

**לימוד בקרת תהליך יצירת רקמת ניתוק במנגו, הגורמת לנשירת
חנטים מוקדמת.**

Study of abscission zone formation and fruitlet abscission in mango

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

ע"י

ורד יריחמוביץ : 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

מאי 2010

סיוון תשס"ט

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים כן/לא

חתימת החוקר :

תקציר:

במנגו, כמו בגידולים סובטרופים נוספים (כגון אבוקדו) נשירת חנטים המתרחשת בשלבים מוקדמים לאחר ההפריה, הינה אחד הגורמים המשפיעים על הקטנת כמות היבול. במהלך תהליך זה נוצרת בין העוקץ לחנט רקמת ניתוק (ר"נ), בה עולה פעילות אנזימים מפרקי דופן. תהליך הניתוק מבוקר ע"י הורמונים שונים, ידוע כי בעוד אתילן משרה את תהליך ההתנתקות, אוקסין מעכב תהליך זה. בעבודות שנערכו במנגו נמצא קשר ישיר בין עלייה בסינטזת אתילן, בפרי המתפתח, ובין נשירת חנטים. במקביל נמצא כי נשירת חנטים, קשורה לירידה בריכוזי אוקסין בפירות המתפתחים. מספר ניסיונות רב נערך במטרה לצמצם את תופעת הנשירה אולם עד כה לא פותח פרוטוקול יעיל במידה מספקת. מחקר זה הציע ללמוד את השינויים המולקולריים המתרחשים במהלך היווצרות ר"נ בעת נשירת חנטים במנגו. בשנת המחקר החולפת התמקדנו ב - א- שיבוטם של גנים המעורבים במסלול החישה ויצירת אתילן במנגו ולימוד דגם ביטויים במהלך התפתחות ר"נ. ב - אפיון השפעת אוקסין על בקרת גנים אלו. המחקר בוצע במערכת אקספלטנטים מנותקים (ענפונים נושאי חנטים) והשריית תהליכי ניתוק בוצעה הן ע"י טיפולים באתרל והן ע"י טיפול בגז אתילן. במסגרת העבודה בשנה החולפת שיבטנו באופן מלא גן ממנגו המקודד לקולטן לאתילן מסוג ERS1. הגן מקודד לחלבון בעל 629 חומצות אמיניות (ח"א) וחולק הומולוגיה של 69-79% ברמת החלבון עם חלבוני ERS1 ממני צמחים שונים. בהתאם כונה גן זה על ידינו *MERS1*. בדיקות לבחינת דגם ביטוי הגן הן במהלך יצירת ר"נ והן במהלך הבשלת פרי מעידות כי גן זה עשוי לשחק תפקיד מרכזי בעיקר במהלך יצירת ר"נ, ולא דווקא במהלך הבשלת פרי, אולם עדין יש צורך בביסוס התוצאות הנ"ל. לצורך בחינת השפעת אוקסין על מהלך יצירת ר"נ ערכנו ניסיונות בהן בוצע טיפול מקדים בטריפטופאן, שהינו פרקורסור של אוקסין, לפני השריית תהליכי ניתוק. תוצאותינו הראו כי טיפול זה מנע במידה מסויימת נשירת חנטים אשר הושרתה ע"י אתרל הן במנגו והן באבוקדו. ההחלטה לעבוד בנושא זה במקביל גם במנגו וגם באבוקדו מנומקת בהמשך.

1. מבוא ותאור הבעיה.

בגידולים סובטרופיים רבים, נשירת פרי הינה אחד הגורמים המשפיעים על כמות היבול. במנגו, נשירת חנטים מסיבית בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרי, הינה אחד הגורמים המרכזיים המשפיעים על הקטנת כמות היבול. אומדנים במנגו מורים כי 90% מכלל הפירות החונטים נושרים, לכן, צמצום נשירת חנטים באחוזים בודדים בלבד, עשוי להשפיע באופן משמעותי על כמות היבול. הסיבות לנשירת חנטים הינן רבות ותלויות בגורמים רבים כגון אי התאם עצמי, הפלת עובר, תחרות בין פירות מתפתחים ועוד. במהלך תהליך נשירת חנטים במנגו נוצרת בין העוקץ לחנט רקמת ניתוק (ר"נ). ברקמה זו, עולה פעילות אנזימי פירוק דופן התא, הגורמים לריכוך למלת הביניים, להפרדת תאים ולהתנתקות החנט. תהליך הניתוק מבוקר ע"י הורמונים שונים, הפועלים לעיתים באופן אנטגוניסטי. לדוגמה, ידוע כי בעוד אתילן משרה את תהליך ההתנתקות, אוקסין מעכב תהליך זה. בהתאם לכך ניתן לבקר את תהליכי הנשירה על ידי יישום טכנולוגיות אגרוטכניות הכוללות שימוש בהורמונים צמחיים ו/או חומרים המזרזים או מעכבים ביוסינטזה של הורמונים שונים. בשנים האחרונות נערכו מספר ניסיונות במטרה לצמצם את תופעת נשירת החנטים במנגו על ידי ריסוס באוקסינים, במעכבי אתילן שונים ובפולימינים, אולם למיטב ידיעתנו עדין לא נמצא פתרון יעיל במידה מספקת לבעיה חקלאית זו. מאידך, הידע הקיים במנגו לגבי התהליכים המולקולריים המתרחשים במהלך הנשירה בר"נ ובחנט, אשר עשוי לתרום להבנת הבעיה, מצומצם ביותר. זאת, לעומת מידע רב הקיים לגבי התהליכים הללו בעצי פרי אחרים כגון: הדרים, תפוח ואפרסק. הבנה עמוקה יותר ברמה המולקולרית של אופן יצירת רקמת ניתוק בעת נשירת חנטים בכלל, ובמנגו בפרט, עשויה לתרום בעתיד למציאת פתרונות יעילים יותר לבעיה זו. סקירת ידע כללית, רלוונטית לחלקה של העבודה שנערכה במעבדתנו במסגרת תוכנית זו, מוצגת להלן:

שינויים ביוכימיים, ומולקולריים הקשורים ביצירת רקמת ניתוק.

התנתקות הינה חלק מתהליך התפתחותי המתרחש בשלבים שונים בחיי הצמח ובו איברים כגון: עלים, פרחים, חנטים ופירות ניתקים מצמח האם. תהליך זה חל באזור מוגדר בו נוצרת רקמת ניתוק (ר"נ) (Abscission zone). תאי רקמת הניתוק נבדלים מורפולוגית מתאים אחרים, הבדלים אלו ניתנים לזיהוי לפני תחילת תהליך ההתנתקות (1-3). תהליך ההתנתקות מלווה בשינוי במערך הפעילות של חלבונים שונים, השינוי הבולט ביותר בא לידי ביטוי בעלייה חדה ברמת הפעילות של צלולואזות β 1-4 endogluconases (EGs) ופקטינאזות polygalacturonases (PGs) הפעילות בפירוק דופן התא (4-6). כמו כן בתהליך ההתנתקות פועלים אנזימים רבים נוספים, כך לדוגמה הוצע כי חלבוני אקספנסין, הידועים בפעילותם במהלך התפתחות פרי ומהלך הבשלתו, פעילים גם כן בר"נ ותורמים לריכוך דפנות התאים בתהליך הניתוק (7-8). כמו כן, דווח על עלייה בביטוי חלבוני (PR Pathogenesis-Related Proteins) וחלבוני MT-like proteins (methallothionines) בר"נ (9-11), חלבונים אלו מתפקדים ככל הנראה כחלבוני הגנה ברקמת צמח האם הקרובה לאזור הניתוק במשך תהליך הניתוק ולאחריו.

תפקיד אתילן בתהליך הניתוק: אינטראקציות אתילן-אוקסין משחקות תפקיד מרכזי בבקרת תהליכי התנתקות. ידוע כי להורמונים אלו אפקטים אנטגוניסטיים, בעוד אוקסין מונע יצירת ר"נ, אתילן משרה תהליך זה. מקובל לחשוב כי כל עוד נמשך טרנספורט תקין של אוקסין מרקמות כגון עלים צעירים או זרעי פירות, אל עבר אזור ר"נ, נמנע תהליך הניתוק. לעומת זאת, בעקבות שינויים פיסיוולוגים כגון הזדקנות, או בעקבות תנאי עקה, עולה רמת האתילן באזור ר"נ ומושרה תהליך ההתנתקות (3,12). תפקידו המרכזי של אתילן כמשרה תהליכי התנתקות הוכח בעבודות רבות. קשר ישיר בין עלייה בסינטזת אתילן בחנטים מתפתחים ונשירתם הודגם באבוקדו אפרסק ומנגו (13-15). כמו כן, נמצא כי טיפול באתילן אקסוגני עודד/השרה תהליכי ניתוק, בעוד שימוש בחומרים המעכבים

סינטזת אתילן מנע תהליכים אלו. מחקרים רבים מורים כי לאתילן תפקיד מפתח בהשריית ביטוי גנים המקודדים לאנזימים הפעילים בתהליך הניתוק. כך לדוגמה נמצא כי ביטוי הגנים המקודדים לצלולאזות ופקטינאזות בר"נ עולה בתגובה לאתילן (16-17). כמו כן, דווח כי ביטויים של גנים נוספים באזור ר"נ, כגון גנים המקודדים לחלבוני PR, תלוי גם כן באתילן (11). הוצאתם לפועל של תהליכים המשרים יצירת ר"נ באזור הניתוק, תלויה ביכולתו של אזור זה לחוש אתילן. חישה זו תלויה בביטוי ובפעילות רצפטורים לאתילן. רצפטורים לאתילן מקודדים במספר מינים ע"י משפחות גנים, לדוגמה דווח על חמישה גנים בארבידופסיס ושישה גנים בעגבנייה המקודדים לרצפטורי אתילן שונים (18). שפעולם של התהליכים המובילים ליצירת ר"נ חל במקביל לעלייה בביטוי ובפעילות אנזימים המעורבים במסלול הסינטזה של אתילן. ככלל סינטזת אתילן תלויה בביטוי הגנים המקודדים לאנזימים - ACC synthase (ACS) ו- ACC oxidase (ACO). במחקרים שנערכו באפרסק ובתפוח הודגם קשר ישיר בין עלייה בסינטזת אתילן בר"נ, עלייה ברמת השעתוק של הגנים ACS ו- ACO ונשירת חנטים ופרי (21,22). אחד היעדים המאתגרים בחקר תהליכי התנתקות הינו זיהוי גנים המקודדים לאנזימים הפעילים בסינטזת אתילן, ו/או לרצפטור לאתילן המבוטאים באופן דיפרנציאלי בר"נ של עלה או של פרי. מידע זה עשוי להיות בעל ערך חקלאי ועשוי לאפשר בעתיד מניפולציה של תזמון תהליך הניתוק או השריית/מניעת תהליך זה ברקמות מסוימות.

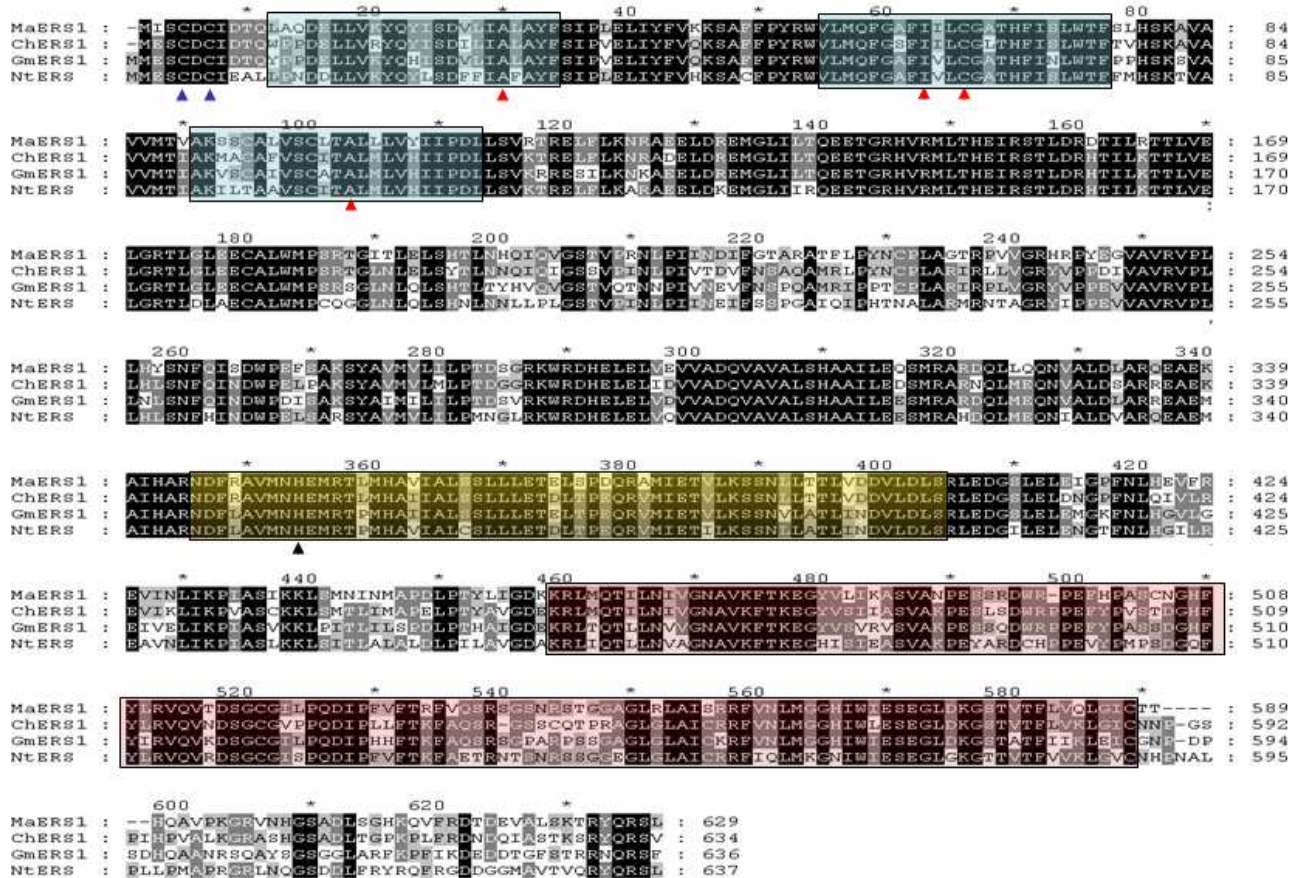
נשירת חנטים ויצירת ר"נ בעת נשירת חנטים במנגו - למרות חנטה מרובה במנגו, אחוז הפרי הנותר עד להבשלה נמוך. תהליכי נשירה מתרחשים במהלך כל תקופת התפתחות הפרי, אולם נשירת חנטים מסיבית בשלבים מוקדמים (4-3 שבועות) לאחר ההפריה, הינה הגורם המרכזי המשפיע על הקטנת כמות היבול (23-24). ידוע כי עוצמת נשירת החנטים במנגו משתנה מזון לזון, השונות הקיימת בין זני המנגו מורה כי מרכיב גנטי עשוי להשפיע על תהליך הנשירה. בארץ תופעה זו מהווה בעיקר בעיה חקלאית בזנים 'קית' ('Keitt'), 'קנט' ('Kent') ו'מאיה' ('Maya') (מיכאל נוי - דיווח אישי). מספר היבטים הקשורים לתופעת נשירת חנטים במנגו נחקרו בשנים האחרונות. בעבודות שנערכו בזנים: 'טומי-אטקינס' ו-'קנט' נמצא קשר ישיר בין עלייה בסינטזת אתילן, בפרי המתפתח, ובין נשירת חנטים (15). במקביל נמצא כי נשירת חנטים מוגברת, קשורה בירידה בריכוזי אוקסין בפירות המתפתחים (24). כאמור, הידע הקיים לגבי התהליכים המולקולריים המתרחשים במנגו במהלך הנשירה בר"נ ובחנט מצומצם ביותר. עד כה שובטו במנגו מספר ESTs המקודדים ל כאורה ל- ACC oxidase ו- ACC synthase, ביטויים של ESTs אלו נחקר בעיקר בהקשר לתהליך הבשלת פרי, אולם אין מידע לגבי תפקודם בתהליכי ניתוק. בנוסף, שובט ממנגו הגן *METRI* המקודד לרצפטור לאתילן. גן זה הינו הומולוגי לרצפטור *ETRI* מעגבנייה, ונמצא, כי כמו בעגבנייה גם במנגו רמת הביטוי של הגן עולה במהלך הבשלת פרי ובעקבות פציעה (25). תוצאות אנליזת Southern מורות כי ככל הנראה קיימים במנגו גנים נוספים המקודדים לרצפטורים לאתילן. למיטב ידיעתנו לא נחקר תפקיד רצפטור *METRI* בתהליכי ניתוק וכמו כן לא זוהו במנגו גנים נוספים המקודדים לרצפטור לאתילן.

2. מטרות המחקר: הצורך במניעת נשירת חנטים ובהעלאת ייבול, הינו אחד מהיעדים המרכזיים בענף המנגו. מספר לא מבוטל של מחקרים נערך עד כה, בארץ ובעולם, בכדי לנסות לפתור בעיה חקלאית זו ע"י יישום חומרי צמיחה ומעכבים שונים. לעומת זאת, באופן מפתיע, הידע אודות התהליכים המולקולריים המבקרים את תהליך הניתוק ונשירת החנטים במנגו, אשר עשוי לתרום להבנת הבעיה, הינו מועט. מחקר זה הציע להתמקד בלימוד תהליכים המולקולריים המבקרים את יצירת ר"נ בעת נשירת חנטים במנגו, נושא שעד כה לא נחקר. מטרות היעד לשנת המחקר הנוכחית היו א. המשך שיבוטם של גנים המעורבים במסלול החישה והיצירה של אתילן ממנגו ולימוד דגם

שעתוקם במהלך התפתחות ר"נ בעת נשירת חנטים. ב- אפיון השפעת אוקסין על בקרת גנים אלו ועל תהליך היווצרות ר"נ במגו.

3. פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות (אפריל 2009 - אפריל 2010):

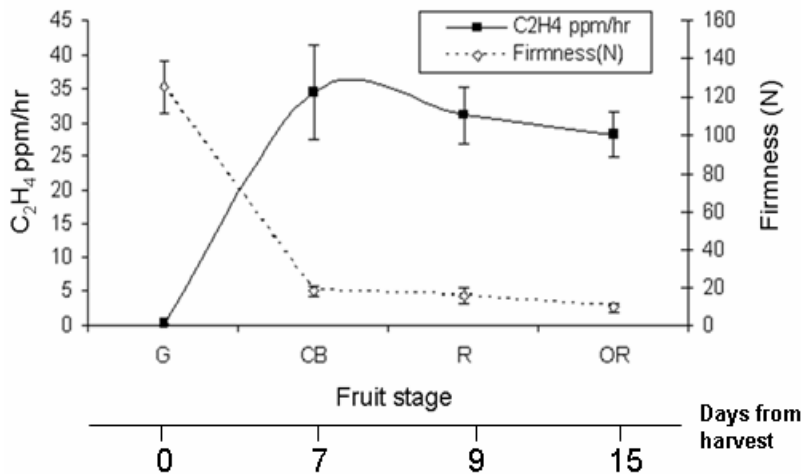
א- שיבוט מלא של גן ממגו המקודד לרצפטור לאתילן מסוג ERS1: חלבונים המתפקדים כקולטנים (רצפטורים) לאתילן הינם חלבונים ממברנלים בהם מצויי אתר הקישור לאתילן בקצה ה-N טרמינלי של החלבון ואילו בקצהו הקרובוקסילי של החלבון מצויים שני דומיניים עיקריים: דומין המתפקד כ"סנסור" בעל פעילות עצמית של היסטידין קינאז ודומין המתפקד כ"קבל" receiver, המבקר את העברת הסיגנל הלאה. ככלל, הרצפטורים לאתילן מקודדים ע"י משפחת גנים הנחלקת לשתי משפחות: רצפטורים דמויי ETR1 ורצפטורים דמויי ETR2 בעלי מבנה היסטידין קינאז דגנרטיבי. ERS1, הינו רצפטור לאתילן הנמנה על משפחת רצפטורים דמויי ETR1, חלבון זה נבדל מ-ETR1 מכיוון שאינו מכיל את אזור ה-receiver. בעבודות שנערכו במיני צמחים שונים נמצא כי ל-ERS1 תפקיד בקרתי הן בתהליכי ניתוק והן בתהליכי הבשלה. כאמור, עד כה שובט ממגו הגן METR1 המקודד לרצפטור לאתילן ונמצא כי רמת ביטוי עולה במהלך הבשלת פרי ובעקבות פציעה (25). אין מידע לגבי דגם ביטוי ותפקידו האפשרי בתהליכי ניתוק. גנים נוספים ממגו המקודדים לרצפטורים לאתילן עדין לא רוצפו במלואם ולא אופיינו. בכדי לנסות ולהתחקות אחר רצפטורים נוספים לאתילן ערכנו חיפוש במאגר NCBI, חיפוש זה הוביל למציאת EST יחיד ממגו, המקודד למקטע חלבון המראה הומולוגיה לרצפטור לאתילן. בשנה שעברה דיווחנו כי הגברנו מקטע EST זה מ- cDNA והשלמנו באופן חלקי את ריצוף הגן בשיטת 3'RACE. במהלך שנה זו הושלם ריצוף הגן השלם ע"י 5'RACE



איור מס' 1 - השוואת חלבון MaERS1 עם חלבוני ERS1 ממספר מינים. דומינים שמורים HisKA ו HATPase ואזורים חוצי ממבתה מסומנים בוורוד, צהוב ותכלת בהתאם. חומצת האמינו שמורות מסומנת בראש חץ.

הגן השלם ששובט על ידינו מקודד לחלבון בעל 629 חומצות אמיניות (ח"א) וחולק הומולוגיה של 69-79% ברמת החלבון עם חלבוני ERS1 ממיינים שונים (איור 1). אנליזות פילוגנטיות שערכנו אימתו גם הן את זהות הגנים (לא מוצג), בהתאם גן זה כונה על ידינו *MERS1 (Mangifera ERS1)*. כפי שניתן לראות באיור 1 חלבון ה ERS1 ממנו מכיל בקצה ה-C טרמינלי את הדומינים His Kinase ו HATPase המאפיינים רצפטורים לאתילן ובקצהו ה-N טרמינלי שלושה אזורים הידרופובים אשר מהווים לכאורה אזורים חוצי ממברנה. כמו כן החלבון מכיל את ח"א השמורות C4 ו C6 הנחוצות לצורך קישור דיסולפידי ויצירת חלבון דימרי; ח"א A31, I62, C65, A102 ו הדרושות לפעילות תקינה של החלבון, וח"א השמורה H354 העוברת אוטופוספורילציה.

ב- איפיון דגם הביטוי של MERS1 במהלך הבשלת פרי ובמהלך יצירת ר"נ. לצורך השראת תהליכי ניתוק בוצעו בשנת המחקר הראשונה ניסויים במערכת אקספלטטים מנותקים (ענפונים נושאי חנטים) מהזן 'קייט'. הענפונים טופלו ע"י ריסוס בריכוזי אתרל שונים (0.1-0.3%) בשילוב עם Triton-X (0.05 %). נמצא כי הטיפול באתרל (0.3%) היה האפקטיבי ביותר בהשריית ניתוק חנטים. בבדיקות ראשוניות שערכנו מצאנו כי לאחר הטיפול באתרל חלה עלייה בביטוי הגנים המקודדים לרצפטור לאתילן: *MERS1* ו *METRI* 24 ש' לאחר הטיפול באתרל, הן באזור ר"נ (AZ), באזור הסמוך לר"נ (NAZ) ובזרעי החנטים, במקביל לעלייה בביטוי *MACS1* ו *MACS2* (ראה דו"ח קודם).



איור מס' 2 - ייצור אתילן והתרככות פרי בפירות מנגו מהזן "קנט" במשך 15 יום ב-20 מ"צ. התוצאות הן ממוצעים של שישה פירות בכל נקודת זמן.
G- green; CB- color break; R-ripen; OR-over ripe

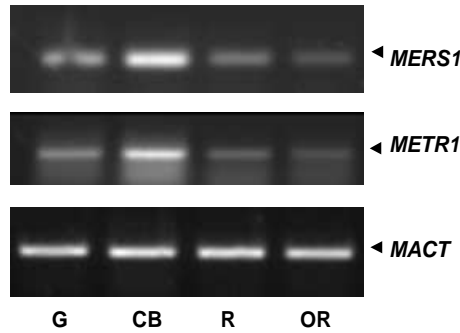
בהמשך, בשנה זו, בכדי להרחיב את התמונה לגבי אופן ביטוי *MERS1*, בדקנו את דגם ביטוי הגן גם במהלך הבשלת פרי. לצורך הבדיקה נקטפו פירות מעצי מנגו מהזנים "קייט" ו"קנט" ואוחסנו ב-20 מ"צ לפרקי זמן שונים. ייצור האתילן ומידת התרככות הפירות נבדקו בפרקי זמן שונים לאחר קטיף. בדיקת ייצור אתילן נערכה בפרות בודדים. כל פרי נאטם למשך שעה בצננות של 5 ליטר. גז האתילן נדגם בעזרת מזרק ונבדק בגז כרומטוגרף. כפי שניתן לראות באיור 2, הפירות מהזן "קנט" הגיעו לרמת התרככות כמעט מלאה

בשלב שבירת הצבע (CB), שבעה ימים לאחר קטיף. במקביל, נמדדה עלייה קלימקטרית ברמת ייצור האתילן בפרק זמן זה. בדיקות בזן "קייט" הראו וראיביליות גדולה ברמת ייצור האתילן במדגם (לא מוצג) ולכן המשכנו באפיון מולקולרי של פירות מזן "קנט" בלבד.

בדיקת ביטוי הגנים המקודדים לרצפטור לאתילן *ERS1* ו *ETR1* נבדקה תחילה ע"י אנליזות sq-RT-PCR. אנליזות ביטוי הגן ברקמת הציפה של הפירות שנדגמו הראתה ביטוי כמעט קונסטיטויבי של שני הגנים עם עלייה מתונה בביטויים בשלב CB וירידה מסויימת, או חזרה לרמה בזלית, לאחר מכן. תוצאות דומות הושגו כאשר האנליזה בוצעה בזרעי הפירות (לא מוצג)

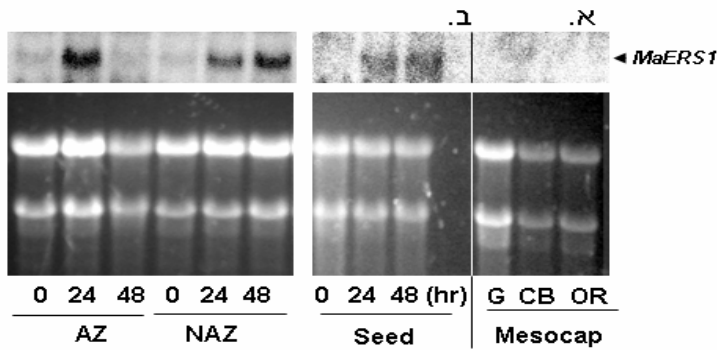
איור מס' 3 - אנליזת sq-RT-PCR לאפיון ביטוי הגנים *MERS1* ו-*METR1* בציפת פירות מהזן "קנט" בשלבים שונים לאחר קטיף. cDNA אשר סונטז מ RNA שהופק מציפת הפרי, שימש להגברת מקטעי הגנים *METR1* ו-*MERS1* ע"י 30 מחזורי PCR ולהגברת מקטע הגן *MACT* ע"י 25 מחזורי PCR.

G- green; CB- color break;
R-ripen; OR-over ripe



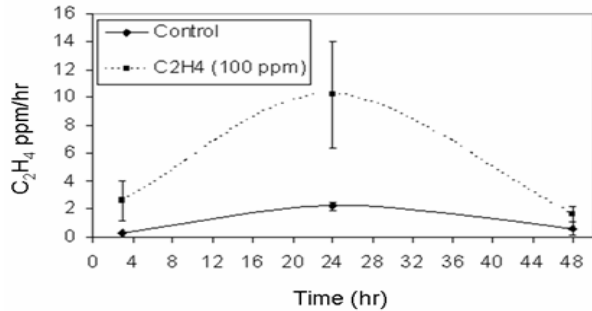
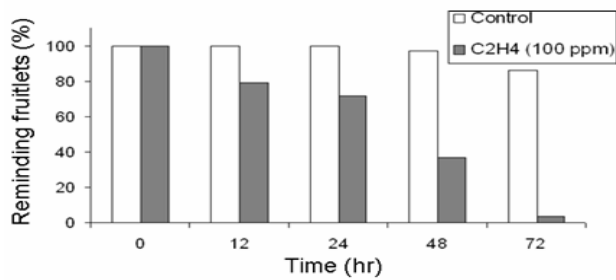
בהמשך ערכנו גם אנליזת Northern לבדיקת ביטוי *MERS1* ברקמת הציפה של הפירות, בזמנים שונים לאחר קטיף, ע"י שימוש בפרוב ספציפי מקצה ה-3'UTR של הגן. כביקורת, באותה ממברנה הוספו דוגמאות מאזור ר"נ (AZ), מהאזור הסמוך לר"נ (NAZ) ומזרעי החנטים, לפני ואחרי השראת ניתוק ע"י אתרל (ראה דו"ח קודם). להפתעתנו התוצאות שקיבלנו באנליזה זו לא תאמו לתוצאות אנליזת ה-sq-RT-PCR המודגמת באיור 3. כפי שניתן ביטוי של

MERS1 עלה בצורה חדה הן באזור ר"נ, הן באזור הסמוך לרקמת הניתוק ובמידה מסויימת גם כן ברקמת הזרע של החנטים לאחר הטיפול באתרל (איור 4). אולם, לא נצפתה כלל עלייה ברמת ה-mRNA עבור *MERS1* במהלך הבשלת פרי. מכיוון שתוצאות אנליזות ה-Northern מספקות אינפורמציה רבה יותר אנו עורכים חזרות נוספות בכדי לבסס או לסתור תוצאות אלו.



איור מס' 4 - אנליזת Northern לאפיון ביטוי הגן *MERS1* ברקמת הציפה בשלבים שונים לאחר קטיף (א) ובאזור ר"נ באזור הסמוך לר"נ, ובזרעי חנטים לפני ואחרי טיפול באתרל (ב)

ג- השריית ניתוק חנטים ע"י טיפול באתילן. כאמור שלבי עבודה הראשוניים שביצענו בשנה החולפת איפשרו קביעת תנאי טיפול אופטימלים לצורך השריית תהליכי ניתוק ע"י ריסוס באתרל. אתרל הינו חומר אשר לאחר קליטתו ע"י הצמח מתפרק לאתילן, חומצה הידרוכלורית ולפוספאט. האתילן המופרש, לאחר פירוק האתרל, עשוי להשרות תהליכי ניתוק ואמנם מתוצאות הניסויים שערכנו ניתן היה להסיק כי הטיפול באתרל הינו אפקטיבי לצורך השריית ר"נ במערכת האקפלנטים. ברם, אחת הבעיות בשימוש באתרל בניסויים כגון אלו, הינה העובדה כי הוא ממשיך להתפרק לאורך זמן ולכן מדידות אתילן לאחר טיפול אינן משקפות בהכרח יצירת אתילן אנדוגני. בכדי להתגבר על מכשול זה ובכדי לבדוק קורלציה בין עלייה בביטוי אתילן אנדוגני (הנוצר ע"י החנטים) וביטוי גנים המשתתפים בסינטזת אתילן ובקליטתו במהלך יצירת ר"נ, ערכנו ניסויים במתכונת שונה. במסגרת זו הזרקנו אתילן (100 ppm) למערכת סגורה שבה הושמו ענפונים נושאי חנטים מהזן 'קנט'. לאחר 12 ש' באווירה רוויות אתילן הועברו הענפונים לחדר אחסון, נקודת זמן זו הוגדרה כזמן אפס. בדיקות אינדקס הצמדות חנטים וקביעת רמת האתילן אנדוגני, המופרש ע"י החנטים, בוצעו בהמשך. בדיקות ייצור אתילן נערכו בענפונים בודדים נושאי חנטים, כל ענפון נאטם למשך שעה בצננות קטנות (0.5 ליטר) וגז האתילן נבדק בגז כרומטוגרף. התוצאות מוצגות באיור 5. כפי שניתן לראות, טיפול בגז אתילן גרם לניתוק מסיבי של חנטים (98%) לעומת ביקורת 72 ש' לאחר הטיפול. במקביל, נצפתה



איור מס' 5 – א. השפעת טיפול באתילן (100 ppm) על נשירת חנטים. מספר החנטים הנותרים מוצג באחוזים מתוך כלל המדגם (50-70 ענפים נושאי חנטים בביקורת ובטיפול באתילן). **ב.** ייצור אתילן בענפים נושאי חנטים בזמנים שונים לאחר הטיפול באתילן ובענפוני ביקורת. התוצאות הן ממוצעים ושגיאות תקן של שישה ענפים בכל נקודת זמן.

א.

עלייה ברמת האתילן האנדוגני, המופרש ע"י החנטים, 24 ש' לאחר טיפול. במערכת הביקורת לא חלו שינויים מובהקים ברמת האתילן האנדוגני המופרש. לאחר העמדת מערכת הניסוי החדשה הועמד ניסוי במתכונת דומה בקנה מידה גדול שכלל כ- 250 ענפים נושאי חנטים (בביקורת ובטיפול). מניסוי זה דגמנו בזמן אפס לאחר 24 ו 48 ש', רקמות מאזור ר"נ (AZ), ומרקמת הציפה והזרע של החנטים. הרקמות הוקפאו בחנקן נוזלי ושימשו להפקת RNA.

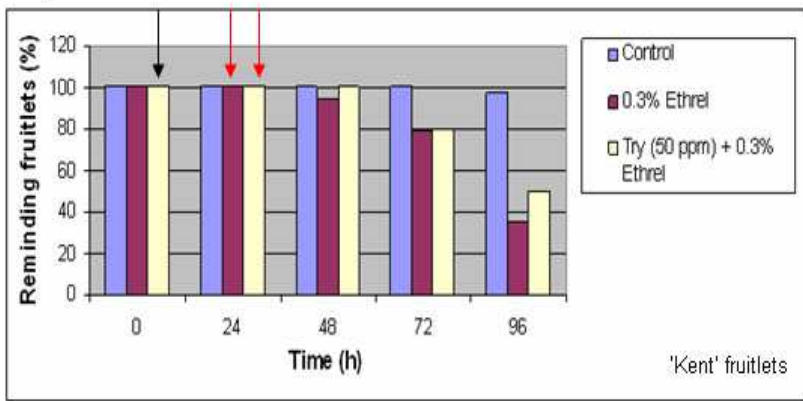
ב.

RNA שהופק מאותן דוגמאות, היה אמור לשמש לבדיקת ביטויים של הגנים המקודדים לקולטני אתילן ושל ההגנים המשתתפים בסינטזת אתילן, באנליזת ב real-time PCR. בשל בעיות טכניות אין בידינו תוצאות מאותן בדיקות ואנו חוזרים כעת על הבדיקות.

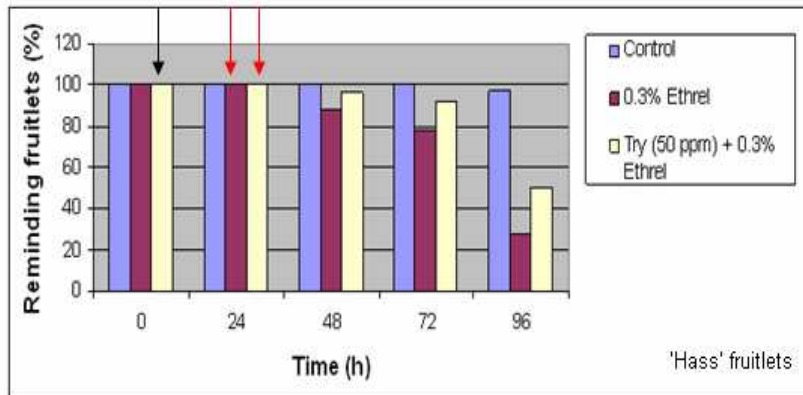
ד. אפיון השפעת אוקסין על תהליך היווצרות ר"נ במנגו ובאבוקדו – העמדת מערכת המחקר

לצורך לימוד השפעת אוקסין על תהליך היווצרות ר"נ במנגו, הצענו בתוכנית המחקר המקורית לרסס ענפים נושאי חנטים באוקסין סינטטי (בתכשיר המסחרי הדרונל) או לחילופין בטרפטופן, חומצה אמינית המהווה פרקוסור לאוקסין. יש לציין כי לאחרונה דווח על שימוש בטרפטופאן לצורך מניעת נשירת חנטים ו/או לצורך הגדלת פרי וייבול במספר גידולים חקלאיים. כמו כן, כאן המקום לציין כי בעבודת מחקר אשר אנחנו מבצעים באבוקדו 'האסי' (במסגרת תוכנית מדען 203-0708) מצאנו כי יישום טריפטופאן בסוף פריחה הראה אפקט בולט (ברכיזים של 20, 50, 80 ח"מ), השפיע באופן חיובי וגרם לעלייה ברמת הייבול. תוצאות הניסויי שביצענו באבוקדו הצביעו על כך שהגדלת היבול לאחר יישום טריפטופאן לא חלה כתוצאה מהגדלת גודל הפירות, כי אם כתוצאה ממניעת נשירת חנטים מיד לאחר פריחה. בעקבות ממצאים חיובים אלו, החלטנו להתמקד בבחינת השפעת טיפולי טריפטופאן ברכיזים שונים על נשירת חנטים ועל תהליך היווצרות ר"נ גם במנגו. הניסויים בוצעו בהיקף מצומצם במערכת אקפלנטים מנותקים מהזן "קנט". במקביל העמדנו מערכת ניסוי באבוקדו באקפלנטים מנותקים מהזן "האסי". הניסויים בוצעו באופן הבא: בחלק מהענפים נושאי החנטים בוצע ריסוס מקדים בטרפטופאן (50 ppm) ולאחר 24 ש' רוססו הענפים באתרל בכדי להשרות תהליכי ניתוק. ענפים נושאי חנטים אשר לא רוססו כלל (לא בטרפטופאן ולא באתרל) שימשו כ"מערכת ביקורת פנימית". בכדי לקבוע את מדד הצמדות החנטים, נספרו החנטים הנותרים על הענפים. באיור 6 מוצגות תוצאות הניסוי.

Tryptophan pre-treatment Ethrel treatment



א.



ב.

איור מס' 6 - א. השפעת טיפול מקדים בטריטופאן (50 ppm) על נשירת חנטים המושרית ע"י אתרל (0.3%) במנגו מזן 'קנט' (א) ובאבוקדו מזן 'האס' (ב).
 הניסוי בוצע במערכת אקספלנטים מנותקים שכללה 50-70 ענפונים נושאי חנטים לטיפול.

כפי שניתן לראות, טיפולי הטריטופאן המקדים מנעו במידה מסויימת נשירת חנטים אשר הושרתה ע"י אתרל. 96 ש' לאחר הטיפול המקדים בטריטופאן נמדדו 50% נשירה לעומת 35% נשירת חנטים במנגו, ו 50% נשירה לעומת 27% באבוקדו.

בטיפול ה"ביקורת" נשירת החנטים לאחר 96 ש' הייתה נמוכה ביותר (>5%) ומכאן ניתן להסיק כי השפעת קטיף הענפונים מהעץ על השריית יצירת ר"נ הייתה זניחה. בימים אלו אנו מבצעים ניסויים במתכונת דומה, בקנה מידה גדול יותר, המלווים בדגימת רקמות מאזור ר"נ (AZ), ומרקמת הציפה והזרע של החנטים.

4. דיון וכיווני עבודה עתידיים המתכוננים לעונה הבאה

א- לימוד דגם השעתוק של גן ממנגו המקודד לקולטן לאתילן מסוג ERS1 במהלך התפתחות ר"נ בעת נשירת חנטים: אנו מדווחים כאן על שיבוטו המלא של גן ממנגו (*MERS1*) החולק הומולוגיה גבוהה עם גנים המקודדים לקולטן לאתילן מסוג ERS1 במיני צמחים שונים. בכדי לבדוק את הארגון הגנומי של *MERS1* הוגבר הגן מדנ"א שהופק מעלים באמצעות פרימרים מקצה 3' וקצה 5'. אנו מסיימים כעת את ריצוף האינטרונים והאקסונים שבגן ובהמשך נבצע אנליזת Southern בכדי לקבוע האם הגן מופיע כעותק יחיד או כנציג של משפחת גנים. כמצויין במבוא, על פי הספרות לגן זה תפקיד בקרתי הן בהשריית תהליכי ניתוק והן במהלך הבשלת פרי. אנליזות קודמות שערכנו הראו כי לאחר טיפול באתרל התעתק של גן זה ושל גן נוסף המשמש כקולטן לאתילן (*METR1*), עולים לאחר הטיפול באתרל הן באזור ר"נ, באזור הסמוך לרקמת הניתוק ובזרעי החנטים. ממצאים אלו מרמזים כי לשני הרצפטורים תפקיד בקרתי בהשריית תהליך ניתוק במנגו בעת נשירת חנטים.

על פי הספרות, רצפטורים לאתילן פועלים כהומודימרים (ETR1:ETR1 לדוגמה) אשר בהעדר אתילן נמצאים במצב "אקטיבי" (18). מצב זה גורר זרחון של חלבון דמויי Raf-kinase המכונה CTR1 הפועל כבקר שלילי של תגובות לאתילן. קישור אתילן לרצפטורים מונע את פעילות הרצפטורים ואת פעילות CTR1 וע"י כך מתאפשרת התגובה האופיינית לאתילן. באופן מעניין, בעבודה שנערכה לאחרונה בארבידופסיס דווח כי רצפטורים לאתילן עשויים לפעול גם כן כהטרודימרים (לדוגמה ETR1:ERS1) (26), ממצא זה עשוי להסביר את הצורך בביטויים של מספר גנים

המקודדים לרצפטורים לאתילן, בהשריית יצירת ר"נ. בכדי להרחיב את התמונה לגבי אופן פעילותו של ERS1 בדקנו גם כן את אופן ביטוי הגן במהלך הבשלת פרי. התוצאות שקיבלנו ע"י אנליזת sq-RT-PCR הראו ביטוי כמעט קונסטיטוטיבי של *MERS1* עם עלייה מתונה בשלב שבירת הצבע, שלב בו נמדדה עלייה ברמת האתילן המופרש ע"י הפרי. מאידך תוצאות אנליזת Northern הראו תמונה שונה, לפי אנליזה זו, רמת הגן המקודד ל *MERS1* אינה עולה במהלך הבשלת פרי, זאת לעומת עלייה ניכרת בבטוי הגן בר"נ לאחר השראת תהליכי ניתוק ע"י אתרל. התוצאות שהתקבלו באנליזת Northern יכולות להצביע על ביטוי דיפרנציאלי של *MERS1* במהלך יצירת ר"נ ובמהלך הבשלה, אולם יש לערוך ביקורת נוספות הכוללת נרמול התגובה עם פרוב כנגד 18srRNA והגבה עם פרוב כנגד *METR1*, אשר ידוע כי ביטוי עולה במהלך הבשלת פרי. אנו עורכים אנליזות אלו בימים אלו.

ב- השריית ניתוק חנטים ע"י טיפול באתילן. בכדי לבדוק קורלציה בין עלייה בביטוי אתילן אנדוגני (הנוצר ע"י החנטים) וביטוי גנים המשתתפים בסינטזת אתילן ובקליטתו במהלך יצירת ר"נ הושרו תהליכי ניתוק במערכת של אקספלטנטים מבודדים ע"י טיפול באתילן (ולא באתרל). טיפול ב- 100 ppm אתילן נמצא אפקטיבי בהשריית תהליכי ניתוק. בדיקות אתילן שערכנו עומדות בקנה אחד עם תוצאות שפורסמו בספרות (15) המורות כי לאחר טיפול באתילן חיצוני, חלה עלייה בהפרשת אתילן מחנטי הפרי המובילה להשראת תהליכי ניתוק חנטים. כאמור, בשל בעיות טכניות עדין אין בידינו תוצאות של אנליזת דגם הביטוי של הגנים המקודדים ל *MERS1*, *METR1* ולגנים המקודדים ל-ASC 1-2 במערכת זו ואנו מקווים כי במשך השנה נשלים אנליזה זו.

ג- שיבוט גנים נוספים ממנגו המשתתפים בהעברת סיגנל האתילן. ניסנו לשבט ע"י שימוש בפרימרים דגנרטיביים גנים נוספים ממנגו המשתתפים בהעברת סיגנל האתילן כגון גן המקודד ל *CTR1*, ניסיונות אלו לא צלחו. כמו כן לא הצלחנו לשבט מקטע גן המקודד ל-ACO. ניסיונות לשיבוטם של גנים אלו ימשיכו בשנה הבאה. אנו מודעים לכך כי חוסר ההצלחה בשיבוט גנים אלו מעכב את הבנת התמונה הכללית.

ד. אפיון השפעת אוקסין על תהליך היווצרות ר"נ במנגו ובאבוקדו – העמדת מערכת המחקר. כפי שצויין במבוא ידוע כי בעוד אתילן משרה את תהליך ההתנתקות, אוקסין מעכב תהליך זה. בהתאם, בניסוי שערכנו במנגו מהזן 'קנט', הראנו כי טיפול מקדים בטרופטופאן, פרקוסור של אוקסין, מנע במידה מסויימת נשירת חנטים אשר הושרתה ע"י אתרל. אפקט דומה ואף דומיננטי יותר נמצא כאשר הניסוי בוצע במערכת של אקספלטנטים מנותקים באבוקדו מזן 'האסי' (איור 6). אנו מבצעים כעת ניסויים במתכונת דומה, בקנה מידה גדול יותר, המלווים בדגימת רקמות מאזור ר"נ (AZ), ומרקמת הציפה והזרע של החנטים. הניסויים ייערכו במקביל גם במנגו וגם באבוקדו. ההחלטה לעבור ולעבוד בנושא זה במקביל גם כן באבוקדו התבצעה בשל העובדות הבאות: **א.** גם באבוקדו כמו במנגו נמצא קשר ישיר בין עלייה בסינטזת אתילן, בפרי המתפתח, ובין נשירת חנטים (13, 15) **ב.** בניגוד למצב הקיים במנגו, הגנים המעורבים בסינטזת אתילן והגנים הקשורים במעבר האותות באבוקדו ידועים ואין צורך לשבטם תחילה **ג.** דגם ביטויים של גנים אלו נחקר באופן מקיף בשנים האחרונות בפרי אבוקדו במהלך הבשלה במעבדתה של ד"ר עדנה פסיס (27-28), אולם אין מידע לגבי אופן ביטויים ביצירת ר"נ בנשירת חנטים. אנו סבורים כי החלטה זו תאפשר להעמיק את הידע אודות בקרת תהליכי יצירת ר"נ הגורמת לנשירת חנטים מוקדמת בגידולים סובטרופים.

- 1- Bonghi C, Ramina A** (2000) Biochemical and molecular aspects of fruitlet abscission. *Plant Growth Regulation* **31**: 35-42.
- 2- Roberts JA, Elliott KA, Gonzalez-Carranza ZH** (2002) Abscission, dehiscence, and other cell separation processes. *Annu Rev Plant Biol* **53**: 131-158.
- 3- Taylor JE, Whitelaw CA** (2001) Signals in abscission. *New Phytologist* **151**: 323-339.
- 4- Greenberg J, Goren R, Riov J** (1975) The role of cellulase and polygalacturonase in abscission of young and mature Shamouti orange fruit. *Plant Physiol* **34**: 1-7.
- 5- Pandita VK, Jindal KK** (1991) Enzymatic and anatomical changes in abscission zone cells of apple fruit induced by etephon. *Biol. Plant* **33**: 20-25.
- 6- Bonghi C, Rascio N, Ramina A, Casadoro G** (1992) Cellulase and polygalacturonase involvement in the abscission of leaf and fruit explants of peach. *Plant Mol Biol* **20**: 839-848.
- 7- Cho HT, Cosgrove DJ** (2000) Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9783-9788.
- 8- Belfield EJ, Ruperti B, Roberts JA McQueen-Mason S** (2005) Changes in expansin activity and gene expression during ethylene-promoted leaflet abscission in *Sambucus nigra*. *J Exp Bot* **56**: 817-823.
- 9- Coupe SA, Taylor JE Roberts JA** (1995) Characterization of an mRNA encoding a metallothionein-like protein that accumulates during ethylene-promoted abscission of *Sambucus nigra L.* leaflets. *Planta* **197**: 442-447.
- 10- Ruperti B, Cattivelli L, Pagni S, Ramina A** (2002) Ethylene-responsive genes are differentially regulated during abscission, organ senescence and wounding in peach (*Prunus persica*). *J Exp Bot* **53**: 429-437.
- 11- Eyal Y, Meller Y, Lev-Yadun S, Fluhr R** (1993) A basic-type PR-1 promoter directs ethylene responsiveness, vascular and abscission zone-specific expression. *Plant J* **4**: 225-234.
- 12- Sexton R, Roberts JA** (1982) Cell biology of abscission. *Annu Rev Plant Physiol* **33**: 133-162.
- 13- Davenport TL, Manners M** (1983) Nucellar senescence and ethylene production as they related to avocado fruitlet abscission. *J Exp Bot* **33**: 815-825.
- 14- Miller AN, Krizek BA, Walsh CS** (1988) Whole fruit ethylene evolution and ACC content. *J Amer Soc Hort Sci* **113**: 119-124.
- 15- Nunez-Elisea R, Davenport TL** Mango fruitlets abscission as influenced by enhanced ethylene biosynthesis. *Plant Physiol* **82**: 991-994.

- 16 - Kalaitzis P, Solomos T, Tucker ML** (1997) Three different polygalacturonases are expressed in tomato leaf and flower abscission, each with a different temporal expression pattern. *Plant Physiol* **113**: 1303-1308.
- 17- del Campillo E, Bennett AB** (1996) Pedicel breakstrength and cellulase gene expression during tomato flower abscission. *Plant Physiol* **111**: 813-820.
- 18 -Wang KL, Li H, Ecker JR** (2002) Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell S*: 131-151
- 19- Payton S, Fray RG, Brown S, Grierson D** (1996) Ethylene receptor expression is regulated during fruit ripening, flower senescence and abscission. *Plant Mol Biol* **217**: 131-137.
- 20- Rasori A, Ruperti B, Bonghi C, Tonutti P, Ramina A** (2002) Characterization of two putative ethylene receptor genes expressed during peach fruit development and abscission. *J Exp Bot* **53**: 2333-2339.
- 21- Dal Cin V, Danesin M, Boschetti A, Dorigoni A, Ramina A** (2005) Ethylene biosynthesis and perception in apple fruitlet abscission (*Malus domestica* L. Borck). *J Exp Bot* **56**: 2995-3005.
- 23- Singh Z, Agrez V** (2002) Fruit set, retention and yield of mango in relation to ethylene. *Acta Hort* **575**: 805-811.
- 24- Singh Z, Malik AU, Davenport TL** (2005) Fruit drop in mango. *Horticultural Reviews* **31**: 111-153
- 25- Gutierrez-Martinez P, Lopez-Gomez R, Gomez-Lim MA** (2001) Identification of an *ETR1*-homologue from mango fruit expressing during fruit ripening and wounding. *J.Plant Physiol.* **158**: 101-108.
- 26- Geo Z, Wen CK, Binder BM, Chen YF, Chang J, Chiang YH, Kerris RJ, Chang C and Schaller GE** (2008) Heteromeric interactions among ethylene receptors mediate signaling in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **283**: 23801-23810.
- 27- Hershkovitz V, Friedman H, Goldschmidt EE, Feygenberg and Pesis E (2009).** The role of the embryo and ethylene in avocado fruit mesocarp discoloration. *J Exp Bot* 60:791-799.
- 27- Hershkovitz V, Friedman H, Goldschmidt EE, and Pesis E (2009).** Induction of ethylene in avocado fruit in response to chilling stress on tree. *J. Plant Physiol.* 166: 1855-1862.

סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס לכל השאלות בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).

שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.

הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

<p>מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה: מחקר זה הציע ללמוד את השינויים המולקולריים המתרחשים במהלך היווצרות ר"נ בעת נשירת חנטים במנגו. מטרות היעד לשנת המחקר הנוכחית היו א. המשך שיבוטם של גנים המעורבים במסלול החישה והיצירה של אתילן ממנגו ולימוד דגם שעתוקם במהלך התפתחות ר"נ בעת נשירת חנטים. ב. אפיון השפעת אוקסין על בקרת גנים אלו ועל תהליך היווצרות ר"נ במנגו.</p>
<p>עיקרי הניסויים והתוצאות: המחקר בוצע במערכת אקספלטטים מנותקים (ענפונים נושאי חנטים) מהזן 'קנט' והשריית תהליכי ניתוק בוצעה הן ע"י טיפולים באתרל והן ע"י טיפול בגז אתילן. במסגרת העבודה בשנה החולפת שיבטנו באופן מלא גן ממנגו המקודד לקולטן לאתילן מסוג ERS1. הגן מקודד לחלבון בעל 629 חומצות אמיניות (ח"א) וחולק הומולוגיה של 69-79% ברמת החלבון עם חלבוני ERS1 ממיני צמחים שונים, בהתאם כונה גן זה על ידינו <i>MERS1</i>. בדיקות לבחינת דגם ביטוי הגן הן במהלך יצירת ר"נ והן במהלך הבשלת פרי מעידות כי גן זה עשוי לשחק תפקיד מרכזי בעיקר במהלך יצירת ר"נ, ולא דווקא במהלך הבשלת פרי, אולם כפי שמצויין בדיון עדין יש צורך בביסוס התוצאות הנ"ל. לצורך בחינת השפעת אוקסין על מהלך יצירת ר"נ, ערכנו ניסיונות בהן בוצע טיפול מקדים בטריפטופאן, פרקורסור של אוקסין, לפני השריית תהליכי ניתוק. תוצאותינו הראו כי טיפול זה מנע במידה מסויימת נשירת חנטים, אשר הושרתה ע"י אתרל, הן במנגו והן באבוקדו. ההחלטה לעבוד בנושא זה במקביל גם במנגו וגם באבוקדו מנומקת בהמשך.</p>
<p>מסקנות מדעיות והשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?</p>
<p>מטרות המחקר אשר הוצבו לתקופת הדוח הושגו באופן חלקי. עדין אין מסקנות מדעיות חד משמעיות – יש צורך בביסוס נוסף של התוצאות. השלכות יישומיות לגבי יישום טיפול טריפטופאן למניעת נשירת חנטים תיתכנה, אולם יש לציין כי אופיו של המחקר אינו יישומי</p>
<p>בעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתורה לביצוע תוכנית המחקר?</p>
<p>א. יש עדין צורך לבסס את התוצאות שהתקבלו כפי שמצויין בדיון.</p>
<p>ב. היקף המטרות שהוצג בתוכנית המחקר המקורית היה רחב מאוד – ובהתאם צמצמו את מטרות המחקר.</p>
<p>ג. בשל חוסר ההצלחה בשיבוט גנים נוספים ממנגו המעורבים במסלול החישה והיצירה של אתילן (כדוגמת CTR1) הוחלט לעבור ולעבוד במקביל גם באבוקדו בנושא זה וזאת בשל העובדות הבאות: א. גם באבוקדו כמו במנגו נמצא קשר ישיר בין עלייה בסינטזת אתילן, בפרי המתפתח, ובין נשירת חנטים. ב. בניגוד למצב הקיים במנגו, הגנים המעורבים בסינטזת אתילן והגנים הקשורים במעבר האותות באבוקדו ידועים ואין צורך לשבטם תחילה ג. דגם ביטויים של גנים אלו נחקר באופן מקיף בשנים האחרונות בפרי אבוקדו במהלך הבשלה אולם אין מידע לגבי אופן ביטויים ביצירת ר"נ בנשירת חנטים. אנו סבורים כי החלטה זו תאפשר להעמיק את הידע אודות בקרת תהליכי יצירת ר"נ הגורמת לנשירת חנטים מוקדמו בגידולים סובטרופים.</p>
<p>הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פטנטים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.</p>
<p>אין עדין פרסומים בנושא, מאמר קצר נמצא בשלב הכנה.</p> <p>Ish-Shalom, M, Dahan, Y and Irihimovitch V. Molecular cloning of <i>Mangifera indica</i> L. cDNA encoding an ERS1-homologue. (Short communication – in preparation).</p>
<p>פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)</p>
<p>☐ רק בספריות</p>
<p>☐ ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)</p>
<p>☐ חסוי – לא לפרסם ממליצה עדין לא לפרסם</p>
<p>האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן* - לא – לא במנגו, ייתכן שתוגש תוכנית באבוקדו.</p>

*יש לענות על שאלה זו רק בדוח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדוח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש שנים

