

דו"ח לתכנית מחקר מספר 203-1062

**הבנת הבסיס המולקולרי של השפעת עומס פרי על בקרת הפריחה באבוקדו 'האס' ליעול עתידי של
אמצעים למיתון תופעת הסירוגיות.**

**Understanding the molecular basis of the influence of crop load on
flowering control in 'Hass' avocado**

מוגש לקרן המדע הראשי במשרד החקלאות

ע"י

ורד יריחמוביץ: המחלקה למטעים מינהל המחקר החקלאי בית דגן
טלי צבירן: 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

Tali Zviran. Horticulture Department. The Institute of Plant Sciences –ARO
Bet Dagan 50250 E-mail: talyzw@gmail.com

פברואר 2017

אדר א' תשע"ו

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים כן/לא

חתימת החוקר :

תקציר

באבוקדו 'האס' עומס פרי בשנת שפע מדכא מעבר לפריחה ומשפיע על רמת הסירוגיות. בתוכנית מחקר קודמת, שיבטנו גן מאבוקדו המקודד לחלבון "מתזמן הפריחה" *FLOWERING LOCUS T(FT)*, והראנו כי ביטוי מוגבר שלו ברקמת העלה מבקר את המעבר לפריחה בשנת שפל. עוד הדגמנו כי בשנת שפע עומס פרי מדכא את ביטוי הגן, גורר דיכוי של המעבר לפריחה ומשפיע על תופעת הסירוגיות. בדיקות לבחינת פרופיל הורמונאלי העידו כי דיכוי המעבר לפריחה עשוי להיות קשור בשינויים בצבירת ציטוקינינים בעלים. השנה, הרחבנו את הבדיקות הללו ושלחנו לבדיקה דוגמאות נוספות מעלים שנדגמו מעצים במצב שפע, שפל, ומענפי עצים במצב שפע שעברו טיפול חיגור. התוצאות הדגימו כי העדר עומס פרי גרם לעלייה ברמת הציטוקינינים במצב שפל בהשוואה למצב שפע וכי טיפול החיגור במצב שפע, שהוביל לחזרה לפריחה, העלה אף יותר את רמת הציטוקינינים בעלים. בשני המקרים, העלייה ברמת הציטוקינינים, נבעה מצבירה מוגברת של iPR. בחינת דגם ביטויים של גנים הקשורים לסינטזת ופירוק ציטוקינין בדוגמאות הללו העידה כי ככל הנראה עומס פרי בשנת שפע משפיע באופן שלילי על הצטברות CKs בעלים, הן על ידי מיתון סינטזת CKs והן ע"י אינדוקציית פירוק CKs. במקביל, חזרנו על ניסויים שבוצעו בשנה הקודמת לבחינת השפעת טיפולי ציטוקינין על החזרה לפריחה ועל היבול החוזר. בניגוד לתוצאות שקיבלנו בניסוי קודם, טיפולי ציטוקינין שניתנו לעצים במצב שפע לא תרמו באופן מובהק להעלאת רמת הפריחה והיבול באביב ובעונה העוקבת. יחד עם זאת, תוצאות טיפולי BA ו-CPPU שבוצעו בדצמ' הצביעו על הפוטנציאל הקיים בטיפולי הציטוקינין בשנת שפע. מהות השוני בין תוצאות הטיפולים אינה ברורה לנו ויש מקום למציאת דרכים לשיפור הטיפולים.

1. מבוא ותיאור הבעיה:

1.1 בעיית הסירוגיות בזן האבוקדו 'האס' בעצי פרי רבים וגם באבוקדו 'האס' עומס פרי בשנת שפע מדכא מעבר לפריחה בשנה העוקבת ומשפיע בהתאם על רמת היבול החוזר (7-1). תופעת הסירוגיות מהווה בעיה חקלאית המסבכת את ניהול המטע וגורמת לפחת ברווחי המגדלים. הפריחה בזן 'האס' חלה באביב. גל הפריחה נמשך כחודשיים עד שלושה, כאשר שיאו נצפה בחודש אפריל. לאחר גל הפריחה, מתרחשים תהליכי האבקה הפריה וחנטת פרי. במקביל להתפתחות הפרי, (תהליך הנמשך כ-8-9 חודשים), חל תהליך הצימוח של ענפים חדשים אשר על גביהם אמורות להתפתח התפרחות שיפרחו בשנה העוקבת (7). מהספרות ומדיווחי מדריכים חקלאיים בארץ ובעולם ניתן ללמוד כי לאחר שנת שפע קיימת בזן 'האס' ירידה משמעותית בפריחה ומכאן ניתן להניח כי בעיית הסירוגיות באבוקדו מייצגת, לפחות בחלקה, בעיית אינדוקציה או התמיינות לפריחה (8). השאלה הנשאלת הינה מהם הגורמים המבקרים ו/או מדכאים את האינדוקציה ו/או את ההתמיינות לפריחה לאחר שנת עומס בזן זה. בהקשר זה, יש לציין כי מספר עבודות שנערכו בעשורים האחרונים ב'האס', הובילו לטענות הגורסות כי יתכן ומעבר הורמונים הנוצרים בפרי המתפתח (ABA, IAA, GAs) אל עבר הפקעים מדכא את המעבר לפריחה (9, 10). טענות אלו לא בוססו לחלוטין, שכן עד כה לא הודגם באבוקדו קשר כלשהו בין יצור הורמונים אלו ברקמות צמחיות שונות, ובין דיכוי ו/או השראת ביטוי גנים מבקרי פריחה בעלים ו/או בפקעים.

1.2 בקרת המעבר מרקמה וגטטיבית לפרודוקטיבית מהספרות, ידוע כי האינדוקציה לפריחה במסלולים השונים

מבוקרת ע"י קבוצה קטנה של גנים הקרויים "מתזמני פריחה". אחד מהגנים האלו הינו *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) (11, 12). גן זה, המכונה גם "פלוריגן", מבוטא סמוך לרקמות הווסקולריות של העלה. בכדי להשרות פריחה, מועבר חלבון ה-*FT* דרך מערכת השיפה אל עבר המרסטימה הקודקודית, שם הוא מעודד את ביטויים של גנים הפועלים ב"מורד הזרם", אשר אחראים על התפתחות הפרח. במריסטמה הקודקודית מפעיל חלבון ה-*FT* יחד עם חלבון *FD*, גנים המעורבים בהפיכת המריסטמה הוגטטיבית למריסטמה רפרודוקטיבית ביניהם גן המקודד לחלבון שעתוק ממשפחת ה-*MADS-Box* (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS*) (*SOC1*). הגורמים המבקרים את ביטוי *FT* הינם מגוונים ועשויים להיות קשורים בין היתר בשינויי טמפרטורה, אורך יום ואף בשינויים במאזן הסוכרים וההורמונים בעלה (14, 15). לדוגמא, בשנים האחרונות הוכחה היפוטזה הטוענת כי סוכרוז משחק תפקיד בבקרת שעתוק הגן *AtFT* (13). בהתאם, מעורבות של סוכרוז בהשראת ביטוי *AtFT* הודגמה באופן אלגנטי, כתלות ביצירתו של המטבוליט של סוכרוז *Trehalose-6-phosphate* (*T6P*) (16). מעורבות אפשרית של *CK* בבקרת ביטוי גני *FT-like* הודגמה אף היא בארבידופסיס. בפרט, דווח כי ביטוי ביתר של *CKX* (*CYTOKININ*) (*OXIDASE DEHYDROGENASE*), הגורם לפירוק בלתי הפיך של הציטוקינינים החופשיים הפעילים-איזופנטיל אדנין (*iP*), וטרנס זאטין (*tZ*), גרם לעיכוב בפריחה (17). כמו כן דווח כי ביטוי *AtTSF* (*TWIN SISTER OF FT*), שהינו פארלוג של *AtFT*, הוגבר לאחר מתן ציטוקינין סינטטי (*BA* (6-benzyladenine) (18).

גנים אורטולוגים לגנים המבקרים פריחה בארבידופסיס זוהו במינים רבים ובכללם עצי פרי. כך לדוגמא, זוהו אורטולוג לגן *FT* בהדרים ודווח כי רמתו עולה בעלים כאשר חלה ירידה בטמפרטורות לפני האינדוקציה לפריחה (20). אורטולוגים לגן *FT* זוהו גם בתפוח (21) מנגו (22) וזית (23). בפרט, בהדרים ובתפוח, כמו גם בצפצפה, הוכחה פעילותם במערכות טרנסגניות (14, 20, 23). עבודות אלו ואחרות מעידות כי קיים מנגנון אוניברסלי המבקר

השראה והתמיינות לפריחה וכי שילובם של תנאי סביבה וגורמים אנדוגניים מבקרים את המעבר לפריחה ע"י שפעול ביטוי קבוצת גנים אלו. יצוין כי במחקרים שנערכו בשנים האחרונות בהדרים ובמנגו הודגם כי אחד הגורמים העשויים להשפיע על ביטויים של גנים הקשורים לפריחה הינו עומס פרי (21, 25-27).

1.4 סיכום תוצאות עבודה קודמת: בעבודה קודמת הדגמנו כי בזן 'האס' נוכחות פרי על העץ מעבר לחודש אוקטובר, דיכאה באופן משמעותי את המעבר לפריחה. בהמשך, שיבטנו גן מאבוקדו המקודד לחלבון FT (*PaFT*) והתמקדנו באפיון דגם ביטוי ההתפתחותי ברקמות צמחיות מעצים במצב שפע ושפל. תוצאות עבודתנו תמכו ברעיון ש-*PaFT* עשוי לתפקד כ"פלורוגן" באבוקדו וכי ביטוי מוגבר וזמני שלו ברקמת העלה בחודשים אוק'-נוב', עשוי לבקר את המעבר לפריחה בפקעים (28). מנגד, דיכוי ביטוי הגן בעלים מעצים במצב שפע, עשוי לשחק תפקיד במניעת המעבר לפריחה ובהתאם להשפיע על תופעת הסירוגיות. כתמיכה ברעיון ש-*PaFT* פועל כפלורוגן, הדגמנו כי ביטוי ביתר של *PaFT* בצמחי ארבידופסיס ובטבק השרו פריחה מוקדמת (28). בחלקה השני של העבודה, העלנו היפותזה הטוענת כי בעצים במצב שפל, בהעדר פעילות מבלעים חזקים (פירות), חלה הצטברות יתרה של סוכרים בעלים. הצטברות זו עשויה להשפיע באופן ישיר או עקיף על ביטוי ביתר של *PaFT*. תוצאות כימות סוכרים אכן הראו כי רמת כלל הסוכרים המסיסים הייתה גבוהה באופן מובהק בעלים מעצי Off, בהשוואה לעלים מעצי On. בהמשך, בדקנו את השפעת העלייה ברמת הסוכרים על ביטוי *PaFT*, הן לאחר ביצוע חיגורים בענפים מעצים במצב שפע והן במערכת דסקיות עלי אבוקדו. תוצאות ניסויים אלו תמכו ברעיון שעליה ברמת סוכרוז ו/או פרסאיטול בעלים (המושרית באופן עקיף בהעדר פרי), עשויה להשרות עליה בביטוי *PaFT* ולהשפיע באופן חיובי על הפריחה. יחד עם זאת, תוצאות אלו הדגימו גם את מורכבות בקרת ביטוי *PaFT*, ההיתכנות שגורמים נוספים, שעשויים אף הם להיות מושפעים מנוכחות פרי על העץ (כגון שינויים במאזן ההורמונים), משפיעים על ביטוי *PaFT*, נותרת כתרחיש אפשרי שיש לבססו.

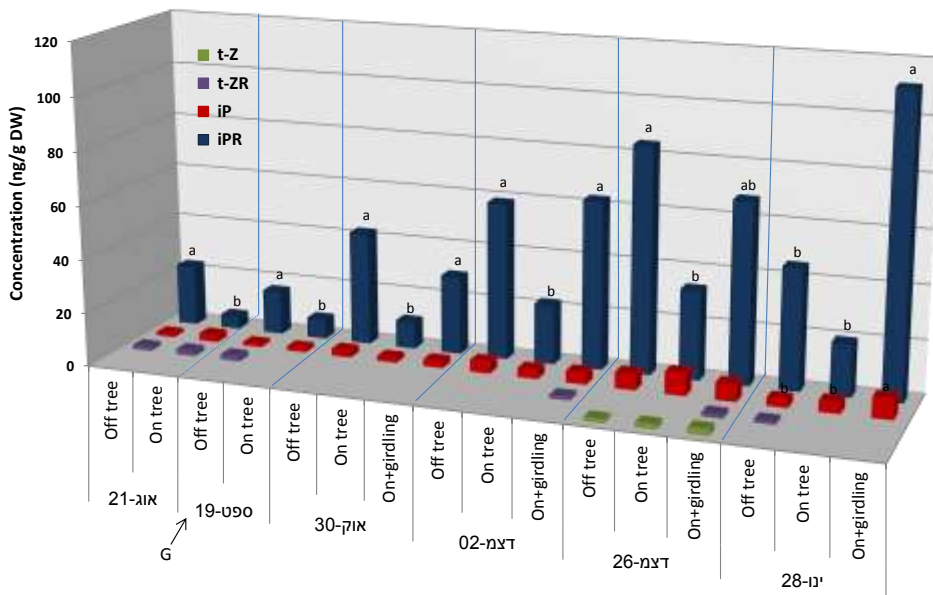
2. מטרת המחקר על בסיס התוצאות שצברנו ניתן להניח כי באבוקדו האינדוקציה לפריחה חלה בחודשים אוק'-נוב', לאחר ירידה בטמפ' וכתלות בביטוי הפלורוגן *PaFT* בעלים, ומשרה פריחה באביב הבא. מנגד, עומס פרי מדכא את העלייה בהצטברות תעתיק *PaFT* ואת האינדוקציה לפריחה. עוד הראנו, כי חיגור ענפים נושאי פרי בספטמבר, השרה עליה מסוימת בביטוי *PaFT* בעלים ופריחה בענפים המטופלים. תוצאות אלו מעניינות מכיוון שהן מורות כי למרות עומס הפרי הקיים בעץ, וויסות ביטוי הפלורוגן בעלים ע"י מניפולציה חיצונית, בנקודת זמן מסוימת, מאפשר מעבר לפריחה. חיגור ענפים בודדים אינו יכול להיות מוצע כפרקטיקה חקלאית למיתון תופעת הסירוגיות, אולם אם ניטיב להבין כיצד עומס פרי מדכא את ביטוי *PaFT* ו/או גנים נוספים המשויכים למשפחה זו נוכל בהתאם להציע אמצעים יעילים יותר למיתון התופעה. מחקר המשך זה הציע להתמקד בלימוד השפעת הורמונים צמחים על בקרת שעתוק הגן *PaFT* ועל החזרה לפריחה בנוכחות ובהעדר עומס פרי.

3. פירוט עיקרי הניסויים, תוצאות ודין.

3.1 השלמות בדיקות פרופיל הורמונאלי בעלים כמדווח בדו"ח הקודם, תוצאות בחינת ביטוי *PaFT1* הדגימו כי במצב שפל, רמת ביטוי הגן עלתה באופן חד החל מאוק', הגיעה לשיא בתחילת דצמ' וחזרה לרמתו ההתחלתית מסוף דצב' ואילך. מאידך, רמת *PaFT1* נותרת נמוכה וכמעט ללא שינוי בעלים ממצב שפע, בהם החזרה לפריחה

הייתה כמעט אפסית. לבסוף, טיפולי חיגור בענפי עצי שפע, שהוביל לחזרה לפריחה, גררו עלייה זמנית ברמת ביטוי *PaFT1*, והודגם כי למרות נוכחות פרי על העץ, רמת הגן עלתה במהלך חודש דצב' ולאחר מכן ירד ביטוי לרמתו ההתחלתית (ראה נספח א'). בכדי לבדוק האם קיים מתאם כלשהו בין דגם הביטוי של *PaFT1* ובין שינוי ברמת הורמונים מסוימים ו/או מטבוליט שלהם בשנת שפל לעומת שנת שפע שלחנו בשנה שעברה רקמות עלים שנאספו מעלים במצב שפע ושפל. לצורך האיפיון ההורמונלי נשלחו דגימות מנקודות זמן שונות למעבדת שירות בקנדה לקבלת פרופיל הורמונאלי מקיף לאחר הרצה במכשיר UPLC-ES-MS/MS. תוצאות כימות ההורמונים שהתקבלו הדגימו כי קיימת שונות מובהקת ברמת הצטברות ציטוקינים (CKs) בין עלים שנדגמו מעצים במצבי שפל בהשוואה לעלים מעצים במצב שפע. לעומת זאת, כמעט ולא הודגמה הצטברות GAs שונים בדוגמאות שנשלחו (לא מוצג). במהלך השנה החולפת, השלמנו את הבדיקות הנ"ל ע"י שליחת דוגמאות עלים שנדגמו מענפי עצי שפע בהם בוצעו חיגורים. אזור 1, מורה כי בשלושת סוגי העלים הודגמה נוכחות ה-CKs החופשיים הפעילים tZ ו-iP ושל הפרקורטורים הריבוזידים שלהם dhZR (Dihydrozeatin riboside) ו-iPR (Isopentenyladenosine), כאשר האחרון שבהם הצטבר ברמה גבוהה באופן משמעותי בכל נק' הזמן. בפרט, החל מאמצע אוגוסט ועד לסוף דצמבר חלה הצטברות יתרה של iPR בעלים מעצים במצב שפל, ולאחר מכן חלה ירידה מסוימת ברמתו. מגמה דומה נצפתה בעלים מעצי שפע, למרות זאת בכל נק' הזמן רמת iPR הייתה גבוהה יותר בעלים מעצי שפל בהשוואה לעלים מעצי שפע. במנ, בעלים מענפי עצי שפע שחוגרו, נצפתה מגמת עלייה כללית ברמת הצטברות iPR ונראה כי החל מסוף אוק', כחודשים לאחר ביצוע החיגורים, עלתה בהם רמת הצטברות iPR ורמתם נותרה גבוהה גם בסוף ינואר.

איור 2. שינויים בצבירת ציטוקינים בעלים שנדגמו מעצים בשלושה מצבים: שפל (Off), שפע (On) ושפע+חיגור (On+Girdling). כל נקודה מייצגת ממוצע ± שגיאת תקן של 3 חזרות ביולוגיות. אותיות שונות מייצגות את המובהקות בשונות ברמת הצטברות iPR בין המצבים השונים בכול נקודת זמן. האות G מורה על מועד ביצוע החיגור.



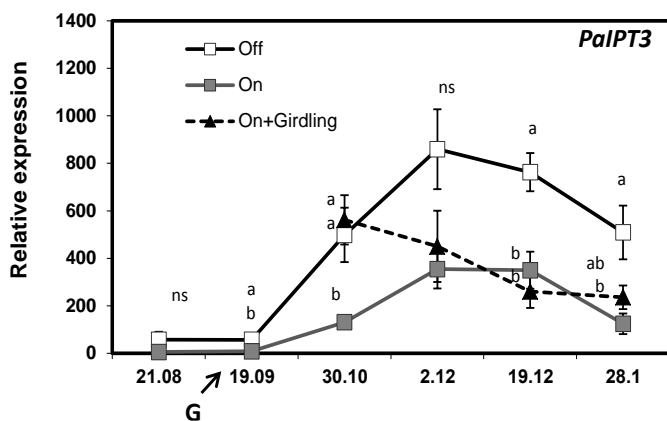
3.2 בחינת רמת ביטויים של גנים הקשורים בסינטזת ופירוק ציטוקינים. הצטברות גבוהה של ציטוקינים

בעלים מעצים במצב שפל ו/או בעלים מעצי שפע שחוגרו באזור המחבר בין הפרי לעלה, בהשוואה לעלים מעצים במצב שפע (עמוסי פרי), עשויה להעיד כי עומס פרי משפיע באופן שלילי על סינטזת CKs בעלים. לחילופין ו/או

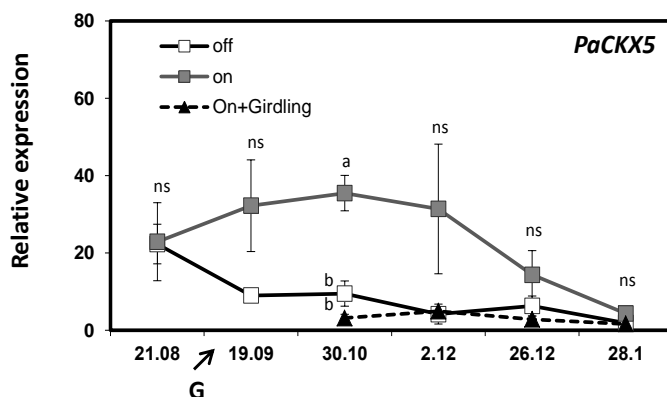
בנוסף ניתן לשער כי עומס פרי משפיע באופן חיובי על פירוק ציטוקינינים בעלים. גורם זה עשוי להשפיע באופן עקיף על חזרה לפריחה.

ראוי לציין כי בעבר, היה מקובל לטעון כי ציטוקינינים נוצרים בשורש ומועברים אל עבר הנוף, אולם בהתבסס על עבודות המראות כי גני IPT מתבטאים גם ברקמות עלים, גבעולים ופרחים, מקובלת כיום הסברה הטוענת כי בעוד tZR מיוצר בעיקר בשורש ומועבר בעצה, במוהל השיפה מצוי בעיקר iPR, המיוצר בנצר ועשוי לנוע אל עבר השורשים (29). במקרה שלנו, תוצאות בדיקת הפרופיל ההורמונאלי בעלים עשויות להעיד כי עומס פרי משפיע באופן שלילי על סינטזה ו/או הצטברות iPR. סינטזת ציטוקינינים הינה מורכבת ותלויה במסלולים רבים (ראה נספח ב). באופן כללי, השלב המבקר/מגביל את סינתזת הציטוקינינים מתרחש בכלורופלסט בתיווכו של האנזים ADP/ATP IPT (Adenosine phosphate-(isopentenyltransferase) (29). בכדיי לאשש את הרעיון שעומס פרי משפיע על סינטזת CKs בעלים בדקנו בשנה שעברה את רמת ביטוי של גן מאבוקדו המקודד לחלבון IPT3 במצב שפע ושפל (ראה דו"ח קודם). השנה, הרחבנו את בחינת הביטוי ובדקנו את דגם ביטוי *PaIPT3* ואת דגם ביטוי *PaCKX5*, בדגימות עלים ממצב שפע, שפל ושפע+חיגור. איור 2. מורה כי החל מאמצע ספט' עלתה רמת ביטוי *PaIPT3* בעלים מעצים ממצב שפע ושפל, הגיעה לשיא במהלך דצמבר, וירדה לאחר מכן. למרות הדמיון בדגם הביטוי, בפרט בסוף אוק', כמו כן בנק' הזמן מה-19.12 עד ה-28.01, רמת ביטוי הגן הייתה גבוהה באופן מובהק בעלים מעצי שפל, בהשוואה לעלים מעצים ממצב שפע. התוצאות שהתקבלו הורו בנוסף כי חיגור ענפים בעצי שפע, גרר בסוף אוקטובר לעלייה בביטוי *PaIPT3*, בהשוואה למצב שפע, אולם מנק' זמן זו ירדה רמת ביטוי הגן.

תוצאות בדיקת ביטוי *PaCKX5*, המקודד לאנזים שמפרק ציטוקינין, הראו מגמה שונה. במקרה זה רמת ביטוי הגן במצב שפע הייתה גבוהה יחסית החל מסוף אוגוסט וירדה ברמתה לקראת סוף פרק הזמן הנבחן. לעומת זאת, בעלים מעצי שפל וגם בעלים מטיפול החיגור, נותרה רמת ביטוי הגן נמוכה לאורך כל פרק הזמן הנבחן, ובפרט בסוף אוק' הודגמה שונות מובהקת בין רמת ביטוי הגן בשני מצבים אלו לעומת מצב שפע.



איור 3: בחינת דגם הביטוי העונתי של *PaIPT3* ו-*PaCKX5* בעלים שנדגמו מעצים בשלושה מצבים: שפל (Off), שפע (On) ושפע+חיגור (On+Girdling). כל נקודה ממוצע \pm שגיאת תקן של 3 חזרות ביולוגיות. אותיות שונות מייצגות את המובהקות בשונות בין המצבים, ככול נקודת זמן. האות G מורה על מועד ביצוע החיגור. ערכי הביטוי היחסיים חושבו ביחס לגן המנרמל *PaACT*.



התוצאות שהתקבלו מובילות למסקנה שעומס פרי בשנת שפע עשוי להשפיע באופן שלילי על הצטברות CKs בעלים גם ע"י על ידי מיתון סינטזת CKs, וגם ע"י אינדוקציה פירוק CKs. ראוי לציין עם זאת שלמרות שתוצאות ביטוי *PalPT3* בעלים ממצב שפע ושפל מראות כי קיימת הלימה בין שינוי ברמת ביטוי *PalPT3* ובין רמת הצטברות iPR, תוצאות ביטוי הגן אינן עומדות בהלימה עם התמונה המתקבלת מבדיקת רמות iPR בעלים מהענפים המחוגרים. במקרה זה, בעוד רמת ביטוי הגן יורדת לקראת סוף פרק הזמן הנבחן, נצפית מגמת עלייה כללית ברמת הצטברות iPR לקראת סוף פרק הזמן הנבחן. ייתכן שביטוי של גנים נוספים השייכים למשפחת IPT, שלא נבדק על ידינו, מושפע אף הוא מעומס פרי ורמת הצטברותו עולה לאחר חיגור הענף וניתוק הקשר בין הפרי לעלה.

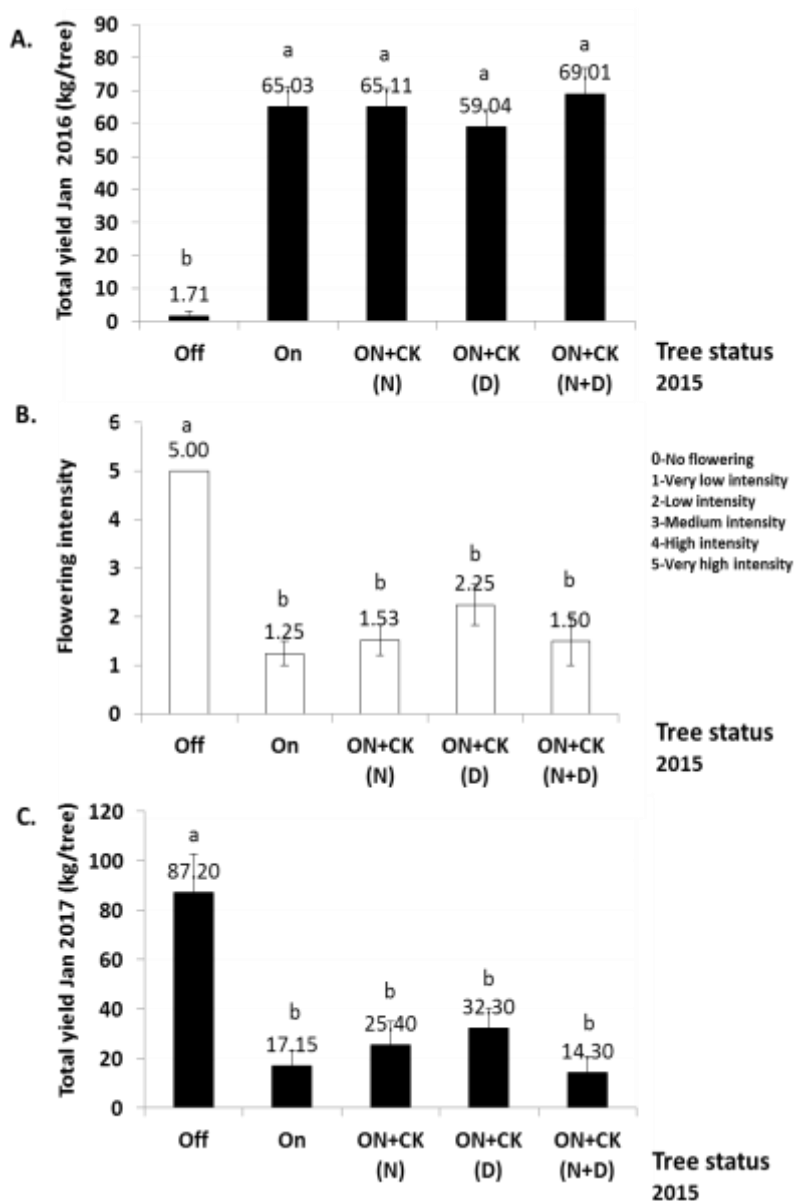
3.3 בחינות חוזרות של השפעת טיפולי ציטוקינין בשנת שפע על המעבר לפריחה ועל היבול בשנה החוזר.

בהתחשב בקשר החיובי שהודגם בצמחי מודל בין עליה ברמת CKs וביטוי גני *FT-like* (17-18), ובתוצאות המוצגות לעיל, אחד המודל הפשוטים שניתן היה להעלות על הדעת הינו שצבירה מוגברת של ציטוקינין עשייה להשפיע על עליה בביטוי *PaFT* ועל האינדוקציה לפריחה. יש לציין עם זאת, שרמת iPR נותרת גבוהה גם בסוף דצמ', לאחר הירידה שנצפתה בביטוי *PaFT1* במצב שפע ושפע+חיגור. בכדיי לנסות ולאמת את תפקידם ההשראתי של ציטוקינינים על מידת החזרה לפריחה, ביצענו בשנה שעברה ניסיונות בשטח. תוצאות ניסויים אלו הורו כי טיפול ציטוקינין (80 ח"מ) בעצי שפע בסוף נוב' אפשר חזרה מסויימת לפריחה, ללא תלות בעלייה בביטוי *PaFT1* בעלים וגרם לעלייה ביבול החוזר (ראה דו"ח קודם). תוצאות אלו היו תוצאות פרלמינריות. מכיוון שלתוצאות אלו השלכות ישומיות חזרנו על ניסויים אלו במתכונת דומה בשני אתרים במטעים מסחריים באייל וביקום.

בניסוי בקיבוץ אייל נבחרו בקיץ 2015, שלושים ושניים עצים במצב שפע ושמונה עצים במצב שפל. העצים חולקו לחמש קבוצות (שמונה עצים בכל קבוצה). בקבוצת עצי השפל לא בוצע כל טיפול (הוגדרו כעצים במצב שפל). בקבוצה אחת מבין קבוצת עצי השפע גם כן לא בוצע טיפול, הוגדרו כעצים במצב שפע. קבוצות עצי השפע הנותרות רוסו בסוף נוב' בסוף דצמ' ובסוף נוב'+10 דצב' (ריסוס כפול) ב-80 ח"מ BA (כתכשיר גוליית, חב' תרסיס), בתוספת 0.1% "שטח-90" (חברת תרסיס). לאחר ביצוע הטיפולים, בעונת הקטיף המסחרית נבדקה רמת היבול הכללי בעצים מטופלים ולא מטופלים. באביב נבחנה השפעת הטיפולים על רמת הפריחה החוזרת, ובעונת הקטיף הבאה נבדקה שוב רמת היבול הכללי. הניסוי שבוצע במטע 'האס' בקיבוץ יקום בוצע באופן דומה, אלא שבמקרה זה הוספה קב' עצי טיפול נוספת שרוסו בציטוקינין סינטטי CPPU (20 ח"מ תכשיר גוליבר, חב תרסיס).

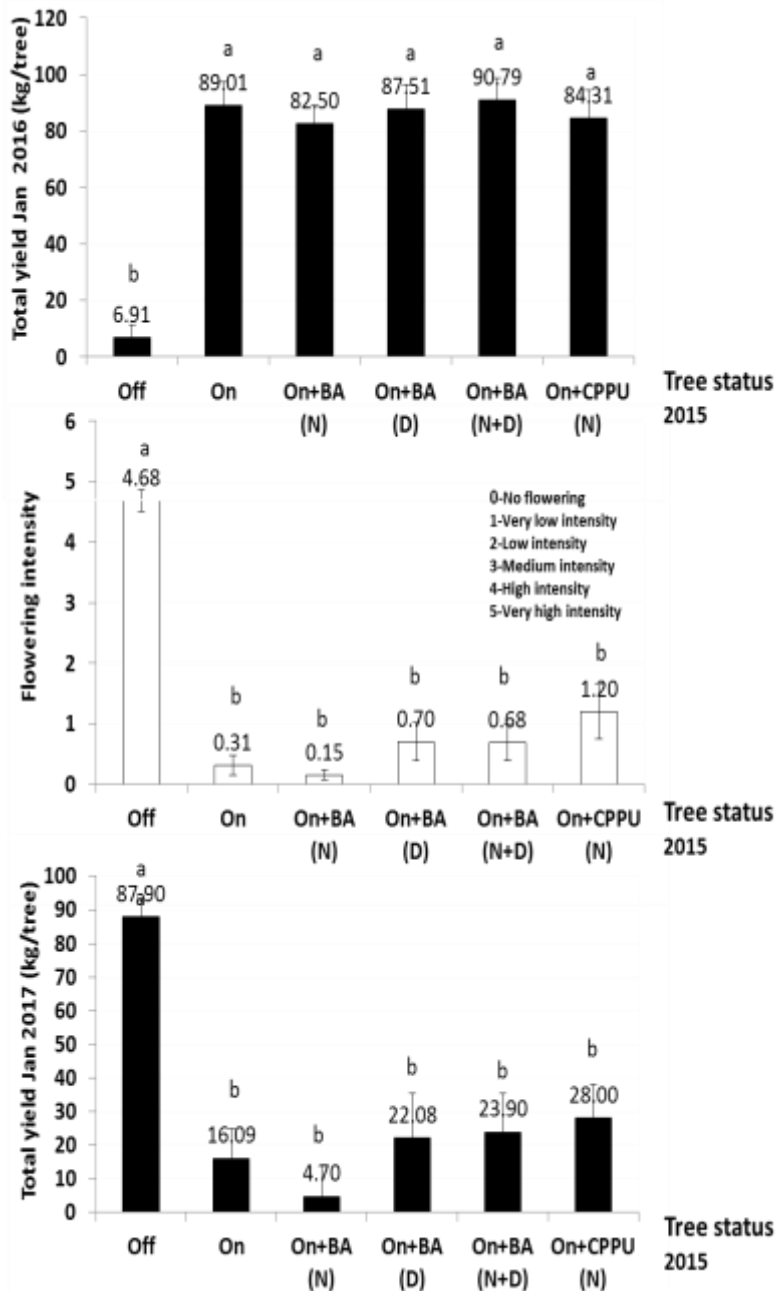
תוצאות הניסוי שבוצע במטע באייל מוצגות באיור 3. בדיקת היבול הכללי בעונת הקטיף המסחרי בינו' 2016, לאחר ביצוע הטיפולים בנוב ובדצמ', הראתה שכפי שניתן היה לצפות בעצים במצב שפל רמת היבול הכללי הייתה כמעט אפסית. בניגוד לכך, בעצים במצב שפע, רמת היבול הכללי שהתקבלה הייתה גבוהה מאוד. גם בעצי השפע שטופלו בציטוקינין רמת היבול הכללי הייתה גבוהה ולא נבדלה באופן מובהק מרמת היבול של עצי הביקורת, ולכן ניתן להסיק כי לטיפול הציטוקינין לא הייתה השפעה כלשהי (חיובית ו/או שלילית) על רמת היבול הכללי. התוצאות היבול מדגימות בנוסף כי עצי השפע שנבחרו לצורך הניסוי היו אחידים (ראה איור 3A).

בהמשך, כדי לקבוע את השפעות הטיפולים שבוצעו בסתיו על הפריחה ביצענו תצפיות באביב העוקב. איור 3B מורה כי עוצמת הפריחה הגבוהה ביותר התקבלה בעצי הביקורת שהיו במצב שפל במהלך העונה (Off trees). לעומת זאת, בעצי ביקורת במצב שפע (On trees), רמת הפריחה שהתקבלה הייתה נמוכה מאוד, אך לא אפסית כפי שנצפה בעונה הקודמת. בחינת תוצאות טיפולי הציטוקינין הראתה כי בניגוד לתוצאות שהתקבלו בשנה הקודמת (ראה ד"וח קודם), בשנה זו טיפולי הציטוקינין לא תרמו לעלייה מובהקת ברמת הפריחה החוזרת (ראה איור 3B). בדיקות היבול החוזר (בינואר 2017), הדגימו בהתאם כי טיפולי הציטוקינין לא תרמו לעלייה מובהקת ברמת היבול החוזר בהשוואה לביקורת. למרות זאת, מבין שלושת הטיפולים, הטיפול שנתיין בדצמבר גרר עלייה יחסית ברמת הפריחה החוזרת. מדדי היבול הראו כי בטיפול זה בקטיף של 2017 התקבל יבול ממוצע גבוה יותר מיבול הביקורת של עצי השפע (32 ק"ג לעץ בהשוואה ל 17 ק"ג בעץ), אך תוצאה זו לא הייתה מובהקת.



איור 3. השפעת טיפולי ציטוקינין באבוקדו 'האס' על חזרה לפריחה ועל יבול חוזר - ניסוי אייל. פנל עליון - טיפולי ציטוקינין (CK) 80 BA ח"מ) בעצי שפע בוצעו בשני מועדים: בסוף נוב' (N), בסוף דצמ' (D) וריסוס כפול בסוף נוב' + סוף דצמ' (D+N). עצי שפע ושפל, לא מטופלים, שימשו כעצי ביקורת. היבול הכללי נקטף במועד הקטיף המסחרי בסוף ינואר 2016. פנל אמצעי - דרגות הפריחה נקבעו לאחר תצפיות שבוצעו בשיא פריחה בחודש אפריל 2016. פנל תחתון - היבול הכללי החוזר נקטף במועד הקטיף המסחרי, בתחילת ינואר 2017. כל עמודה מייצגת ממוצע + שגיאת תקן של שמונה עצים לטיפול.

תוצאות הניסוי שבוצע במטע ביקום מוצגות באיור 4. התוצאות שהתקבלו בניסוי זה דמו לתוצאות שהתקבלו באייל. גם במקרה זה, בניגוד לעונה הקודמת, טיפולי הציטוקינין שניתנו לעצים במצב שפע בחורף, לא תרמו לעליה מובהקת ברמת החזרה לפריחה. מדדי היבול החוזר שהתקבלו היו קורלטיביים למדדי הפריחה ובמועד הקטיפה ב-2017 נמצא כי טיפולי הציטוקינין לא תרמו באופן מובהק להגדלת היבול בשנה העוקבת. יש לציין עם זאת, כי בניסוי זה הוסף טיפול נוסף (ריסוס ב-20 ח"מ CPPU). טיפול זה גרר לעלייה הגבוהה ביותר (לא מובהקת) ברמת הפריחה יחסית לביקורת. מדדי היבול הראו כי בטיפול זה התקבל יבול ממוצע גבוה יותר מיבול עצי הביקורת (28 ק"ג לעץ בהשוואה ל 16 ק"ג בעץ), אולם גם תוצאה זו לא הייתה מובהקת.

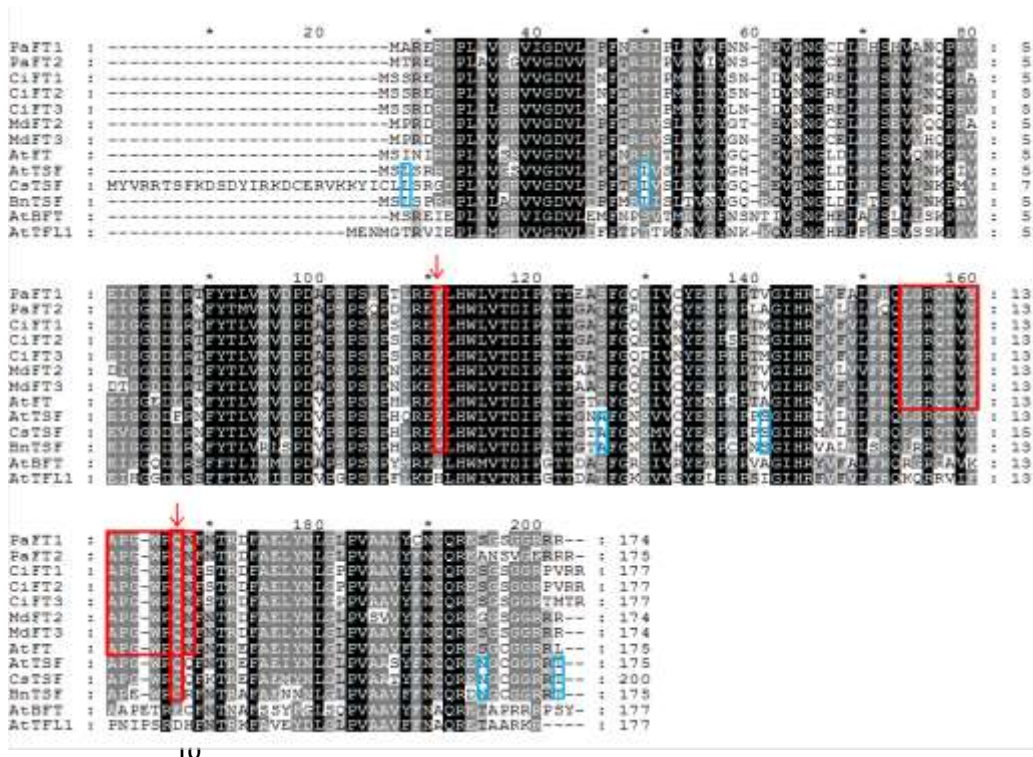


איור 4. השפעת טיפולי ציטוקינין באבוקדו 'האס' על חזרה לפריחה ועל יבול חוזר- ניסוי יקום. פנל עליון - טיפולי BA (80 ח"מ) בעצי שפע בוצעו בשני מועדים סוף נוב' (N), סוף דצמ' (D) וריסוס כפול סוף נוב' + סוף דצמ' (D+N), טיפול CPPU (20 ח"מ) בעצי שפע בוצע בסוף נוב' (N). עצי שפע ושפל, לא מטופלים, שימשו כעצי ביקורת. היבול הכללי נקטף במועד הקטיפה המסחרי בסוף ינואר 2016. פנל אמצעי - דרגות הפריחה נקבעו לאחר תצפיות שבוצעו בשיא פריחה בחודש אפריל 2016. פנל תחתון - היבול הכללי החוזר נקטף במועד הקטיפה המסחרי בתחילת ינואר 2017. כל עמודה מייצגת ממוצע + שגיאת תקן של שמונה עצים לטיפול

לסיכום חלק זה : בניגוד לתוצאות שקיבלנו בניסוי פרלימינרי עליו דיווחנו בדו"ח קודם, טיפולי ציטוקינין שניתנו לעצים במצב שפע לא תרמו באופן מובהק להעלאת רמת הפריחה והיבול באביב ובעונה העוקבת. יחד עם זאת, תוצאות

טיפול BA ו-CPPU שובצעו בדצמ' הצביעו על הפוטנציאל הקיים בטיפול הצטוקינין בשנת שפע. מהות השוני בין תוצאות הטיפולים אינה ברורה לנו. כמו כן, לאור הממצאים המורים כי עומס פרי משפיע באופן שלילי על הצטברות CKs בעלים, הן על ידי מיתון סינטזת CKs והן ע"י אינדוקציה פירווק CKs, יש מקום לנסות ולשפר את השימוש בציטוקינין סינטי יציב יותר כדוגמת CPPU ו/או TDZ, בניסויים נוספים.

3.4 שיבוט גן נוסף מאבוקדו המקודד לחלבון FT-like ואפיון דגם ביטוי בהעדר ובנוכחות פרי. כפי שצויין במבוא, עבודות בצמחי מודל הראו כי ביטוי *AtTSF* (*TWIN SISTER OF FT*), שהינו פארלוג של *AtFT*, הוגבר לאחר מתן ציטוקינין סינטי BA (6-benzyladenine) (18). נושא השריית פריחה ע"י ציטוקינין, אם מתרחש באופן אפקטיבי באבוקדו, דורש גם המשך הבנת המנגנון. בעבודות שנערכו במספר מינים נמצא כי הגן *FT* עשוי להיות משויך למשפחת גנים המונה מספר נציגים. על בסיס רצף EST שזוהה במאגר מידע של NCBI בודדנו בעבר גן המקודד לחלבון FT. כיום, מצויי בידינו טרנסקריפטום אבוקדו 'האס' אשר רוצפו בטכנולוגיות של Illumina HiSeq-454 מתערובת RNA מעלים (מסגרת מיזם חוסן בוטריוספרה). בעזרת אנליזת BLAST ושימוש במאגרים אלו זיהינו ובודדנו גן נוסף המקודד לכאורה לחלבון נוסף ממשפחת FT. הגן החדש שבודד מקודד לחלבון בעל 174 חומצות אמינו (ח"א) ומשקלו המוערך הינו 19.6 kDa. רצפו של חלבון זה חולק 80.5% זהות עם חלבון *PaFT* שזוהה בעבודה הקודמת, ו-78-83% זהות עם חלבוני FT ממינים אחרים. לאחר זיהוי הגן החדש, הוחלט לכנות את הגן שבודדנו בעבודה הקודמת בשם *PaFT1*, ואת הגן החדש בשם *PaFT2*. כפי שניתן לראות באיור 5, השוואה ברמת החלבון הדגימה כי כמו *PaFT1*, גם *PaFT2*, מכיל ח"א שמורות המאפיינות את חלבוני FT-like ממינים שונים, ומאפשרת להבדיל בינם ובין חלבוני TFL1 ו-BFT. אנליזה פילוגנטית הדגימה בנוסף שניתן לסווג חלבון זה כ-FT אך לא כ-TSF (ראה נספח 1). לאחר זיהוי הגן *PaFT2*, לבדיקת דגם ביטוי בהשפעת/או העדר עומס פרי, תוכננו תחלים ספציפיים ונעשה שימוש בחומר צמחי (עלים) שנאספו מעצים במצב שפע, שפע, ושפע+חיגור, ומעלים במצב שפע, שפל, ושפע CK+. בדיקות אלו מתבצעות בימים אלו.



איור 5- השוואת רצף חלבון PaFT2 עם רצף חלבון PaFT1, ועם רצפי חלבוני FT-like, BFT, ו-TFL1 ממינים שונים. מסומנים באדום ח"א שמורות ורצף ח"א שמורות המבדילים בין חלבוני FT-like ובין חלבוני BFT ו-TFL1. מסומנות בכחול ח"א שמורות המבדילות בין חלבוני FT ובין TSF.

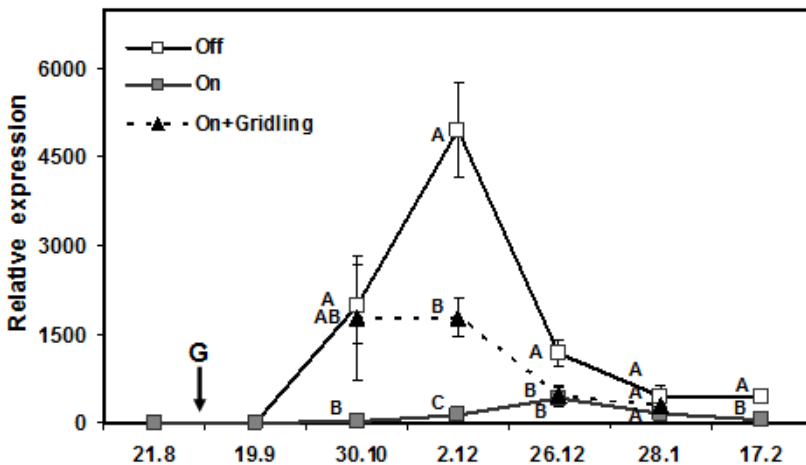
4. הבעת תודה אנו מודים למרכזי המטע בקיבוץ אייל ויקום על שאפשרו לנו לבצע את העבודה במטע מסחרי של עצי 'האס'.

5. ביבליוגרפיה

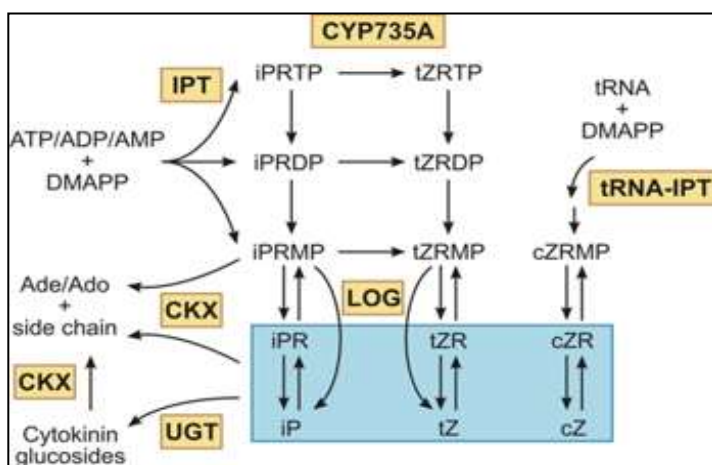
1. Lovatt CJ (2010) Alternate Bearing Of 'Hass' Avocado. *California Avocado Society Yearbook* (93):125-140.
2. Verreyne JS & Lovatt CJ (2009) The Effect of Crop Load on Budbreak Influences Return Bloom in Alternate Bearing 'Pixie' Mandarin. *J Amer Soc Hort Sci* 134(3):299-307.
3. Lavee S (2007) Biennial bearing in olive (*Olea Europea*). *Annales Ser Hist Nat* 17:101-112.
4. Goldschmidt EE, Aschkenazi N, Hezano Y, Schaffer AA, & Monselise SP (1985) A role for carbohydrate levels in the control of flowering in *Citrus*. *Scientia Horticulturae* (26):159-166.
5. Samach A & Smith HM (2013) Constraints to obtaining consistent annual yields in perennials. II: Environment and fruit load affect induction of flowering. *Plant Sci* 207:168-176.
6. Wilkie JD, Sedgley M, & Olesen T (2008) Regulation of floral initiation in horticultural trees. *Journal of experimental botany* 59(12):3215-3228.
7. Whiley AW, Schaffer B, & Wolstenholme BN (2002) *The Avocado: Botany, Production and Uses* (CABI, New York, NY) 1 Ed.
8. Salazar-Garcia S, Lord EM, & Lovatt CJ (1998) Inflorescence and flower development of the 'Hass' avocado during "on" and "off" crop years. *J Amer Soc Hort Sci* 123:537-544.
9. Lovatt CJ (2005) Eliminating alternate bearing of the 'Hass' avocado. *Proceedings of the California Avocado Research Symposium*, (University of California), pp 75-86.
10. Lovatt CJ (2006) Eliminating alternate bearing of the 'Hass' avocado. *Proceedings of the California Avocado Research Symposium*, (University of California), pp 127-142.
11. Imaizumi T & Kay SA (2006) Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence. *Trends in plant science* 11(11):550-558.
12. Turnbull C (2011) Long-distance regulation of flowering time. *Journal of experimental botany* 62(13):4399-4413.
13. Hsu CY, et al. (2011) FLOWERING LOCUS T duplication coordinates reproductive and vegetative growth in perennial poplar. *PNAS* 108(26):10756-10761.
14. King RW (2012) Mobile signals in day length regulated flowering: Gibberellins, Flowering Locus T, and sucrose. *Russian Journal of Plant Physiology* 59(4):479-490.
15. Wahl V, et al. (2013) Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 339(6120):704-707.
16. Werner T, et al. (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant cell* 15(11):2532-2550.
17. D'Aloia M, et al. (2011) Cytokinin promotes flowering of *Arabidopsis* via transcriptional activation of the FT paralogue TSF. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 65(6):972-979.
18. Nishikawa F, et al. (2007) Increased CiFT abundance in the stem correlates with floral induction by low temperature in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Journal of experimental botany* 58(14):3915-3927.
19. Trankner C, et al. (2011) Over-expression of an FT-homologous gene of apple induces early flowering in annual and perennial plants. *Planta* 232(6):1309-1324.
20. Nakagawaa M, Honsho C, Kanzakia S, Shimizuc K, & Utsunomiyaa N (2012) Isolation and expression analysis of FLOWERING LOCUS T-like and gibberellin metabolism genes in biennial-bearing mango trees. *Sci Hort* 139:108-117.
21. MBA הברמן א (2012) ואפיון השפעת עומס פרי על המעבר לפריחה לימוד המערכת האנדוגנית לבקרת הפריחה בזית. (האוניברסיטה העברית בירושלים, רחובות).
22. Endo T, et al. (2005) Ectopic expression of an FT homolog from *Citrus* confers an early flowering phenotype on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Transgenic Res* 14(5):703-712.
23. Freiman A, et al. (2012) Development of a transgenic early flowering pear (*Pyrus communis* L.) genotype by RNAi silencing of PcTFL1-1 and PcTFL1-2. *Planta* 235(6):1239-1251.

- .25 Mun˜oz-Fambuena N, *et al.* (2011) Fruit regulates seasonal expression of flowering genes in alternate-bearing 'Moncada' mandarin. *Ann Bot* 108(3):511-519.
- .26 Mun˜oz-Fambuena N, *et al.* (2012) Fruit load modulates flowering-related gene expression in buds of alternate-bearing 'Moncada' mandarin. *Ann Bot* 110:1109–1118.
- .27 Shalom L, *et al.* (2012) Alternate bearing in *Citrus*: Changes in the expression of flowering control genes and in global gene expression in ON- versus OFF-crop trees. *PLoS One* 7. DOI: 10.1371/journal.pone.0046930.
- .28 Ziv, D., Zviran, T., Zezak, O., Samach, A and Irihimovitch, V (2014). Expression profiling of *FLOWERING LOCUS T-like* gene in alternate bearing 'Hass' avocado trees suggests a role for *PaFT* in avocado flower induction. *PLoS One* 9(10): e110613. doi:10.1371/journal.pone.0110613.
- .29 Sakakibara H (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual review of plant biology* 57:431-449.
- .30 Bernier, G (2011) My favorite flowering image. *J. Exp. Bot.* doi:10.

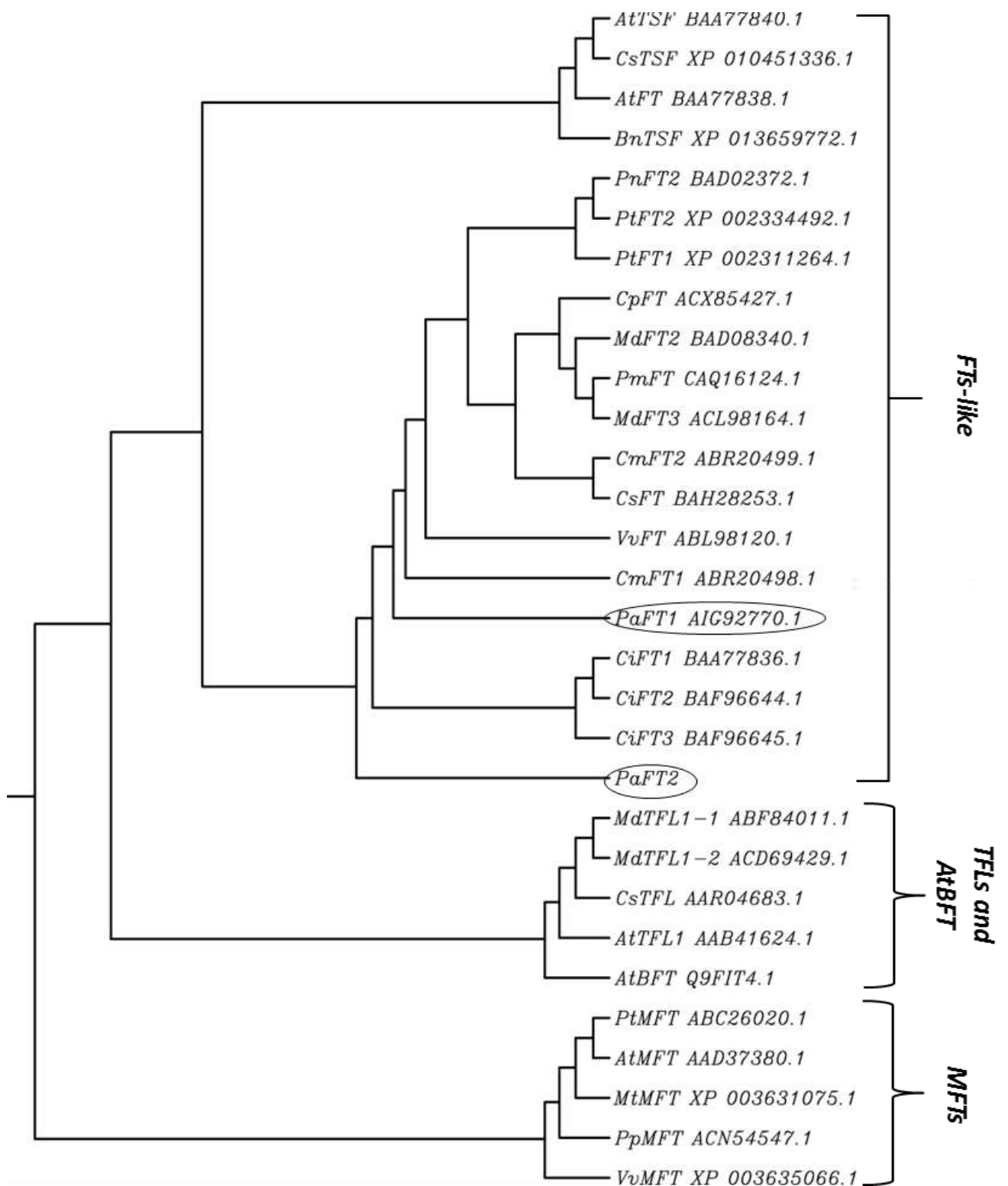
נספחים:



נספח א': בחינת דגם ביטויו העונתי של הגן *PaFT* בעלים שנדגמו מעצים בשלושה מצבים: שפל (Off), שפע (On) ושפע+חיגור (On+Girdling). כל נקודה מייצגת ממוצע ± שגיאת תקן של 3 חזרות ביולוגיות. אותיות שונות מייצגות את המובהקות בשונות בין שלושת המצבים, בכול נקודת זמן. האות **G** מורה על מועד ביצוע החיגור. ערכי הביטוי היחסיים חושבו ביחס לגן המנרמל *PaACT*. התוצאות הוצגו בדוח 203-0813-14 ומוצגות שוב לצורך השוואה.



נספח ב': מסלולי ביוסינתזה של ציטוקינין. מסומנים בצהוב אנזימים מרכזיים הפועלים במסלולים השונים.



נספח ג- עץ פילוגנטי לבחינת הקרבה והשונות בין PaFT2 וגנים נוספים שהינם FT-like ממינים שונים.

<p>מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה: לימוד השפעת הורמונים צמחים על בקרת שעתוק הגן <i>PaFT</i> ועל החזרה לפריחה בנוכחות ובהעדר עומס פרי</p>
<p>אלו מטרות המחקר הושגו בעבודת המחקר הנוכחית - עיקרי התוצאות לשנת המחקר- הרחבנו את הבדיקות לבחינת פרופיל הורמונאלי בעלים שנדגמו מעצים במצב שפע, שפל, ומענפי עצים במצב שפע שעברו טיפול חיגור וגררו חזרה לפריחה. תוצאות כימות ההורמונים הדגימו כי העדר עומס פרי גרם לעלייה ברמת הציטוקינינים במצב שפל בהשוואה למצב שפע וכי טיפולי החיגור העלו אף יותר את רמת הציטוקינינים בעלים. בשני המקרים, העלייה ברמת הציטוקינינים, נבעה מצבירה מוגברת של iPR. בחינת דגם ביטויים של גנים הקשורים לסינטזת ופירוק ציטוקינין בדוגמאות הללו העידה שעומס פרי בשנת שפע משפיע באופן שלילי על הצטברות CKs בעלים, הן על ידי מיתון סינטזת CKs והן ע"י אינדוקציית פירוק CKs. חזרנו על ניסויים שבוצעו בשנה הקודמת לבחינת השפעת טיפולי ל-CKs על החזרה לפריחה ועל היבול החוזר. בניגוד לתוצאות שקיבלנו בניסוי פרלימנרי עליו דיווחנו בדו"ח קודם, טיפולי ציטוקינין שניתנו לעצים במצב שפע לא תרמו באופן מובהק להעלאת רמת הפריחה והיבול באביב ובעונה העוקבת. מהות השוני בין תוצאות הטיפולים אינה ברורה לנו. יחד עם זאת, יש לציין כי טיפולי BA שבוצעו באייל בדצמ' וטיפול CPPU שבוצעו ביקום בדצמ' הצביעו על הפוטנציאל הקיים בטיפול ציטוקינין ויש מקום למציאת דרכים לטיפול הטיפולים.</p> <p>לאור הממצאים המורים כי עומס פרי משפיע באופן שלילי על הצטברות CKs בעלים, הן על ידי מיתון סינטזת CKs והן ע"י אינדוקציית פירוק CKs, יש מקום לנסות ולשפר את השימוש בציטוקינין סיננטי יציב יותר כדוגמת CPPU ו/או TDZ</p>
<p>מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?</p> <p>מטרות המחקר אשר הוצבו למחקר זה הושגו.</p>
<p>בעיות שנותרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגים, שיווקים ואחרים) שחלו במהלך העבודה התייחסות המשך</p> <p>דרושים ניסויים נוספים לבדיקת ההשלכות היישומיות של טיפולי ציטוקינין בשנת שפע על המעבר לפריחה ועל היבול בשנה החוזר.</p>
<p>הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - <u>ציטט</u> ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי;</p> <p>פטנטים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.</p> <p>צפי פרסום מדעי - התוצאות שהוצגו בחלק של המחקר הבסיסי יסוכמו במהלך השנה הבאה.</p>
<p>פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח (סמן אחת מהאופציות)</p>
<p><ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)</p>
<p>< חסוי – לא לפרסם</p>
<p>האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר? כן- לא. אני מתכוונת להגיש תוכנית המשך במסגרת קול-קורא למחקרים ייחודיים תמר ואבוקדו לשנת 2017.</p>