקופת התפתחות הפרי. כל נקודה מייצגת ממוצע של 6 פירות +/- סטיית תקן.

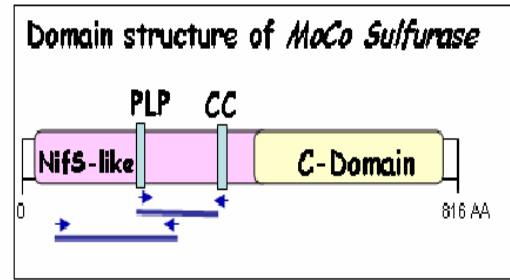
תמונה 2 - שינוי במספר התאים ובגודל התאים בפירות 'האס' גדולים וקטנים במהלך התפתחות הפרי.
א. מספר התאים הממוצע בקוטר הפרי חושב לפי ()
ב. גודל התאים הממוצע חושב ע"י חילוק מספר תאים אשר נספרו בשטח של $90,000 \mu\text{m}^2$. כל נקודה מייצגת ממוצע +/- סטיית תקן של 54 מדידות.
ג. תמונות חתכים היסטולוגים מציגות פרי גדול ופרי קטן בשלבים שונים של התפתחות הפרי.

* הערה - מדידות גודל תאים ומספר תאים בפירות גדולים וקטנים בנק. זמן 230 יום לאחר פריחה מלאה עדין לא הושלם



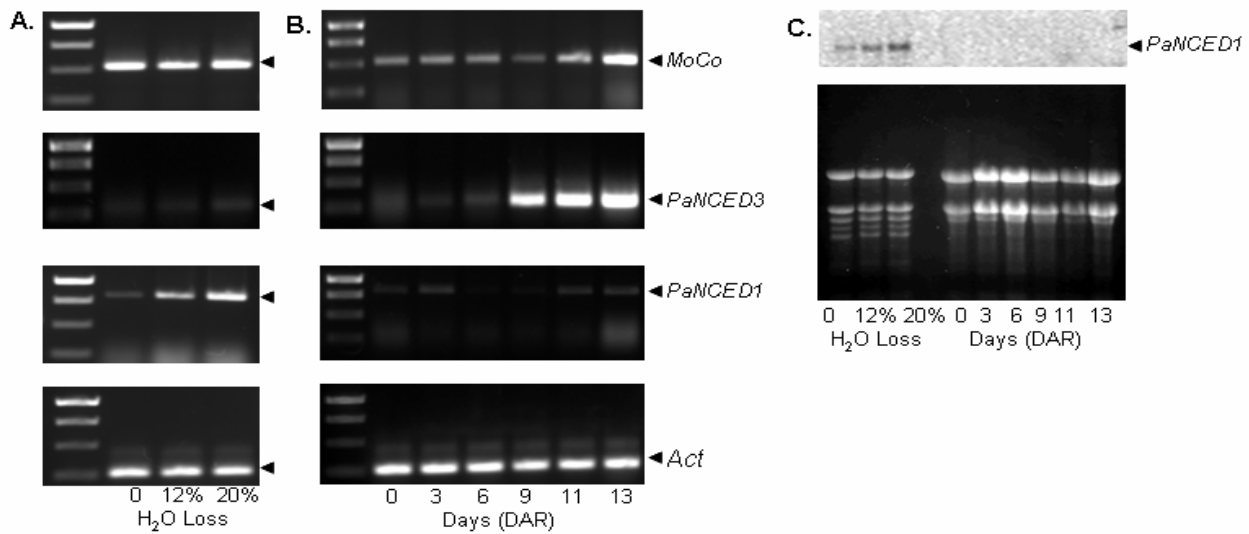
.ב

תמונה 3-א. מבנה כללי של הגן *MoCo Sulfurase* צינפי הפרמרים בהם נעשה שימוש מצוינים בחץ. **ב.** השוואת רמת ההומולוגיה בין הגן *ABA3* מארבידופסיס, הגן *Flacca* מעגבנייה והגן המקודד לנאורה ל *MoCo Sulfurase* מאבוקדו.

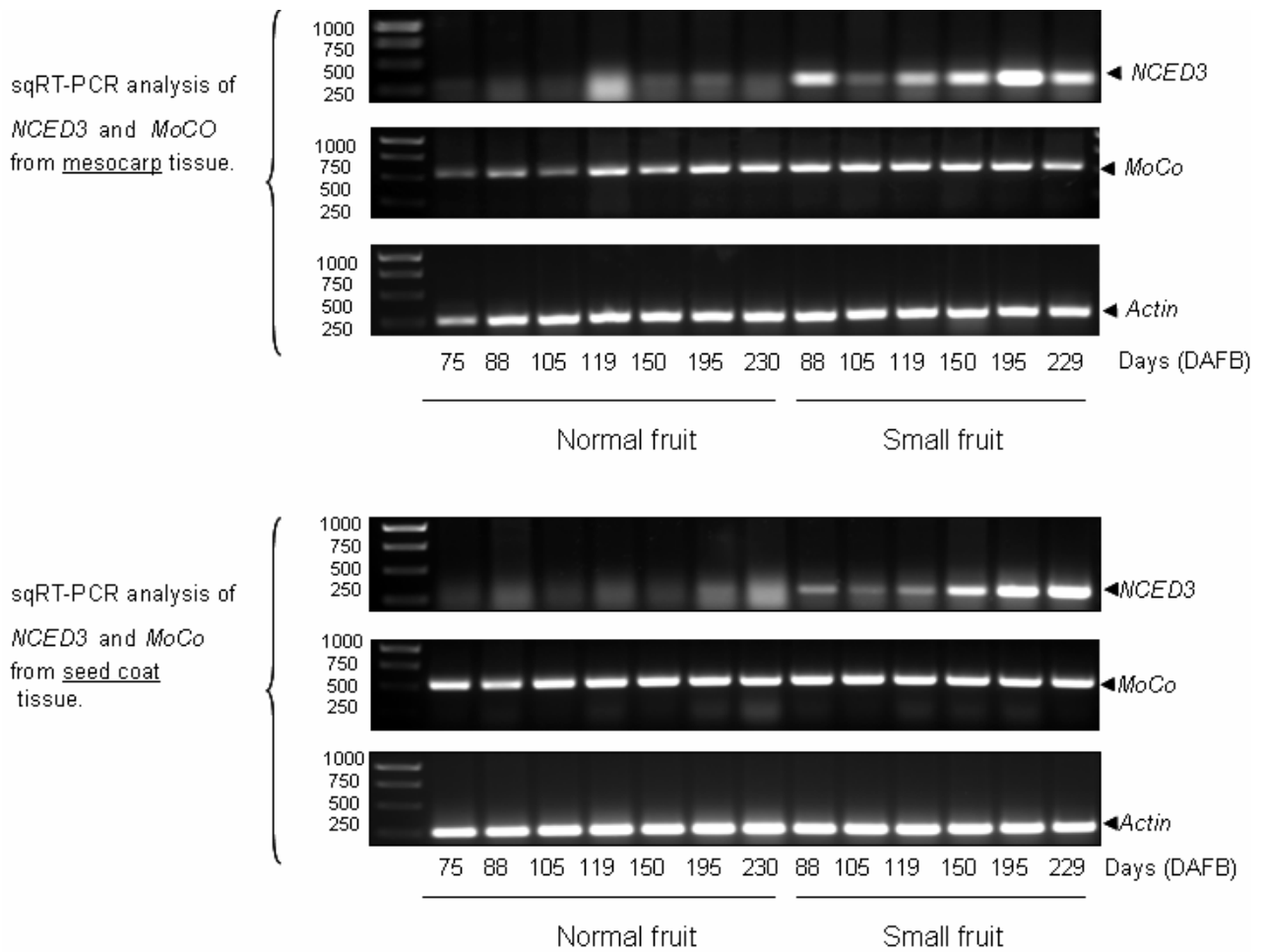


.א

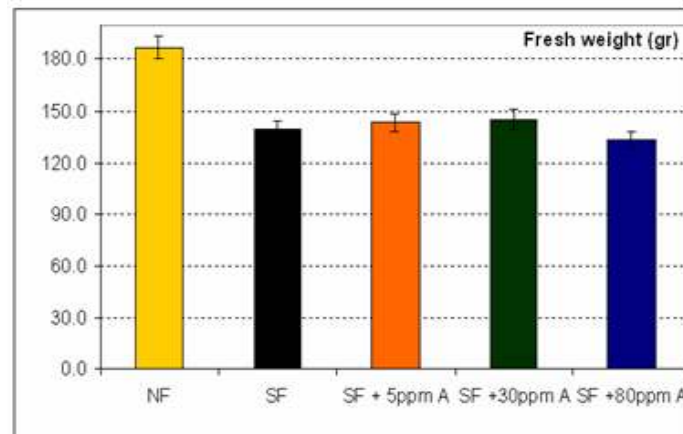
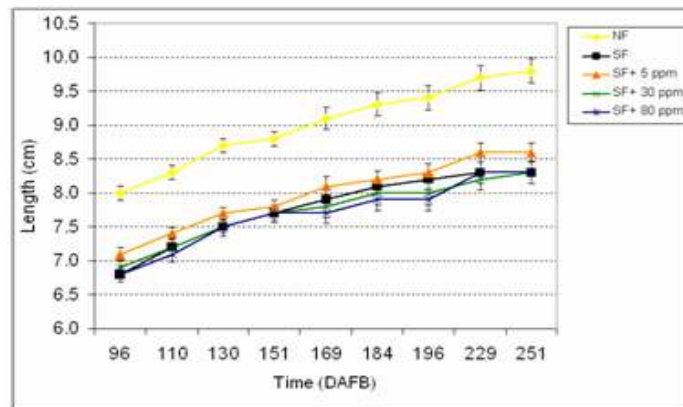
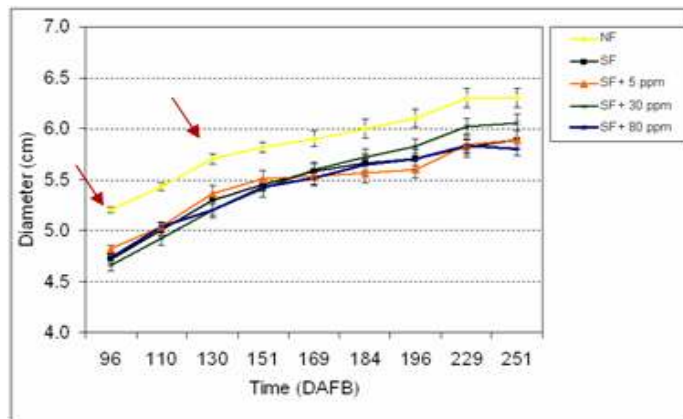
NifS-like domain containing
PLP - putative pyridoxal 5-phosphate binding motif
CC- Cysteine conserved motif
C-Domain: 5 carrier domain



תמונה 4 - דגם הביטוי של הגנים המקודדים ל *PaNCED3*, *PaNCED1* ול *MoCo Sulfurase* בעלים לפני ואחרי עקת יובש (A) ובציפת פרי במהלך ההבשלה (B,C)



תמונה 5 - דגם הביטוי של הגנים המקודדים ל *PaNCED3*, *PaNCED1* ו *MoCo Sulfurase* בציפת פרי ובקליפת זרע של פירות גדולים וקטנים במהלך התפתחות פרי.



תמונה 6 – השפעת מעכב הצימוח אנצימידול על גודל פרי באבוקדו 'האס'

NF = Normal fruit

SF = Small fruit

A= Ancymidol.

