

**שם התכנית:** בחינת מניעת נזקי קרה באבוקדו בעזרת גישה חדשנית

**השותפים:** דנה חרובי (המכון למדעי הצמח, מנהל המחקר החקלאי), ורד יריחוימוביץ (כנ"ל), יוספה שחק (כנ"ל), קירה רטנר (כנ"ל), מיקי נוי (שה"מ), הדר כהן (בית אריזה מילופרי).

## **I. סטטוס המחקר**

### 1. רקע ותאור הבעיה: נזקי קור באבוקדו

ידוע כי צמחים טרופים וסוב-טרופים רגישים לקור. בישראל, עצי פרי כגון אבוקדו ומנגו חשופים לנזקים קשים בחורף בתקופות בהן ישנם לילות צינה או קרה. בפרט, זני 'האס' ו-'ריד' הנם זני האבוקדו הרגישים ביותר לקור. בזנים אלו נזקי הקור באים לידי ביטוי בצריבה של העלווה והענפים, בפגיעה בפרי לפני קטיף, ובפגיעה בהתמיינות פקעי הפריחה של העונה הבאה. כמו כן, מדיווחי חקלאים נראה כי עצים אשר נמצאים בשנת שפע (עם עומס פרי גבוה) פגיעים יותר לקרה מעצים ללא עומס פרי (עצים במצב שפל). במקרים קיצוניים, בכדי לטפל בנזקי קרה ישנו צורך בגיזום רדיקלי (שילוד) או בעקירת העצים שניזוקו קשות ובשתילה מחדש. מכאן שההשלכות הכלכליות של נזקי קרה באבוקדו, יכולות להיות קשות מאד. כך למשל, הקרה הקיצונית של חורף 2008 הובילה לנזקים שהוערכו ביותר מ- 100 מיליוני שקלים לענף האבוקדו<sup>1</sup>. בחורף הנוכחי, כ- 10,000 דונם של מטעי אבוקדו באזור בגליל המערבי ניזוקו (תמונה 1) וההערכה הכלכלית של הנזקים עשויה להיות דומה לשל 2008 (מיקי נוי, דיווח אישי).

עבודות קודמות הציעו שנזקי קור בעצי פרי ממוצא טרופי/סוב-טרופי אינם נגרמים ישירות מעצם הירידה בטמפרטורה בלילה, אלא מהחשיפה לאור ביום שלאחר ליל הצינה או הקרה (ימים אלה הם לרוב בהירים)<sup>2,3</sup>. מרבית המגדלים אינם מודעים לתופעת ליל-קור-יום-אור, אך מכירים את ביטוייה בשטח. כך, למשל, חלקי העץ החשופים לאור נפגעים יותר מאשר חלקים פנימיים או צפוניים. בדומה לכך, עצים אשר חשופים פחות לקרינה עקב הצללה של מבנים או עצים אחרים, פחות פגיעים מאלו אשר חשופים לגמרי לאור השמש. בנוסף, מטעים צעירים, שכל הנוף שלהם חשוף לאור, רגישים מאד ללילות קור וחלקם לא שורדים אירועי קרה. במחקר שעסק בכיסוי מטעי אבוקדו ברשתות נמצא כי באירוע הקרה של 2008 ההצללה הגנה משמעותית מנזקי הקרה בזנים הרגישים 'האס' ו'ריד'. הרשת לא סיפקה הגנה מהקרה עצמה, שכן הטמפרטורות שנמדדו בבית הרשת היו זהות לאלו שבביקורת ללא רשת<sup>4</sup>.

מבחינה פיזיולוגית תנאי ליל-קור-יום-אור בצמחים טרופים או סוב-טרופים גורמים לשיבושים בפעילות המערכת הפוטוסינתטית<sup>5,6</sup>. הנובעים מסגירה אבנורמלית של הפיוניות במשך היום (לדוגמא במנגו<sup>2,3</sup>), לפגיעה בפעילות אנזימי מעגל קיבוע הפחמן, או לשיבוש הריתמוס הצירקדי (היומי) אשר, מוביל בין היתר לשינויים בדגם ביטוי גנים הקשורים במטבוליזם של פחמן. הירידה בתהליכי קיבוע CO<sub>2</sub>, אשר מנצלים את האנרגיה והכוח המחזור שנוצרים בריאקציות האור של הפוטוסינתזה, גורמת לעיכוב בשרשרת הולכת האלקטרונים עקב מחסור במקבלי אלקטרונים ולהצטברות עודפי אנרגיה. חוסר האיזון בין תהליכי ריאקציות האור ותהליכי קיבוע הפחמן גורם לייצור מוגבר של מולקולות חמצן פעילות – reactive oxygen species (ROS), אשר פוגעות בממברנות, בחלבונים, וב-DNA. אחת ההשלכות היא הצטברות נזקים במערכת אור-II (PSII) בקצב אשר גובר על קצב תיקונם – פוטואינהיביציה (photoinhibition). מצב דומה יכול להתרחש גם ב-PSI; תופעה זאת פחות נפוצה ופחות מתועדת, אך היא אופיינית לצמחים הרגישים לקור. עצמת הנזק מתגברת כאשר טמפרטורת הלילה נמוכה יותר או כאשר ישנם

מספר מחזוריים של ליל קור-יום אור. כאשר מנגנוני ההתמודדות של הצמח עם הפוטואינהיביציה אינם מספקים, הצטברות מולקולות ROS עשויה להוביל לנזקים בלתי הפיכים אשר מתבטאים בכלורוזה, נקרוזה ואף נשירה של העלים ו/או הפירות.<sup>7</sup> במקרים חמורים, הנזקים החימצוניים עלולים להוליך למות העץ כולו.

כיום, אין בפועל פתרון רחב היקף לבעיית הקרה בעצי פרי טרופים/סוב-טרופים. רשתות צל עשויות בעיקרון לספק הגנה מנזקי ליל קור-יום אור, הודות לצמצום עצמת הקרינה אליה נחשפים העצים במהלך היום, אבל מצד שני יש להן השפעה שלילית על היבול עקב המרצת הצימוח הוגטיבי. פתרון נוסף שהוצע בעבר וטרם נבחן הינו ריסוס העלווה בחומרים מחזירי אור (ריסוס בקאולין ודומיו) לקראת או מיד לאחר אירוע הקרה. כמו כן מוצע כי בתנאים של קיפאון, ניתן למנוע נזקים על ידי המטרה מאסיבית במים, אשר מגינה על העצים בזכות החום שמשחרר בתהליך יצירת הקרח. אבל יישומה של שיטת ההמטרה כרוכה בהימצאות מקור מים שפירים בכמות מספקת.

בעבודת מחקר זו אנו מציעים לבחון גישה חדשנית שמבוססת על טיפולים מקדימים – priming, אשר מקטינים את הפוטואינהיביציה ונזקי האור, ו/או משפיעים את מנגנוני התמודדות הטבעית של העץ עם ROS. טיפולים אלו עשויים להפחית באופן משמעותי את מידת הנזק הנגרם במטעי אבוקדו בעקבות תנאי לילות קור-ימי אור.

## 2. שיפור התמודדותם של צמחים עם תנאי עקה באמצעות טיפול מקדים – priming

שיפור עמידותם או התמודדותם של צמחים עם עקות ביוטיות ואביוטיות באמצעות טיפול מקדים – priming הנו נושא הצובר תאוצה בשנים האחרונות.<sup>8</sup> מולקולות שונות, הן טבעיות והן סינתטיות, יכולות לשמש כסיגנלים הגורמים לצמח להגיב מהר יותר ובעוצמה גבוהה יותר (או שניהם) כאשר הוא נחשף לתנאי עקה או לשילוב של מספר עקות. דוגמא אחת למולקולות המשמשות לטיפול priming הנה דווקא מולקולות חמצן פעילות (ROS), אשר במינונים נמוכים משמשות בתור מולקולות סיגנל; אך ברמות גבוהות גורמות לנזקים מצטברים. מגוון עבודות הראו כי טיפול חיצוני מקדים של עלים (בריסוס) או של שורשים במי חמצן ( $H_2O_2$ ) בריכוזים נמוכים מטיב עם הצמח בתנאי עקה שונים<sup>9-12</sup>. דווח כי אחת הדרכים בהן טיפול מקדים במי חמצן משפר את עמידות הצמח היא העלאת הפעילות של המערכות נוגדות החמצון הטבעיות של הצמח, הכוללות מנגנוני קישור ונטרול של מולקולות ROS. בנוסף, הראו כי ישנן השפעות חיוביות על המערכת הפוטוסינתטית, הן מבחינת תכולת כלורופיל וקרוטנואידים והן מבחינת פעילות המערכת (למשל<sup>13</sup>). הסיגנל של מי החמצן מעורב גם בבקרת ביטוי גנים ותהליכי תגובה לעקות אביוטיות שונות, אך אלו אינם מאופיינים לחלוטין<sup>9</sup>. מולקולה נוספת אשר טיפולי priming באמצעותה מקנים עמידות בפני עקות אביוטיות שונות הנה מימן גופרתי ( $H_2S$ )<sup>8,14</sup>.

אחת ממולקולות הסיגנל החשובות בתא הנה סידן ( $Ca^{2+}$ ), אשר מתווכת מגוון גדול של תגובות ותהליכים פיזיולוגיים, כולל התגובה לעקת קור<sup>15,16</sup> ומשמשת אף היא לטיפול priming. לדוגמא, בעבודות שבוצעו בצמחי מודל דווח שטיפול באמצעות ריסוס חיצוני ב- $CaCl_2$ , כטיפול מקדים לתנאי ליל קור שאחריו נחשפו הצמחים לאור, הקטין את מידת הפוטואינהיביציה. הפחתה זו יוחסה, בין היתר, לעלייה בפעילות מעגל הקסנטופיל, המהווה חלק ממנגנון ה- non-photochemical quenching, המנתב את העודפים מאנרגיית האור שנבלעת ע"י מערכות האור לכיוון אנרגיה תרמית שנפלטת מהעלה. בנוסף, עלייה בהולכת אלקטרונים

מעגלית (cyclic electron flow, סביב PSI) בהשראת הפריימינג תרמה למזעור הפוטואינהיביציה<sup>17</sup>. דווח בנוסף, כי טיפולים חיצוניים בסיידן שיפרו את פעילות המערכת הפוטוסינתטית גם בתנאי עקה נוספים כגון חום, קרינה חזקה ומליחות<sup>18-21</sup>.

## **II. מטרת המחקר וחישובות**

### **1. שאלת המחקר ומטרות**

הצעת המחקר מבוססת על מחקרים קודמים בהם נמצא כי טיפולים חיצוניים מקדימים (priming) ע"י ריסוס עלויותי במגוון מיני צמחים שיפרו את עמידותם למגוון רחב של תנאי עקה. בין היתר, טיפולי ה-priming שיפעלו או הגבירו את פעילותם של מנגנונים נוגדי חמצון ושיפרו את פעילות המערכת הפוטוסינתטית בעת השיפתם לתנאי העקה. עיקרון הפריימינג דומה במהותו לעיקרון של החיסון ברפואה.

היפותזת העבודה שלנו מניחה שמרכיב מרכזי בהיווצרות נזקי צינה/קרה במינים טרופים/סוב-טרופים הינו החשיפה לאור שבאה בעקבות לילות קור, ומעורבים בה יצירה מוגברת של ROS ותהליכי הרס תלויי אור (photodamage). בהתבסס על מחקרים בצמחי מודל בהם דווח כי טיפולי priming ע"י ריסוס חיצוני משפרים עמידות למגוון רחב של תנאי עקה, ניתן לצפות כי טיפולי priming טרם החשיפה לצינה/קרה באבוקדו עשויים להגביר את כושר ההתמודדות של העץ עם נזקי ליל קור-יום אור.

מטרתו העיקרית של מחקר זה הינה בחינת השפעת טיפולים חיצוניים מקדימים של העלווה בשתילי ועצי אבוקדו על העמידות לתנאי לילות קור-ימי אור ואפיון המנגנונים המשרים עמידות ע"י טיפולים אלו. להשגת מטרה זו מוצעים שלבי המחקר הבאים:

- (1)** אפיון התגובה הפיזיולוגית ועצמת הנזק בעקבות חשיפה לרצף לילות קור-ימי אור במערכת שתילי אבוקדו מזן 'האס'.
- (2)** בחינת טיפולים מקדימים במי חמצן ( $H_2O_2$ ), מימן גופרתי ( $H_2S$ ), וסידן ( $CaCl_2$ ) והשפעתם על התגובה הפיזיולוגית ועצמת הנזק בתנאי לילות קור-ימי אור במערכת שתילי אבוקדו מזן 'האס'.
- (3)** אפיון מערך הגנים המשופעלים בעקבות טיפול מקדים אשר ימצא כמועיל.
- (4)** בחינת טיפול מקדים ברמת המטע לפני אירוע קרה או צינה צפוי, בעצי אבוקדו מזן 'האס' במצב שפע ושפל.

### **2. חשיבות המחקר**

גידולים טרופים וסוב-טרופים, כגון מנגו, אבוקדו, ובננה רגישים לקור בדרגות שונות. טמפרטורות הלילה בחלק מהאזורים בהם מגדלים מינים אלה בארץ עשויות להיות נמוכות מאד בחורף, ואף לרדת לאפס מ"צ ואפילו מתחת לאפס. כיום, אין לבעיה זאת פתרון המיושם בפועל (בהיקף נרחב). מעבר לכך, תדירות אירועי אקלים קיצוניים נמצאת במגמת עלייה בשנים האחרונות ולכן ייתכנו גם אירועי קרה קיצוניים. לפיכך, מציאת טיפול מקדים אשר ישפר את עמידותם של גידולים טרופים וסוב-טרופים לאירועי קרה הנה בעלת ערך משמעותי. ערכם הכלכלי של הקטנת או מזעור שיעור הנזקים בגידולים אלו עשוי להיות עצום.

בעבודה זו בחרנו להתמקד באבוקדו ולבחון מספר טיפולים אשר שיפרו את פעילות המערכת הפוטוסינתטית ו/או הפחיתו את מידת הנזק החיצוני ע"י הגברת פעילות המערכות נוגדות החמצון הטבעיות של הצמח. בדיקת היתכנות הצלחת הטיפולים

שנבחרו יחסית פשוטה כיוון שעלותם נמוכה והטיפול יינתן בריסוס. הניסיונות המבוקרים של המחקר ייעשו במערכת שתילים. יתרונה של מערכת זו בכך שהיא תאפשר לאפיין את הפיזיולוגיה, עצמת הנזקים וכן לבחון ולכיייל את הטיפולים השונים באופן יחסית מהיר. בנוסף, כיוון ששתילים צעירים הנם, באופן כללי, רגישים יותר לתופעת ליל קור-יום אור לעומת עצים בוגרים, קבלת תוצאה חיובית בעקבות טיפול במערכת השתילים סביר שתהיה מועילה גם בעצים בוגרים. מערכת השתילים תאפשר בהמשך גם את בחינת משך זמן הזיכרון של צמחים שעברו priming והיו עמידים יותר בפני תנאי לילות קור-ימי אור.

בהימצא טיפול(ים) מועיל(ים) במערכת השתילים, בחינתו ברמת המטע תאפשר לקבוע את היתכנות יישומו בפועל. רגישותם של עצי אבוקדו לתנאי קרה תלויה לא רק בזן המסוים בו מדובר, אלא גם במצבם הפיזיולוגי או הפיזי, כגון גיל העץ, מצב עומס הפרי (עם/בלי) או האם העץ נגזם לפני אירוע הקרה. בעבודה זו נבדוק טיפול(ים) פוטנציאלי(ם) בעצי אבוקדו מזן 'האס' אשר נמצאים הן בשנת שפע (עומס פרי גבוה) והן בשנת שפל. דבר זה יאפשר לאמוד את השפעת הטיפול במצב פגיע (שפע) או פחות פגיע (שפל) של עצים מזן זה.

טיפול אשר יימצא מועיל באבוקדו, צפוי שיהיה אפשר ליישמו על מינים טרופים/סוב-טרופים אחרים לפני אירועי קרה. בנוסף, כיוון שטיפולי priming עם חומרים זהים הוכחו בספרות כיעילים במגוון רחב של תנאי עקה, ניתן יהיה להרחיב את המחקר בעבודות המשך לצורך טיפול בעצים או גידולים אחרים אשר סובלים למשל מנזקי חום וקרינה.

אפיון מערך הגנים המשופעלים בעקבות טיפול מקדים (אשר יימצא מועיל) יאפשר ללמוד על אותם תהליכים אשר בעקבות הטיפול מקנים או משפרים את עמידות הצמח לתנאי ליל קור-יום אור. תהליכים המתרחשים בעקבות עקה משולבת של אור ביום שלאחר ליל קרה פחות מובנים. הבנה מעמיקה של תהליכים אלו רלוונטית למיני צמחים טרופים וסוב-טרופים הגדלים באזורי אקלים כמו שלנו והניזוקים קשה בתנאי קרה.

### III. טבלת משימות

משימה #	המשימה בהצעה
<b>שנה א'</b>	
1	הקמת מערכת להדמיית לילות קור-ימי אור במערכת שתילי אבוקדו
2	אפיון התגובה הפיזיולוגית ועצמת הנזק בעקבות לילות קור-ימי אור
3	בחינת השפעת טיפולים חיצוניים מקדימים על עצמת הנזק של לילות קור-ימי אור
<b>שנה ב'</b>	
1	אפיון מערך הגנים המשופעלים בעקבות טיפול מועיל ב- RNA seq
2	בחינת טיפול מקדים בעצי אבוקדו עם ובלוי עומס פרי במטע לפני אירוע קרה או צינה צפוי
<b>שנה ג'</b>	
1	ניתוח תוצאות RNA-seq
2	אימות רמת ביטוי של גנים נבחרים ב- RT-PCR
3	בחינת השפעות הטיפול על פריחה חוזרת ויכול בעונה הבאה
4	בחינה חוזרת של הטיפול במטע לפני אירוע קרה/צינה צפוי

**IV. פירוט המשימות**

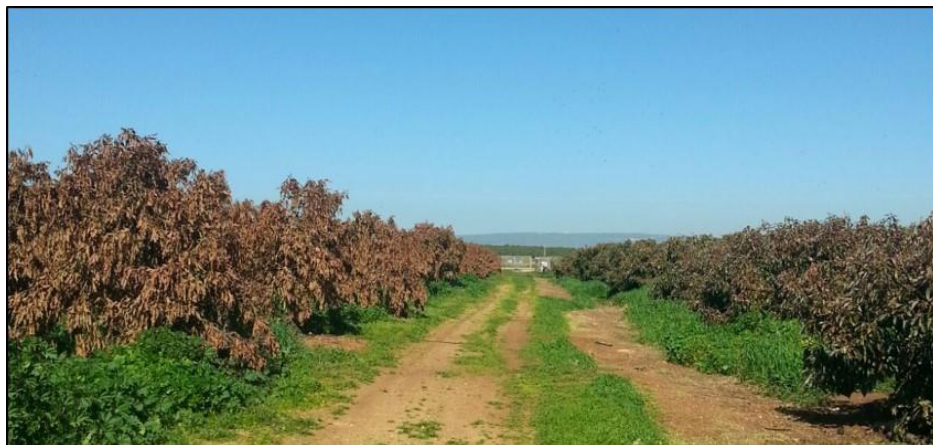
פירוט המשימה	משימה #
	שנה א'
<p align="center"><u>הקמת מערכת להדמיית לילות קור-ימי אור במערכת שתילי אבוקדו</u></p> <p>שתילי אבוקדו מזן 'האס' מורכבים על כנות זריעה (דגניה 117 או צריפין 99) יגודלו בעציצים בבית רשת. הדמיית טמפ' מינימום שונות בלילה (2, 6 ו-9 מ"צ) תיעשה בחדרי קור, למשך 3-5 לילות. במהלך הימים השתילים ייחשפו לאור הטבעי, כפי שתואר בעבר<sup>2</sup>. ביקורות יהוו שתילים אשר ישו ב- 18 מ"צ בלילה (ואור טבעי ביום), ושתילים אשר ייחשפו לליל קור (בטמפ' קור אחת) אך יהיו בהצללה במהלך היום. הניסוי יתבצע בשני מועדים שונים (בין דצמבר למרץ) ויכלול 15 שתילים לניסוי [5 מצבים x 3 חזרות ביולוגיות (שתיל) למצב]. הניסוי ילווה במדידת תכולת כלורופיל, מדד הפלואורסנציה <math>F_v/F_m</math> וקצב קיבוע <math>CO_2</math> בעלים בוגרים וצעירים (ע"י המכשור המתואר במשימה 2). ממדידות הפרמטרים הנ"ל ניתן יהיה לאפיין באופן פשוט יחסית מהם התנאים – טמפ' הלילה ומספר לילות הקור, בהם הנזקים באים לידי ביטוי במערכת זו ולהשתמש בתנאים אלו להמשך העבודה.</p>	1
<p align="center"><u>אפיון התגובה הפיזיולוגית ועצמת הנזק בעקבות לילות קור-ימי אור</u></p> <p>אפיון זה יתבצע תוך שימוש במערכת שתילים אשר ייחשפו לטמפ' לילה נמוכה מסוימת ומספר לילות רצופים על סמך המידע שיתקבל ממשימה 1. הניסוי יתבצע ב 3 מצבים: ליל קור + חשיפה לעצמת תאורה טבעית ביום, ליל קור + הצללה ביום, ליל ביקורת (18 מ"צ) ועצמת תאורה טבעית, ויכלול 18 שתילים [3 תנאים/מצבים x 3 חזרות ביולוגיות x 2 חזרות טכניות (שתילים למצב)]. לבחינת נזקי הקרה נשתמש בכלי מדידה בלתי הרסניים אשר נותנים מידע אודות מצבם הפיזיולוגי של העלים, כולל ספקטרום רפלקציית האור מהעלים, תכולת כלורופיל, פעילות פוטוסינתטית (עפ"י מדד הפלואורסנציה <math>F_v/F_m</math>), טמפ' עלה, מוליכות פיוניות וקצב קיבוע <math>CO_2</math>, באמצעות מכשירים ייעודיים ניידים המצויים בידנו. הצפי הוא כי ממדידות הפרמטרים הנ"ל ניתן יהיה לגלות את מידת הנזקים לפני הופעתם היוזואלית – ככלורוזה ונקרוזה של העלווה.</p>	2
<p align="center"><u>בחינת השפעת טיפולים חיצוניים מקדימים על עצמת הנזק של לילות קור-ימי אור</u></p> <p>ייבחנו טיפולים של שתילים בחומרים הבאים: מי חמצן (<math>H_2O_2</math>, 1-10 mM), מימן גופרתי (<math>H_2S</math>), כתמיסת <math>NaHS</math> (200-50 <math>\mu M</math>), או סידן (<math>CaCl_2</math>, 5-30 mM), כל טיפול ייבדק ב- 3 ריכוזים שונים בטווחים המצוינים לעיל. כביקורת יישמשו שתילים לא מטופלים. הטיפולים יינתנו כריסוס עלוותי פעם ביום, במשך</p>	3

<p>שלושה ימים על מנת לדמות טיפול אפשרי לפני קרה צפויה. בלילה שלאחר הטיפול האחרון, השתילים יועברו לרצף של לילות קור-ימי אור (טמפ' הלילה ומספר הלילות כפי שייקבע במשימה 1). במהלך ימי הטיפול ובמהלך רצף לילות קור-ימי אור יבוצעו מדידות פיזיולוגיות (כמפורט במשימה 2) על מנת לאפיין את השפעת הטיפולים המקדימים על השתילים ואת השפעתם על התפתחות הנזק. הטיפול שיצטיין בהפחתת נזקי קרה ישמש להמשך הניסיונות בשנים ב' ו- ג'.</p>	
	שנה ב'
<p><u>אפיון מערך הגנים המשופעלים בעקבות טיפול מועיל ב- RNA seq</u></p> <p>שתילים יטופלו (בטיפול אשר ימצא כמצטיין במשימה 3, שנה א') וייחשפו לרצף של לילות קור-ימי אור. דגימות עלים משתילים מטופלים ושתילי ביקורת ייאספו ב-3 נקודות זמן: (1) לאחר הטיפול, (2) לאחר ליל הקור הראשון, (3) בתום רצף לילות קור-ימי אור (סה"כ 18 דגימות = 2 מצבים x 3 נקודות זמן x 3 חזרות ביולוגיות). מדגימות העלים יופק RNA, יבוצע rRNA depletion באמצעות Ribo-Zero kit (Illumina). בניית ספריות לריצוף וריצוף (deep sequencing) יבוצע ע"י ספק חיצוני (המרכז הישראלי הלאומי לרפואה מותאמת אישית ע"ש ננסי וסטיבן גרנד, מכון ויצמן). חלק מהחומר הצמחי יישמר ב-80°C לצורך בדיקה ואימות ביטוי גנים נבחרים ב- real-time (RT) PCR (שנה ג', משימה 2).</p>	1
<p><u>בחירת טיפול מקדים בעצי אבוקדו עם ובלי עומס פרי במטע לפני אירוע קרה או צינה צפוי</u></p> <p>על פי צפי אירוע קרה/צינה במטעי 'האס' שייבחרו למטרות המחקר בגליל מערבי - יטופלו עצים במטע בטיפולי priming באמצעות ריסוס עלוותי כאשר הטיפול יהיה בחומר/ים (ובריכוז החומר/ים) שיימצאו כאפקטיביים ביותר למניעת נזקי קרה בניסוי במערכת השתילים (משימה 3 בשנה א'). מספר הטיפולים יהיה כמספר הימים שבהם ידוע מראש על אירוע קרה מתקרב (לרוב 3-4 ימים). הניסוי יכלול 32 עצים: 8 עצים במצב שנת שפע ו- 8 עצים בשנת שפל אשר יטופלו; ובתור ביקורת 8 עצים במצב שנת שפע ו- 8 עצים בשנת שפל ללא טיפול. מעקב אחר התגובה הפיזיולוגית ועצמת הנזקים יעשו באמצעות המכשור שתואר במשימה 2 בשנה א'.</p>	2
	שנה ג'
<p><u>ניתוח תוצאות RNA-seq</u></p> <p>תוצאות הריצוף תעובדנה מול טרנסקריפטום אבוקדו המצוי ברשותנו, ואשר ישמש כרפרנס (טרנסקריפטום מרקמות עלים של הזן 'האס' - באדיבות דר' דיוויד קוהן, USDA, Florida). חלק זה של העבודה יעשה בשיתוף עם ד"ר עדי פייגנבוים מהיחידה לביואינפורמטיקה, מנהל המחקר החקלאי.</p>	1

<p>השוואת ביטוי הגנים משתילים שלא טופלו עם אלו שטופלו, תאפשר להבדיל בין תגובת הצמח הטבעית לתנאי הקור-אור לתגובה שהושרתה ע"י הטיפול.</p>	
<p><u>אימות רמת ביטוי של גנים נבחרים ב- RT-PCR</u></p> <p>דגש יושם על בחינת דגם ביטוי גנים המקודדים לחלבונים רגולטוריים, גנים המעורבים ביצירת, קישור ונטרול של מולקולות ROS, וגנים הקשורים בהרכב, בקרת, ופעילות המערכת הפוטוסינתטית.</p>	<p>2</p>
<p><u>בחינת השפעות הטיפול על פריחה חוזרת ויבול בעונה הבאה</u></p> <p>יבוצעו מעקבים אחר הפריחה ורמת היבול בעצים שטופלו ועצי ביקורת.</p>	<p>3</p>
<p><u>בחינה חוזרת של הטיפול במטע לפני אירוע קרה/צינה צפוי</u></p> <p>על פי צפי אירוע קרה או צינה, נחזור על הניסוי המתואר בשנה ב', משימה 2.</p>	<p>4</p>



מועד בדיקה מתוכנן (MM/YY)	תיאור אבן הדרך ואופן בדיקת העמידה בה	אבן הדרך #
04/17	ביסוס מערכת להדמיית קרה בשתילי אבוקדו- קביעת תנאי טמפ' הלילה ומספר לילות קור ברצף	1
04/17	אפיון התגובה הפיזיולוגית לרצף לילות קור-ימי אור באמצעות כלי מדידה לא הרסניים במערכת שתילים	2
04/17 או 04/18 (כתלות בזמינות שתילים)	קביעה האם טיפולים מקדימים שונים מפחיתים את נזקי לילות קור-ימי אור במערכת שתילים	3
12/18	אפיון דגם ביטוי הגנים בשתילים שעברו טיפול מקדים בזמנים שונים במהלך רצף לילות קור-ימי אור	4
12/19	קביעה האם טיפול מקדים מפחית את נזקי הקרה במטע בעצים עם או בלי עומס פרי	5



**תמונה 1.** מטע אבוקדו בבית העמק שניזוק באירוע קרה בסוף חודש ינואר 2016. התמונה צולמה בפברואר 2016 (באדיבות מיקי נוי).

**רשימת פרסומים רלוונטיים של החוקרים**

דנה חרובי (חוקרת חדשה במחלקה לעצי פרי, החל מה-1 במרץ 2016).

1. **Charuvi, D.**, Nevo, R., Shimoni, E., Naveh, L., Zia, A., Adam, Z., Farrant, J.M., Kirchhoff, H. and Reich, Z. (2015) Photoprotection conferred by changes in photosynthetic protein levels and organization during dehydration of a homoiochlorophyllous resurrection plant. *Plant Physiol.* 167, 1554-65.
2. Nevo, R., **Charuvi, D.**, Tsabari, O., and Reich, Z. (2012) Composition, architecture and dynamics of the photosynthetic apparatus in higher plants. *Plant J.* 70, 157-76.
3. **Charuvi, D.**, Kiss, V., Nevo, R., Shimoni, E., Adam, Z. and Reich, Z. (2012) Gain and loss of photosynthetic membranes during plastid differentiation in the shoot apex of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 1143-57.
4. Adam, Z., **Charuvi, D.**, Tsabari, O., Knopf, R.R. and Reich, Z. (2011) Biogenesis of thylakoid networks in angiosperms: knowns and unknowns. *Plant Mol Biol.* 76, 221-234.
5. Kirchhoff, H., Tsabari, O., Hall, C., Nevo, R., **Charuvi, D.**, Wood, M., Miroslava Herbstová, M. and Reich, Z. Dynamic control of protein diffusion within the granal thylakoid lumen. *Proc Natl Acad Sci* 108, 20248-53, 2011.

**ורד יריחימוביץ**

1. Shapira, M., Lers, A., **Irihimovitch, V.** Heifetz, P. B., Osmond, C. B., Gillham, N.W. and Boynton, J.E. (1997). Differential Regulation of Chloroplast Gene Expression in *Chlamydomonas reinhardtii* during Photoacclimation: Light Stress Transiently Suppresses Synthesis of the Rubisco LSU Protein while Enhancing Synthesis of the PS II D1 Protein. *Plant Mol. Biol.* 33:1001-1011.
2. **Irihimovitch, V.** and Shapira, M. (2000) Glutathione Redox Potential Modulated by Active Oxygen Species Regulates Translation of Rubisco LSU in the Chloroplast. *J. Biol. Chem.* 275: 16289 -16295.
3. Yosef, I., **Irihimovitch V.**, Knopf, J.A., Cohen, I., Dahan, I., Nahum. E., Keasar, C. and Shapira M. (2004). RNA binding activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit from *Chlamydomonas reinhardtii* *J. Biol. Chem.* 278: 279:10148-56.

4. Cohen, I., Knopf, J.A., **Irihimovitch V.** and Shapira M. (2005). A proposed mechanism for the inhibitory effects of oxidative stress on Rubisco assembly and its subunit expression. *Plant Physiology*, 137:738-746.
5. **Irihimovitch, V.** and Stern, D.B. (2006). The sulfur acclimation SAC3 kinase is required for chloroplast transcriptional repression under sulfur limitation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:7911-7916.
6. Dahan, Y., Rosenfeld, R., Zadiranov, V and **Irihimovitch, V** (2010). A proposed conserved role for an avocado *fw2.2-like* gene as a negative regulator of fruit cell division. *Planta* 232: 663-676.
7. Sabag, M., Ben Ari G., Zviran, T., Biton, I., Goren, M., Dahan, Y., Sadka, A and **Irihimovitch, V** (2013). PaKRP, a cyclin-dependent kinase inhibitor from avocado, may facilitate exit from the cell cycle during fruit growth. *Plant Science* 213:18-29.
8. 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): e11061 doi:10.1371/journal.pone.0110613

יוספה שחק, קירה רטנר, הדר כהן

1. Gussakovsky, E.E., Salomon, E., **Ratner, K.**, Driesenaar, A.R.J., Malkin, S. and **Shahak, Y.** (1992) Photoinhibition (light stress) in citrus leaves. *Acta Horticulturae* 349: 139-143.
2. Nir, G., **Ratner, K.**, Gussakovsky, E.E. and **Shahak, Y.** (1997) Photoinhibition of photosynthesis in mango leaves: effect of chilly nights. *Acta Horticulturae*, 455(1): 228-235.
3. Gussakovsky, E. E., Barzda, V., **Shahak, Y.** and Garab, G. (1997) Irreversible disassembly of chiral microdomains in spinach thylakoids due to photoinhibition. *Photosynth. Res.*, 51: 119-126.
4. Gussakovsky, E.E. and **Shahak, Y.** (1999) Computational model for direct solar irradiation of canopy in dense orchard. *Acta Hortic.* 499: 289-296.
5. Allen, D.J., **Ratner, K.**, Giller, E.Y., Gussakovsky, E.E., **Shahak, Y.** and Ort, D.R. (2000) An overnight chill induces a delayed inhibition of photosynthesis at midday in mango (*Mangifera indica* L.) *J. Exp.Bot.*, 51: 1893-1902.
6. Michaeli, R., Philosoph-Hadas, S., Riov, J., **Shahak, Y.**, **Ratner, K.** and Meir, S. (2001) Chilling-induced leaf abscission of *Ixora coccinea* plants: III. Enhancement by high light via increased oxidative processes. *Physiol. Plantarum*, 113 (3): 338-345.
7. **Shahak, Y.**, Gussakovsky, E.E., Gal E. and Ganelevin R. (2004) ColorNets: crop protection and light-quality manipulation in one technology. *Acta Hortic.* 659 (1): 143-151.
8. Rajapakse, N.C. and **Shahak, Y.** (2007) Light quality manipulation by horticulture industry. In: *Light and Plant Development* (G. Whitelam and K. Halliday, eds.), pp. 290-312, Blackwell Publishing, UK.
9. Naschitz, S., Naor, A., Sax, Y., **Shahak, Y.** and Rabinowitch, H. (2015) Photo-oxidative sunscald of apple: effects of temperature and light on fruit peel photoinhibition, bleaching and short-term tolerance acquisition. *Scientia Hortic.* 197: 5-16.

10. **שחק, י.**, ניר, ג., גוסקובסקי, י., **רטנר, ק.** (1996) יישום שיטה חדשנית לא הרסנית לאיבחון מוקדם של נזקי קרינה ועקות בגידולי מטע. דוח מסכם למשרד המדע ולמדען הראשי של משרד החקלאות.
11. **שחק, י.**, פילוסו-הדס, ס., מאיר ש., קיפניס, ט., **רטנר, ק.**, גילר, י., גוסקובסקי, י., דוידזון, ה., מיכאלי, ר. (1998) בחינת טכנולוגיה לאבחון מוקדם של נזקי עקות בצמחים ויישומה ככלי שימושי בחקלאות. א. במערכות של פרחים קטופים וצמחי עציץ; ב. בצמחי כיסוי עשבוניים. דוח מסכם 201-0369-95/7 למדען הראשי של משרד החקלאות.
12. **שחק, י.**, **כהן, ה.**, דג, א., סלבצקי, י., לוינגרט-איצ'יצי, ע. (2009) כסוי מטעי אבוקדו ברשת לשיפור היבול ואיכות הפרי תוך הגנה מפגעי טבע. דוח מסכם לתכנית מחקר מספר 203-0670-09. הוגש למדען הראשי של משרד החקלאות.

1. רוטמן, א. נזקי הקרה באבוקדו. פירות, דפי מידע לנוטע, (פברואר 2008): 1-3.
2. Allen, D. J. *et al.* An overnight chill induces a delayed inhibition of photosynthesis at midday in mango (*Mangifera indica* L.). *J. Exp. Bot.* **51**, 1893–1902 (2000).
3. Nir, G., Ratner, K., Gussakovsky, E. E. & Shahak, Y. Photoinhibition of photosynthesis in mango leaves: Effect of chilly nights. in *Acta Horticulturae* **455**, 228–235 (1997).
4. שחק, י., כהן, ה., דג, א., סלבצקי, י., לוינגרט-איצ'יז'יי, ע. כסוי מטעי אבוקדו ברשת לשיפור היבול ואיכות הפרי תוך הגנה מפגעי טבע. דוח מסכם לתכנית מחקר מספר 203-0670-09. הוגש למדען הראשי של משרד החקלאות (2009).
5. Feng, Y. L. & Cao, K. F. Photosynthesis and photoinhibition after night chilling in seedlings of two tropical tree species grown under three irradiances. *Photosynthetica* **43**, 567–574 (2005).
6. Allen, D. J. & Ort, D. R. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science* **6**, 36–42 (2001).
7. Michaeli, R. *et al.* Chilling-induced leaf abscission of *Ixora coccinea* plants . III . Enhancement by high light via increased oxidative processes. *Physiol. Plant.* **113**, 338–345 (2001).
8. Savvides, A., Ali, S., Tester, M. & Fotopoulos, V. Chemical Priming of Plants Against Multiple Abiotic Stresses: Mission Possible? *Trends in Plant Science* (2015). doi:10.1016/j.tplants.2015.11.003
9. Hossain, M. A. *et al.* Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. *Front. Plant Sci.* **6**, 19 (2015).
10. Ishibashi, Y. *et al.* Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants. *J. Plant Physiol.* **168**, 1562–1567 (2011).
11. Gechev, T. *et al.* Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 708–714 (2002).
12. Iseri, O.D., Korpe, D.A., Sahin, F.I., Haberal, M. Hydrogen peroxide pretreatment of roots enhanced oxidative stress response of tomato under cold stress. *Acta Physiol Plant* **35**, 1905–1913 (2013).
13. Gondim, F. A., Miranda, R. de S., Gomes-Filho, E. & Prisco, J. T. Enhanced salt tolerance in maize plants induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> leaf spraying is associated with improved gas exchange rather than with non-enzymatic antioxidant system. *Theor. Exp. Plant Physiol.* **25**, 251–260 (2013).
14. Fotopoulos, V., Christou, A., Manganaris, G. in *Molecular Approaches in Plant Abiotic Stress* (ed. Gaur R.K., S. P.) 353–373 (CRC Press, 2013).
15. Reddy, A. S. N., Ali, G. S., Celesnik, H. & Day, I. S. Coping with stresses: roles of calcium- and calcium/calmodulin-regulated gene expression. *Plant Cell* **23**, 2010–2032 (2011).
16. Miura, K. & Furumoto, T. Cold signaling and cold response in plants. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 5312–5337 (2013).
17. Zhang, G. *et al.* Exogenous calcium alleviates low night temperature stress on the photosynthetic apparatus of tomato leaves. *PLoS One* **9**, (2014).
18. Yang, S. *et al.* Exogenous Calcium Alleviates Photoinhibition of PSII by Improving the Xanthophyll Cycle in Peanut (*Arachis Hypogaea*) Leaves during Heat Stress under High Irradiance. *PLoS One* **8**, (2013).
19. Chen, H. X., Li, P. M. & Gao, H. Y. Alleviation of photoinhibition by calcium supplement in salt-treated *Rumex* leaves. *Physiol. Plant.* **129**, 386–396 (2007).
20. Tan, W., Meng, Q. wei, Brestic, M., Olsovska, K. & Yang, X. Photosynthesis is improved by exogenous calcium in heat-stressed tobacco plants. *J. Plant Physiol.* **168**, 2063–2071 (2011).
21. Yang, S. *et al.* Calcium contributes to photoprotection and repair of photosystem II in peanut leaves during heat and high irradiance. *J. Integr. Plant Biol.* **57**, 486–495 (2015).