

חקר מנגנונים המשפיעים על תהליך חלוקת התאים ועל גודל פרי באבוקדו 'האס'

מוגש לקרן המדע הראשי במשרד החקלאות

ע"י

ורד יריחמוביץ : המחלקה למטעים מינהל המחקר החקלאי בית דגן

ליאו וינר : שה"ם

אדולפו גבריאלי : מ"ופ גליל מערבי

משה גורן : 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

Leo Winer : Extension service, Israel, Ministry of Agriculture,

E-mail: leowin@shaham.moag.gov.il

Adolfo Gabriel Levin : Agricultural R&D Western Galilee, Agricultural experimental farm, D.N

Oshrat 25212 , E-mail adolfolevin@gmail.com

Moshe Goren: Horticulture Department. The Institute of Plant Sciences –ARO

Bet Dagan 50250 E-mail: goren@agri.gov.il

June 2014

תמוז תשע"ד

פרסומים

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

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים כן/לא

חתימת החוקר :

תקציר

הצגת הבעיה: אחת הבעיות העיקריות בזן האבוקדו 'האס' הינה בעיית גודל פרי. אחוז גבוה מכלל הפירות לעץ הינם בעלי משקל סופי נמוך. הגורם המגביל את התפתחות הפירות הקטנים אינו גידול התאים אלא עיכוב בתהליך חלוקתם. פירות קטנים מתאפיינים ברמת סוכרוז ואוקסין (IAA) נמוכות וברמות חומצה אבסיסית (ABA) גבוהות, זאת בהשוואה לפירות גדולים. שינויים אלו עשויים להשפיע על מערך חלוקת התאים ועל גודל הפרי. בעבודה קודמת דיווחנו על בידודו גן מאבוקדו *Pafw2.2-like* החולק הומולוגיה לגן *fw2.2* מעגבנייה, המשמש כבקר שלילי של חלוקת תאים בפרי. אנליזות ביטוי שערכנו הובילה אותנו למסקנה כי *Pafw2.2-like* עשוי לקודד לחלבון הפועל באופן דומה ל- *FW2.2* מעגבנייה ולבקר, באופן שלילי את חלוקת התאים באבוקדו. מטרות ושיטות: מחקר המשך זה הציע א. שיבוט גנים נוספים מאבוקדו המקודדים לחלבונים הקשורים לתהליך חלוקת תאים, תוך כדי שימת דגש מיוחד על בידוד גנים המקודדים לחלבונים המדכאים חלוקת תאים (KRP/ICKs) ב. בחינת בקרת שעתוק הגן *Pafw2.2* ג. שילוב טיפולי ציטוקינין וטריפטופאן ואיפיון השפעת הטיפולים על ביטויים של הגנים הקשורים לתהליך חלוקת תאים ועל גודל הפרי הסופי. במהלך שלוש שנות המחקר התמקדנו בסופו של דבר בעיקר בביצוע שלבי מחקר א' ו-ג'.

תוצאות עיקריות מחקר הבסיסי: שובטו ארבעה גנים מאבוקדו המקודדים לכאורה לחלבוני *CDKB1*, *CDKA*, *ICK/KRP* ו-*CYCD1*. המידע שהתקבל מבדיקת דגם ביטויים של גנים אלו, במהלך התפתחות הפרי, מציע תובנות חדשות לגבי המכניזם המבקר חלוקת תאים באבוקדו. מידע זה קושר את חלבון *PaKRP/ICK* עם היציאה ממחזור חלוקת התאים, ומורה כי עלייה מוגברת בביטוי *PaKRP* עשויה להיות מבוקרת ע"י ABA. בהתבסס על תוצאותינו, אנו משערים כי היקשרות חלבון *PaKRP* לחלבוני D-type-Cyclins שונים, המהווים חלק מתצמידי *CDKA/CYCD* מובילה לשיבוש פעילותם, מונעת את המעבר לשלב G1/S ומדכאת את תהליך חלוקת התאים. יש לציין כי תוצאות עבודה זו לא רק שופכות אור על תפקידה האפשרי של חומצה אבסיסית בבקרת תהליך חלוקת תאים בפירות קטנים, אלא מורות שככל הנראה שינויים ברמת ABA, המווסתים ע"י שינויים בין קצב סינטזת ופירוק ההורמון, משחקים תפקיד בבקרת חלוקת התאים בשלבים ראשוניים של התפתחות הפרי. הקשר האפשרי בין פעילות *Pafw2.2* ב"מעלה הזרם ו-*PaKRP* ב"מורד הזרם" המוביל לכאורה למיתון תהליך חלוקת התאים בפרי ולפנוטיפ פרי קטן, מוצג בדיון.

תוצאות עיקריות מחקר יישומי: בוצעו ניסיונות שדה לבדיקת השפעת יישום טריפטופאן, לצורך הגדלת פרי וייבול. תוצאות הניסויים שהתקבלו באתרי הניסוי השונים הראו מגמה מעורבת. מכלול הנתונים הורה כי טיפול טריפטופאן בסוף פריחה, השפיע באופן חיובי, אך לא תמיד מובהק, על רמת הייבול הכללי. מסקנות: לא ניתן להשתמש בתוצאות שהושגו במסגרת תוכנית זו ולהפכם להמלצות לטיפול. יש לשנות את מתכונת הניסויים ולבצע תחילה ניסויים ברמת העץ במשך כמה עונות ורק לאחר מכן ניסויי שטח בקנה מידה גדול. בתהליך עיבוד התוצאות יש לקחת בחשבון את עומס הפרי בעצים בעונות הניסוי השונות כמו גם את עומס הפרי בעצים השונים לאורך שורות הניסוי.

1. מבוא ותיאור הבעיה: הזן 'האס' (*Persea americana* Mill. cv Hass) מהווה מרכיב עיקרי בין זני האבוקדו בארץ ובעולם. לזן זה פוריות סבירה, טעם ומירקם טובים ועונת שיווק מתאימה, אולם הוא מתאפיין בסירוגיות גבוהה ובגודל פרי קטן. גודל הפרי הינו בעייתי בזן זה כיוון שאחוז גבוה מכלל הפירות המתקבלים הינם בעלי משקל סופי הנמוך מ- 220 גר'. פירות 'האס' קטנים מתפתחים באופן אקראי בחלקי העץ השונים, כאשר הבדלי הגודל בין פירות גדולים וקטנים ניתנים לזיהוי בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרי. מחקר אנטומי השוואתי שנערך בזן 'האס' הוביל למסקנה כי הגורם המגביל את התפתחות הפירות הקטנים אינו גידול התאים אלא עיכוב בתהליך חלוקתם (1). ממצא זה הוביל לסדרת עבודות שנערכה במטרה לנסות ולאפיין שינויים מטבולים החלים בפירות קטנים, אשר עשויים להשפיע על מערך חלוקת התאים בפרי. ממצאי עבודות אלו הראו כי בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרי, פירות קטנים מתאפיינים ברמות סוכרוז ואוקסין (IAA) נמוכות, אך ברמת חומצה אבסיסית (ABA) גבוהה, זאת בהשוואה לפירות גדולים (2-8). שינויים מטבוליים אלו עשויים להשפיע על מערך חלוקת התאים ועל גודלו הסופי של הפרי.

הפעילות הבסיסית של מחזור חלוקת התאים תלויה ביצירת קומפלקסים בין חלבונים ממשפחת הציקלינים (Cyclins) וחלבונים הנקראים CDKs (Cyclin Dependent Kinases) המאפשרים את התקדמות מחזור חלוקת התא. גודלו הסופי של פרי תלוי בבקרת ביטויים של גנים הקשורים למערך חלוקת התאים. ככלל, ביטויים של הגנים אלו משתנה בהתאם לשלבי התפתחות הפרי ובהתאם לשינויים במאזן חומרי הצמיחה ובמאזן הסוכרים (9-10). למרות הידע הקיים בספרות אודות שינויים מטבולים העשויים לבקר את תהליך התפתחות הפרי באבוקדו, המידע אודות מנגנונים מולקולריים המבקרים את תהליך חלוקת התאים וגדילת הפרי באבוקדו היה עד כה מצומצם ביותר. בעבודה קודמת שערכנו שיבטנו באופן מלא שני גנים: *PaCYCA1* ו-*PaCYCB1* המקודדים לחלבוני ציקלין A1 ו-B1 וגן שלישי *PaPCNA*, המקודד לחלבון PCNA (Proliferation Cell Nuclear Antigen), המשתתף בשכפול ה-DNA ומשמש כסמן לחלוקת תאים. באנליזת שערנו, הראנו כי במהלך התפתחות פירות גדולים חלה ירידה הדרגתית בביטוי גנים אלו, במקביל לירידה בפעילות חלוקת תאים. מאידך, ברקמת פירות קטנים, ביטויים של גנים אלו היה נמוך מלכתחילה ובהתאם גם נצפתה עצירה מוקדמת של חלוקת תאים בפרי. במקביל, איתרנו גן נוסף מאבוקדו (*Pafw2.2-like*) החולק הומולוגיה גבוהה לגן *fw2.2* (*fruit weight 2.2*) מעגבנייה, המשמש כבקר שלילי של חלוקת תאים בפרי (11-12). נמצא כי במהלך התפתחות הפרי, *Pafw2.2-like* מתבטא ביתר ברקמות פרי קטן, בהשוואה לרקמות פרי גדול. ממצא זה מרמז כי- *Pafw2.2-like* עשוי לקודד לחלבון הפועל באופן דומה ל-FW2.2 מעגבנייה, קרי, כבקר שלילי של חלוקת תאים בפרי (13). אופן בקרת גנים שבודדנו אינו ידוע ואנו משערים כי קיים קשר בין שינויים במאזן הסוכרים ובמאזן ההורמונלי בפרי ובין ביטוי גנים אלו. גנים נוספים הקשורים למערך חלוקת התאים בפרי, כגון גנים המקודדים לחלבונים הנקראים ICK/KRPs (Inhibitors of Cyclin Dependent Kinases/Kip) ומדכאים את מערך חלוקת תאים, לא בודדו עד כה מאבוקדו. ניתן לשער כי בפרי המתפתח קיים קשר בין ביטוי ו/או פעילות *Pafw2.2-like* ופעילות ו/או ביטוי חלבוני ICKs. הבנה מעמיקה של פעילות

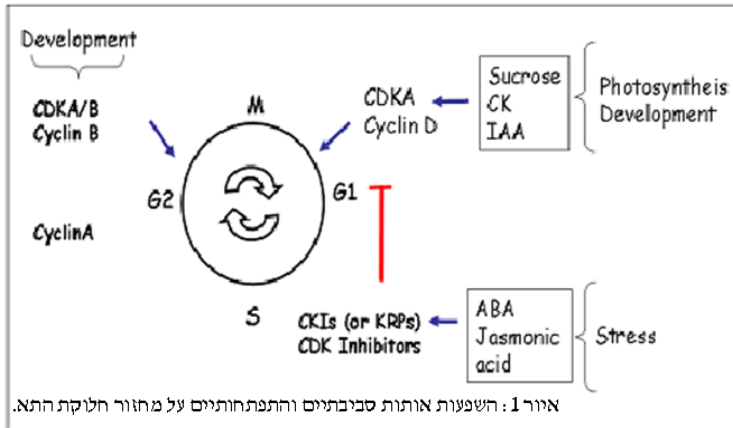
מנגנונים המבקרים את חלוקת התאים בפרי מהווה בסיס להבנת גורמים המשפיעים על גודלו הסופי. להלן סקירת ידע בנושאים הרלוונטים להצעת המחקר הנוכחית.

2.2 סקירת ידע . 2.2.1 בקרה מטבולית של התפתחות פרי באבוקדו 'האס'. ברוב מיני הפירות חלוקת התאים מתרחשת במשך תקופה קצרה לאחר חנטת הפרי ובהמשך מימדי הפרי גדלים בעקבות גידול התאים. באופן יוצא דופן, באבוקדו חלוקת התאים נמשכת במהלך כל שלבי התפתחות הפרי, אם כי קצבה מואט בשלבים המאוחרים, ולכן לא קיימת באבוקדו הפרדה בין שלב חלוקת תאים ושלב התרחבות התאים (1,2,14). כפי שצויין, הגורם המגביל את התפתחות הפירות הקטנים אינו גידול התאים אלא עיכוב בתהליך חלוקתם (1). מהספרות ידוע כי מערך חלוקת התאים בפרי מבוקר על ידי הורמונים צמחיים המיוצרים בחלקי הצמח השונים. ואמנם, בבדיקות שנערכו בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרי ב'האס', נמצא כי זרעי פירות קטנים מתאפיינים ברמות סוכרוז נמוכות, בירידה בייצור /צבירת IAA ובעלייה בייצור /צבירת ABA, זאת בהשוואה לפירות גדולים (2,4,7,8). כיוון שסוכרים ואוקסין ידועים כפקטורים צמחיים המעודדים התרחבות וחלוקת תאים, בעוד לחומצה אבסיסית אפקט המעכב חלוקת תאים, נטען כי שינויים אלו מהווים גורמים מכריעים המשפיעים על תהליך חלוקת התאים ועל גודל הפרי הסופי. פרי מתפתח מתפקד כמבלע סופי הדורש מטבוליטיים משניים, קרבוהידרטים והורמונים צמחיים המשפיעים באופן ישיר או עקיף על מערך התבטאות גנים במהלך התפתחותו. ברוב מיני הצמחים, סוכרוז, המצטבר בתהליך הפוטוסינתזה ומהווה כ 90% מכלל המומסים בשיפה המועבר לפרי המשמש מבלע. כאמור, נמצא כי רמת הסוכרוז בזרעי פירות קטנים נמוכה מרמתו בפרי הגדול (8). חוסר היכולת לייצר/לצבור IAA ויצירת / צבירת ABA בפירות קטנים עשויים להפר את האיזון ההורמונלי הדרוש לחלוקת תאים תקינה. השאלות הנשאלות הן האם השינוי ברמת הסוכרים בפרי הינו הגורם לשינוי במאזן ההורמונאלי, או שהוא התוצאה משינוי זה?

2.2.2 מחזור חלוקת התא ובקרתו בתאי צמח. מחזור התא כולל מספר שלבים: (I) שלב G1- שלב מקדים לחלוקת ה-DNA בו התא גדל בנפחו. (II) שלב S- שלב הכפלת ה-DNA. (III) שלב G2- שלב לאחר הכפלת ה-DNA בו התא מתכוון לחלוקה. (IV) שלב M- מיטוזה וציטוקינזה. הפעילות הבסיסית של מחזור התא מתאפשרת הודות ליצירת קומפלקסים חלבוניים בין חלבוני הציקלינים וחלבוני CDKs אשר אחראיים לזרחון סובסטרטים ספציפיים המאפשרים את התקדמות מחזור חלוקת התא. נקודות הביקורת העיקריות במהלך חלוקת התא הן המעבר מ-G1 ל-S ומ-G2 ל-M. בצמחים קיים מגוון רחב של חלבוני ציקלינים, לדוגמא: גנום הארדבידופסיס מקודד ל-49 חלבוני ציקלינים שונים המשווייכים ל-10 משפחות (15). באופן כללי ידוע כי חלבוני CycD מבקרים את המעבר משלב G1 לשלב S, חלבוני CycA חשובים למעבר משלב S ל-M וחלבוני CycB מבקרים את המעבר משלב G2 לשלב M (10). מספר חלבוני ה-CDKs בצמחים אף הוא מגוון. חלבונים אלו משוייכים לפחות ל-7 משפחות שונות, מתוכם נציגים מ-4 משפחות משתתפים באופן פעיל במחזור חלוקת התא. ככלל, חלבוני CDKA הינם הומולוגים פונקציונליים לחלבוני $p34^{CDC2/CDC28}$ משמרים, המבקרים את המעברים מ-G1 ל-S ומ-G2 ל-M, ואילו חלבוני CDKB הינם חלבונים צמחיים יחודיים בעלי תפקיד מרכזי בבקרת המעבר מ-G2 ל-M (16).

פעילות מחזור התא מבוקרת במספר רמות בקרה. **בקרה ברמת השעתוק** – ידוע כי ביטויים של הגנים השונים הקשורים למערך חלוקת התאים מושפע משינויים במאזן הסוכרים ובמאזן ההורמונאלי. לדוגמה, במחקר שנעשה בארבידופסס, דווח כי מתן חימוני של CK בנוסף לסוכרוז הביא לעלייה ברמת השעתוק של *CycD3*, ולעלייה בפעילות המיטוטית (17). מאידך,

הורמונים כגון ABA וחומצה ג'סמונית, מבקרים באופן שלילי את תהליך חלוקת התאים. כך לדוגמה מחקרים שנערכו בצמחי מודל הראו קורלציה במספר מקרים בין עלייה ברמת ABA ועלייה בביטוי גנים המקודדים לחלבוני ICKs (הנקראים גם KRP (Kip Related Proteins)), המדכאים את הפעילות המיטוטית (18-19) (ראה איור 1). יתכן כי תופעה דומה מתרחשת בפירות 'האס' קטנים בעקבות עלייה ברמת ה-ABA.



Adapted from Inze, D The EMBO Journal (2005)

בקרה ברמה שלאחר תרגום: פעילות הקומפלקסים CDK/CYCD מבוקרת ברמה שלאחר תרגום באופן חיובי או שלילי. כך לדוגמה, זרחון חלבון CDKA בשייר טראונין שמור (Thr 161), מאקטב את פעילות הקומפלקס, ואילו זרחון שייר טירוזין שמור (Tyr 15), מונע את פעילותו (9-10). בנוסף וכפי שצויין להלן, קישורם של חלבוני ICKs (KRPs) לחלבונים ממשפחת CYCD ו/או לחלבוני CDKs מדכא אף הוא את פעילות הקומפלקס ועל ידי כך מעכב ו/או מפסיק את תהליך חלוקת תאי הצמח (18-22). גני ICK/KRPs ממניי צמחים שונים, מקודדים לחלבונים קטנים יחסית החולקים הומולוגיה גבוהה בעיקר באזור ה-C טרמינלי, בו מצויים רצפים שמורים המאפשרים את קישור החלבון לקומפלקס CDK/CYC. יש לציין כי עד כה המחקר אודות חלבונים אלו בוצע בעיקר בצמחי מודל, שכן מדובר בקבוצת חלבונים "חדשה" יחסית שהנציג הראשון שלה אופיין רק לפני כ- 10 שנים (18-19). למיטב ידיעתנו, לא בודדו עד כה גנים מאבוקדו המקודדים לחלבוני ICK/KRPs ולא אופיין ביטויים במהלך התפתחות הפרי.

2.2.3 fw2.2 - בקר שלילי של חלוקת תאים בפרי. בעגבנייה מופו מספר QTLs (Quantitative trait locus) הקשורים לשינויים בגודל הפרי. אחד מהם מופה בכרומוזום 2 ונקרא *fw2.2* (Fruit weight 2.2). שיבוט *fw2.2* חשף כי QTL זה משפיע באמצעות גן יחיד (*fw2.2*), המקודד לחלבון ממברנאלי, הפועל כבקר שלילי של חלוקת תאים בפרי (11). עבודה שבוצעה בעגבנייה הדגימה כי תזמון העלייה בביטוי ה-mRNA של *fw2.2* נמצא בקורלציה הפוכה עם הפעילות המיטוטית בפרי המתפתח (23). בעבודות נוספות הועלתה ההשערה כי ל-*fw2.2* תפקיד בקרתי והוא עשוי לשמש כ"סנסור" הפועל במעלה הזרם ולבקר את מחזור התא במהלך התפתחות הפרי בתגובה לשינויים באספקת הסוכרים ו/או ההורמונים. כאמור,

גם בעבודה שערכנו אנו באבוקדו איתרנו גן (*Pafw2.2*) החולק הומולוגיה גבוהה לגן *fw2.2* מעגבנייה ומצאנו כי במהלך התפתחות הפרי *Pafw2.2* מתבטא ביתר ברקמות פרי קטן, בהשוואה לרקמות פרי גדול. ממצאנו מרמזים כי *Pafw2.2* עשוי לקודד לחלבון הפועל באופן דומה ל-*fw2.2* מעגבנייה, קרי, כבקר שלילי של חלוקת תאים בפרי (13). כיוון שבאבוקדו פירות קטנים מתאפיינים בירידה ברמת הסוכרוז ובעלייה ביצירת ABA (1-8), ניתן לשער כי ביטוי ביתר של *Pafw2.2* בפירות קטנים עשוי להיות מבוקר ע"י שינויים במאזן הסוכרים ו/או ההורמונים. בנוסף ניתן לשער כי קיים קשר בין פעילות ו/או ביטוי *Pafw2.2*-like ב"מעלה הזרם" ופעילות ו/או ביטוי חלבוני ICKs ב"מורד הזרם", כאשר התוצאה הסופית הינה עיכוב חלוקת תאים בפרי.

3. מטרות המחקר: בעיית גודל פרי בזן 'האס' מהווה בעייה חקלאית מרכזית המשפיעה במידה ניכרת על רווחיות הגידול. כאמור, שיבוש בתהליך הנורמלי של חלוקת התאים בפרי הינו הגורם המרכזי התורם לפנוטיפ פרי קטן בזן 'האס'. שיבוטם ואיפיונם של גנים המשתתפים בתהליך חלוקת התאים מאפשר לנו להמשיך ולאפיין את הקשר בין שינויים במאזן הסוכרים וההורמונים ובין עיכוב תהליך חלוקת התאים בפירות קטנים ולחקור מנגנונים נוספים אשר עשויים להיות מעורבים בבקרת תהליך זה. **בהתאם מחקר המשך זה הציע:** א. שיבוט גנים נוספים מאבוקדו המקודדים לחלבונים הקשורים לתהליך חלוקת תאים, תוך כדי שימת דגש מיוחד על בידוד גנים המקודדים לחלבונים המדכאים חלוקת תאים (KRP/CKs), ואיפיון דגם ביטויים במהלך התפתחות פירות גדולים וקטנים. (* הוצע בנוסף איפיון פונקציונלי של חלבוני KRP/ICK). ב. בחינת בקרת שעתוק הגן *Pafw2.2* - התמקדות בשיבוט ובאיפיון הפרומוטור של הגן. ג. שילוב טיפולי ציטוקינין וטריפטופאן ואיפיון השפעת הטיפולים על ביטויים של הגנים הקשורים לתהליך חלוקת תאים ועל גודל הפרי הסופי. בטווח הקצר ניתן להניח כי תוצאות מחקר זה יאפשרו הבנה עמוקה יותר של הבקרה על חלוקת תאים והשפעתה על גודל פרי באבוקדו. בטווח הארוך שילוב מחקר בסיסי ומעשי עשויים להגדיל את הסיכויים למציאת פרוטוקולים שיאפשרו התמודדות יעילה עם בעייה חקלאית זו.

במהלך שלוש שנות המחקר התמקדנו בסופו של דבר בעיקר בביצוע שלבי מחקר א' ו-ג'. מוצגים פירוט הניסויים והתוצאות הקשורים לשלב א' של המחקר המוצע

4. פירוט עיקרי הניסויים - חלק א' תוצאות ודיון:

4.1 בידוד גנים הקשורים למערך חלוקת התאים. בעבודת המחקר שביצענו בעבר, בודדנו ואיפיינו מספר גנים הקשורים למערך חלוקת התאים בפרי. במסגרת מחקר המשך זה, הצענו להמשיך ולבודד גנים נוספים הקשורים למערך חלוקת התאים ביניהם: גנים המקודדים לחלבוני ICK/KRPs, לחלבוני CDKs ולציקלינים ממשפחה D ולאפיין את פרופיל ביטויים ההתפתחותי, בפירות גדולים וקטנים. אנליזת Blast שערכנו (באתר NCBI), הובילה למציאת מספר ESTs המקודדים לכאורה לחלבונים אלו. בהמשך, שיבוטם של גנים אלו בוצע בשיטת RT-PCR, על ידי שימוש בפרים ספציפים, ו/או ע"י שימוש בפרים דגנרטיביים (במידה ולא נמצא EST תואם). השלמת ריצוף הגנים המלאים בוצעה על ידי שימוש בשיטת

5'RACE ו-3'RACE. לצורך שיבוט הגנים המקודדים ל-CDKs ולציקלין D, השתמשנו ב-cDNA שסונטז מרקמת פירות גדולים, בהן ניתן היה לצפות ביטוי מוגבר של גנים אלו. ואילו, לצורך שיבוט הגן המקודד לחלבון ICK/KRP, השתמשנו ב-cDNA שהופק מרקמת פירות קטנים, בהן צפינו למצוא ביטוי מוגבר של תעתיק זה. הגנים המלאים שבודדנו כונו- *PaKRP/ICK*, *PaCDKA*, *PaCDKB1* ו-*PaCYCD1*. אנליזות פילוגנטיות שערכנו אימתו גם הן את זהות הגנים (לא מוצג).

הגן *PaKRP/ICK*: איפיון חלבוני KRP/ICKs הראה כי קיימים בהם איזורים שמורים הקשורים בפעילות החלבון ובבקרתו (25-26). בפרט, בבדיקת רצף הגן המתורגם, המקודד לחלבון PaKRP מאבוקדו, נמצאו שישה מוטיבים כאלו (25-26). בין מוטיבים הללו ניתן למצוא את המוטיבים 1 ו-2, המצויים באזור ה-C טרמינלי של החלבון ומאפשרים את קישור החלבון לחלבוני CYCD ו/או CDKA, בהתאם; את המוטיבים 7 ו-8 הנמצאים בקצה ה-N טרמינלי של החלבון ואחראים על מיקומו בגרעין התא; ואת המוטיבים 5 ו-9 אשר תפקידם המוגדר עדיין אינו ידוע (ראה איור 1 בנספח). **הגנים *PaCDKA* ו-*PaCDKB1*:** השוואת רצף הגן המתורגם PaCDKA עם רצף הגן המתורגם PaCDKB1 מוצגת באיור 2 (בנספח). השוואה זו מדגימה כי כי החלבונים חולקים רמת דימיון גבוהה, אולם בעוד PaCDKA מכיל באיזור ה-N טרמינלי את הרצף PSTAIRE, הדרוש לצורך הקישור לחלבוני ציקלין ומאפיין את חלבוני CDKA, חלבון PaCDKB מכיל את הרצף השמור PPTALRE המאפיין את חלבוני CDKB1 (16). **הגן *PaCYCD1*:** השוואת רצף החלבון המשוער PaCYCD עם חלבוני ציקלין ממייני צמחים שונים מוצגת באיור 3 (ראה נספח). כפי שניתן לראות החלבון המשוער PaCYCD1, מכיל מספרים רציפים שמורים החשובים לפעילות החלבון, ביניהם הרצף השמור LxCx(D/E), המצוי באזור ה-N טרמינלי של מרבית חלבוני CYCD, ומאפשר את קישורם לחלבון הרטינובלסטומה (9-10,15). בנוסף, החלבון מכיל את הרצף השמור WILKV(H/Q)E המכונה גם Cyclin box, הדרוש לצורך קישור עם חלבוני CDK.

4.2 בחינת דגם הביטוי ההתפתחותי של הגנים *PaCYCD1*, *PaCDKB*, *PaCDKA*, *PaKRP* במהלך התפתחות הפרי.

לאחר בידוד הגנים המקודדים לחלבוני ICK/KRP, CDKs ו-CYCD ביצענו אנליזות לבדיקת דפוס ביטויים ההתפתחותי. אנליזות אלו בוצעה בשיטת RT-PCR ו/או בשיטת Northern. בבדיקות אלו נעשה שימוש ב-RNA אשר הופק מרקמת הזרע של פירות קטנים וגדולים שנדגמו במהלך תקופת הגידול ממטע 'האס' הנטוע ביד חנה. בעבודות קודמות, דווח על קיום "חלון זמן פסיולוגי", בין 60-90 יום לאחר פריחה מלאה, בו ניתן להבחין באופן ויזואלי בשונות בין פירות גדולים וקטנים. כאן, ניתן היה לזהות הבדלים בין פירות גדולים וקטנים, כבר לאחר 63 יום אחרי פריחה מלאה (יל"פמ). בהתאם, איסוף הפרי וחלוקה לקבוצות דיגום של פירות גדולים וקטנים החלה מנקודת זמן זו (ראה איור 1). אנליזות Real-time PCR הראו כי ברקמות פירות גדולים ביטוי *PaKRP/ICK* היה גבוה בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרי וירד בהדרגה בהמשך.

במקביל, ברקמות פירות קטנים, דפוס ביטוי הגן היה דומה, אולם מלכתחילה, רמת ביטוי *PaKRP* הייתה גבוהה יותר בשלבי התפתחות מוקדמים (ראה איור מספר 2).

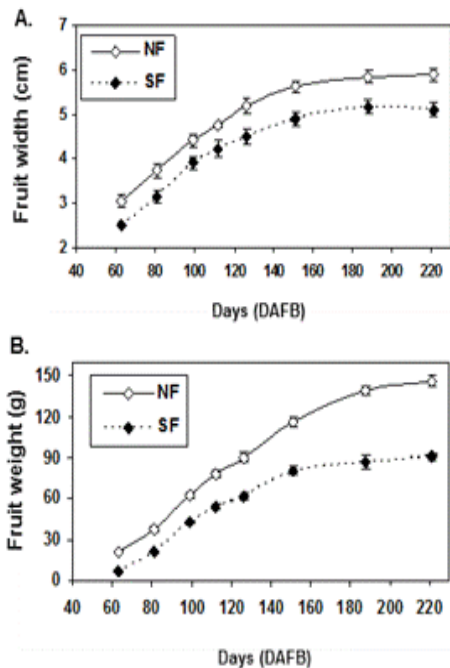


Fig 1. fruit growth curves. Increases in NF and SF width (A) and fresh weight (B) were measured during fruit development period. Fruit collection is recorded as DAFB. Values at each time point represent the mean $\pm$ SE of 12 detached fruits.

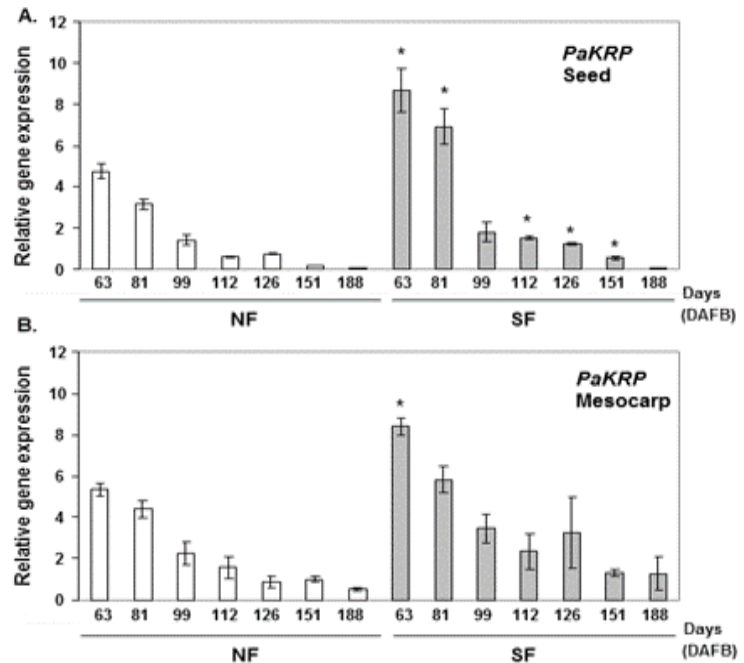


Fig 2. Expression analysis of the *PaKRP* transcript in fruit tissues collected from NF and SF at different stages of fruit development. Real-time PCR was performed using cDNA prepared from total RNA extracted from seed (A) and mesocarp (B) tissues. Columns represent the relative expression levels normalized against *PaACT* levels. Data are means $\pm$ SE from three independent biological replicates. Stars denote a significant difference between NF and SF at the same sampling point ($P \leq 0.05$).

יש לציין כי בעבודות קודמות דווח כי עלייה ברמת הביטוי של גנים המקודדים לחלבוני ICK/KRP, המתרחשת בשלבי היציאה משלב חלוקת התאים, נמצאת בקורלציה עם ירידה ברמת ביטויים של תעתיקי *CDKs* ו-*CYCD*. בכדי לבחון אם תופעה דומה נצפית במהלך התפתחות פרי באבוקדו, בחנו את דגם ביטויים של הגנים המקודדים לחלבון ציקלין מסוג-D ולחלבוני *CDKs* במהלך התפתחות פירות גדולים וקטנים. תוצאות אנליזות Northern לבחינת ביטוי הגנים הללו ברקמת הזרע, מוצגות באיור 3. כפי שניתן לראות, תוצאות שהתקבלו הראו כי במהלך התפתחות הפרי חלה ירידה הדרגתית בביטוי גנים אלו בזרעי פירות גדולים, במקביל לירידה בפעילות חלוקת התאים. לעומת זאת, ברקמות הזרע של פירות קטנים ביטויים של גנים אלו היה נמוך מלכתחילה. תוצאות דומות הושגו כאשר נערכה אנליזה בציפת הפרי (לא מוצג).

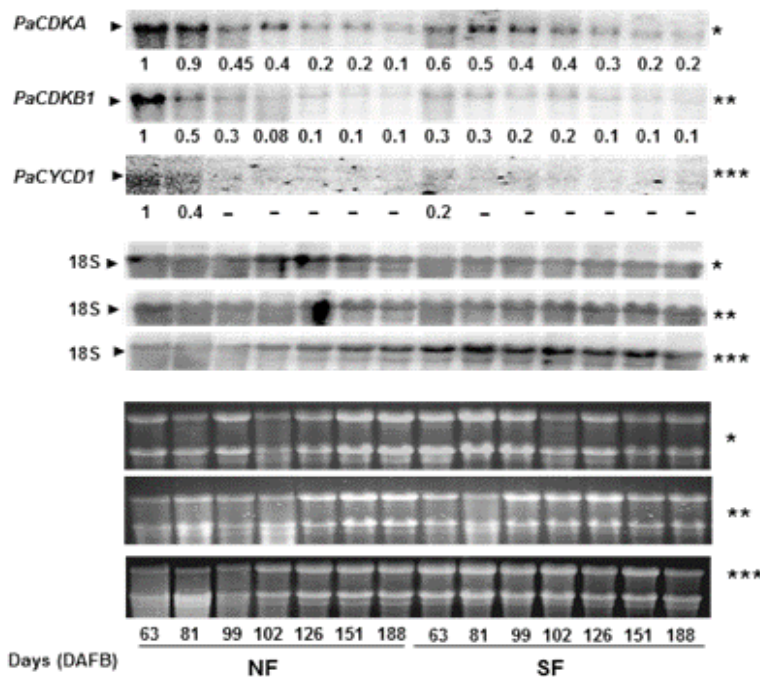


Fig 3. Expression analysis of *PaCDKA*, *PaCDKB1* and *PaCYCD1* transcripts in seed tissues collected from NF and SF at different stages of fruit development. Fifteen mg of total RNA isolated from the indicated samples were separated by electrophoresis, blotted onto a membrane and initially hybridized with the probes shown on the left. Three filters were used and subjected to re-probing for 18S rRNA. The identity of each filter is denoted by asterisks to the right of the blots. The signals corresponding to the different genes were normalized to 18S rRNA levels, with the initial times set as 1.0. The number beneath each lane shows the ratio of mRNA accumulation for each track. Ethidium bromide-stained gels, corresponding for each filter are shown.

תוצאות אלו עולות למעשה בקנה אחד עם תוצאות קודמות מעבודתינו, שהראו כי ביטוי הגנים המקודדים לחלבוני ציקלין מסוג A ו-B יורד באופן הדרגתי במהלך התפתחות פירות גדולים, במקביל לירידה בפעילות חלוקת התאים, אך לעומת זאת, ברקמות הזרע של פירות קטנים, ביטויים של גנים אלו נמוך מלכתחילה (13). יתר על כן, תוצאות אלו מורות כי קיים ככל הנראה קשר בין ביטוי מוגבר של *PaKRP/ICK* בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרי הקטן, ובין דיכוי מוקדם של ביטויים של הגנים

המקודדים לחלבוני CYCD1 ו-CDKs

4.1.2 בחינת דגם הביטוי של הגנים *PaCDKA*, *PaCDKB1*, *PaCYCD1* ו-*PaKRP/ICK* ברקמות וגטיביות. לאחר בחינת

דגם ביטויים של הגנים *PaCDKA*, *PaCDKB1*, *PaCYCD1* ו-*PaKRP/ICK* במהלך התפתחות הפרי, כדי להעמיק את ההבנה הקשר לתפקיד אותו ממלאים גנים אלו במהלך התפתחות איברים שונים בצמח, בחרו לבחון את דגם ביטויים גם ברקמות וגטיביות. התוצאות שהתקבלו הראו כי בסך הכל ביטוי הגן *PaKRP* היה גבוה יותר ברקמות בוגרות, בהן הפעילות המיטוטית נמוכה, בהשוואה לביטוי ברקמות צעירות יותר (לא מוצג). בנוסף, אנליזת Northern שבחנה את ביטוי הגנים המקודדים לחלבוני CDKs ו-*PaCYCD1* הראתה כי רמות ביטויים היו גבוהות ברקמות העלים הצעירים בהשוואה לבוגרים (לא מוצג). לפיכך ובהנחה ש-*PaCDKB1* פועל אמנם בשלב המבקר את המעבר G2/S, התוצאות שהתקבלו קושרות את הגן *PaKRP* עם תהליך היציאה משלב חלוקת תאים, גם ברקמות וגטיביות.

4.1.3 בדיקת אינטראקציות חלבון-חלבון: אנליזות Y2H (Yeast two-hybrid) שנערכו במספר עבודות הראו כי כל

חלבוני ICK/KRP, ללא יוצא מן הכלל, מסוגלים לעבור אינטראקציה עם חלבוני CYCD וכי חלקם מסוגל להיקשר גם

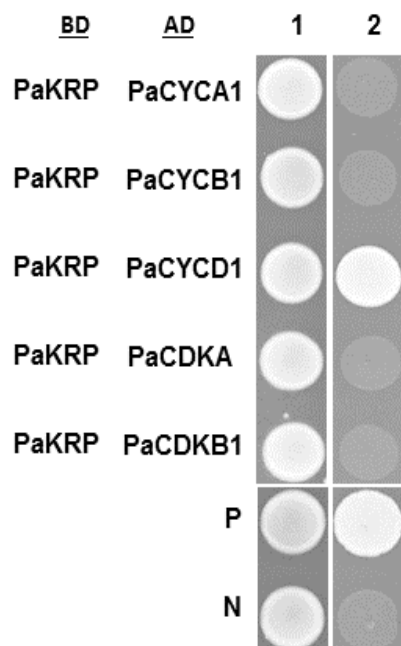


Fig 4. *In vitro* interactions between PaKRP and different cyclins or CDK proteins. A yeast two-hybrid screen on agar medium using the HIS reporter. The PaKRP-BD fusion was co-expressed together with PaCYCs and the PaCDKs-AD fusion and tested for positive yeast two-hybrid interactions. Positive (P) and negative (N) controls were provided by the Clontech Y2H kit. (Mountain View, CA). 5 mM 3AT, a competitive inhibitor of the *HIS3*-gene product, was used to titrate the minimum level of *HIS3* expression required for growth on histidine-deficient media. The numbers above the columns indicate the medium, as follows: (1) SC-Trp-Leu, (2) SC-Trp-Leu-His + 5mM 3AT.

לחלבוני CDKA. על בסיס אנליזות אלו, חולקו חלבוני ICK לשתי קבוצות: Class A-ICKs, אליה משתייכים החלבונים עוברים אינטראקציות גם עם חלבוני CYCD וגם עם חלבוני CDKA ו Class B- ICKs, אליה משתייכים חלבונים העוברים אינטראקציות רק עם נציגים ממשפחת CYCD (27). באופן מעניין, דווח כי לנציגים משתי משפחות הגנים יכולת לדכא חלוקת תאים, שכן ביטויים ביתר בצמחי מודל הוביל לפנוטיפ צמח קטן כתוצאה מדיכוח פעילות מיטוטית באברי הצמח השונים (27). בכדי לאפיין את חלבון ה-ICK/KRP שבודד מאבוקדו,

השתמשנו גם אנו באנליזת Y2H. חלק זה של העבודה בוצע בשיתוף עם מעבדתו של ד"ר גיורא בן ארי. לצורך האנליזה, שובטו הגנים המקודדים לחלבוני CDKA-B ולציקלינים מסוג A, B ו-D בפלסמידים המכילים GAL4 activation (AD) domain, בעוד הגן המקודד ל ICK/KRP שובט לפלסמיד המכיל GAL4 binding domain (BD). אינטראקציות חלבון-חלבון ניבחנו בהמשך, לאחר טרנספורמציה של סדרת זוגות פלסמידים: "bait" + "prey", לשמרים מסוג AH109 שגודלו במצע מוצק בתנאים סלקטיביים. אינטראקציות חיוביות ניבחנו באופן ויזואלי ע"י בחינת פנוטיפ His⁺. כפי שניתן לראות באיור מספר 4, תוצאות אנליזה זו הראו כי PaKRP עובר אינטראקציה אך ורק עם חלבון PaCYCD1, ולא עם PaCDKA. כמו כן, וכפי שניתן היה לצפות, תוצאות בדיקה זו הראו כי PaKRP אינו עובר אינטראקציה עם ציקלינים מסוג A ו-B ועם CDKB ובהתאם ניתן לסווגו כ- Class B KRP/ICKs,

4.1.4 שינויים בצבירת ABA וקטבולטים שלו במהלך התפתחות הפרי. כפי שצויין במבוא, ידוע כי שינויים ברמת הורמונים צמחים או בזמינותם עשויים להשפיע על דגם הביטוי של גנים המשתתפים בתהליך חלוקת התאים. בהתחשב במחקרים קודמים המורים מחד כי פירות 'האס' קטנים מתאפיינים ברמה גבוהה של ABA (2,3,5), ובמחקרים נוספים המראים כי חלק מהתעתיקים של ICK/KRP יכולים להיות מבוקרים באופן חיובי על ידי ABA (22), שיערנו כי ביטוי הגן *PaKRP* מושרה אף הוא על ידי ההורמון ABA. בכדי לנסות ולבסס הנחה זו בוצעה אנליזה לבדיקות רמות ABA במהלך התפתחות הפרי. מכיוון שידוע שתהליכים פסיולוגיים המבוקרים ע"י ABA תלויים לא רק ברמת ההורמון עצמו, אלא גם כן בתוצרי הפירוק שלו, האיפיון ההורמונלי כלל גם כן אנליזה של ABA catabolites. דגימות הפרי נשלחו למעבדת שירות בקנדה לקבלת פרופיל הורמונאלי לאחר הרצה במכשיר UPLC-ES-MS/MS. התוצאות שהתקבלו הראו כי בשני סוגי

Table 1: Changes in ABA and ABA catabolites levels, in NF and SF mesocarp tissues, at different developmental stages

Fruit type and developmental stage (DAFB)	ABA ($\mu\text{g/g DW}$)	DPA ($\mu\text{g/g DW}$)	ABA-GE ($\mu\text{g/g DW}$)	7'OH-ABA ($\mu\text{g/g DW}$)
NF (63)	8.11 (± 0.24)	77.51 (± 1.34)	8.04 (± 0.16)	0.46 (± 0.01)
SF (63)	9.64 (± 0.99)	134.84 (± 13.08)	10.34 (± 2.14)	0.75 (± 0.08)
NF (81)	5.67 (± 0.03)	64.14 (± 4.08)	12.43 (± 0.12)	0.51 (± 0.01)
SF (81)	5.54 (± 0.17)	100.75 (± 2.14)	10.28 (± 0.76)	0.63 (± 0.01)
NF (112)	4.78 (± 0.86)	12.59 (± 2.52)	10.12 (± 3.19)	0.30 (± 0.03)
SF (112)	5.95 (± 0.54)	27.07 (± 1.38)	13.16 (± 0.67)	0.35 (± 0.01)
NF (126)	5.67 (± 0.39)	2.94 (± 0.99)	6.55 (± 0.05)	0.26 (± 0.01)
SF (126)	5.59 (± 0.40)	7.54 (± 2.49)	8.86 (± 0.44)	0.27 (± 0.04)

Mean values ($n = 2$) $\pm$ SE are depicted.

הפירות, רמת ה- ABA הייתה יחסית גבוהה בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרי, ירדה מעט ונותרה קבועה עד ל 126 ילפ"מ (ראה טבלה 1). למרות זאת, במועד 63 ילפ"מ, רמת ה-ABA בציפת הפירות הקטנים הייתה גבוהה יותר מאשר בפירות גדולים. במקביל, בלטה במיוחד בשני סוגי הפירות נוכחות תוצר הפירוק של ABA : DPA(dihydrophaseic acid). גם במקרה זה, רמת ה- DPA הייתה גבוהה במיוחד בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרי וירדה בהמשך תקי ההתפתחות. באופן מעניין, השוואת רמת ה- DPA בין שני סוגי הפירות, הראתה כי ציפת הפירות הקטנים התאפיינה ברמות גבוהות במיוחד של DPA, זאת בהשוואה לפירות גדולים. בהנחה ש-ABA אמנם מסונטז בפרי, הימצאות DPA בציפה מעידה שרמת ABA בפרי הינה גבוהה במיוחד בשלבים ראשונים של ההתפתחות הפרי ואז דועכת. יתר על כן, הצטברות גבוהה במיוחד של DPA בציפת פירות קטנים מורה כי ככל הנראה חלה בפירות אלו סינטזה מוגברת של ABA, בהשוואה לפירות גדולים.

4.1.3 בחינת דגם הביטוי *in vitro* של הגנים

PaKRP ו-*PaCDKB1* בתרבויות תאים. התוצאות

שהתקבלו מבדיקת רמת ABA ותוצרי הפירוק שלו, במהלך התפתחות הפרי, תמכו ברעיון ברעיון שביטוי *PaKRP* עשוי להיות מושרה ע"י ABA. בכדי להמשיך ולאשש הנחה זו, השתמשנו בתרבית

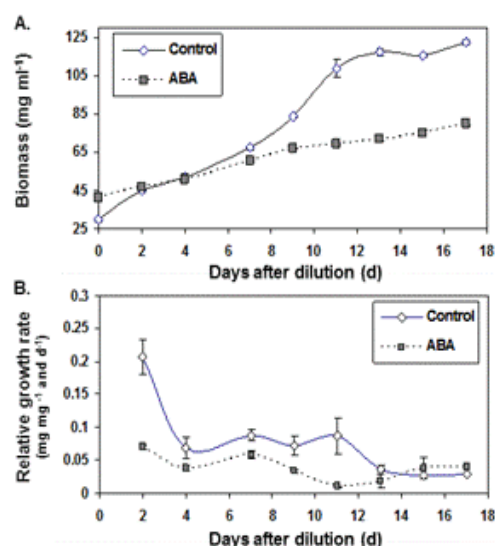


Fig 5. Temporal changes in biomass and RGR in avocado cell suspension culture in the presence or absence of ABA. Freshly diluted avocado cell suspensions were grown in complete MSB liquid medium in presence or absence of 100 mM ABA. Cell samples were removed at various intervals and weighed. Changes in biomass (A) and RGR (B) were determined. The RGR was determined essentially as described in Materials and Methods. Values at each time point represent the mean $\pm$ SE of 3 biological replicates.

תאים של אבוקדו, שגודלה בנוכחות או בהעדר ABA. עקומות הגדילה של תרביות אלו הראו כי תחת תנאי בקרה, ביומסת התרבית עלתה באופן לינארי והגיעה לפלטו כבר ביום ה-13, בעוד שבתרבית שהוסף לה ABA חל עיכוב מובהק בקצב גדילת הביומסה (איור מספר 5A). בהמשך, ניתן לראות כי ערך ה-RGR (Relative growth rate) שחושב בתנאי הביקורת, היה גבוה בימים הראשונים שלאחר המיהול, ירד בהדרגה והתייצב בין הימים 4-11 וירד לרמה נמוכה מאוד מיום 13 והלאה. לעומת זאת, ערך ה-RGR שחושב בתרבית שטופלה ב-ABA, היה נמוך מאוד כבר ביום 2, נשאר ברמה נמוכה עד יום 9, ומנקודה זו חלה ירידה עד קבלת ערכים נמוכים מאוד (איור מספר 5B). במקביל, אנליזת ביטוי *PaKRP* ו-*PaCDKB1* בתרבית התאים בהעדר או בנוכחות ABA הראתה כי תחת תנאי בקרה ועם הזדקנות התרבית רמת הביטוי של

PaKRP עלתה. (איור מספר 6A). לשם השוואה, דפוס קינטי

דומה התקבל גם בתרבית שטופלה ב-ABA, אולם במקרה זה, ניתן לראות שהביטוי של הגן *PaKRP* מלכתחילה היה גבוה יותר.

כמו כן, בתרבית הביקורת, רמת תעתיק של *PaCDKB1* עלתה במשך הימים הראשונים לאנליזה, חזרה לערך ההתחלתי ביום 4 ונשארה ברמה נמוכה מיום זה והלאה (איור מספר 6B).

לעומת זאת, תוספת ABA לתרבית הובילה לדיכוי הגידול הראשוני בביטוי *PaCDKB1*.

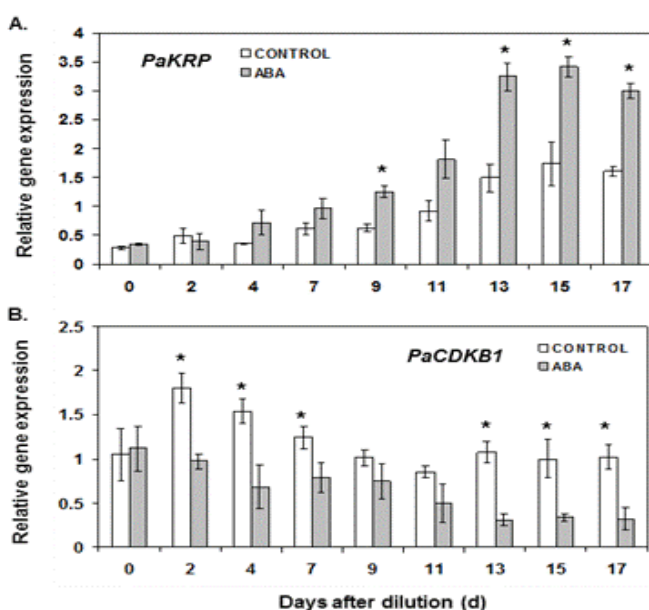


Fig 6. Expression analysis of *PaKRP* and *PaCDKB1* in avocado cell suspension cultures grown in the presence or absence of ABA. Real-time PCR was performed with cDNA prepared from total RNA extracted from cell samples, removed at various intervals. Columns represent the relative expression levels normalized against *PaACT* levels. Data are means $\pm$ SE of three independent biological replicates. Stars denote a significant difference between ABA-treated and control cell samples at the same sampling point ($P \leq 0.05$).

לסיכום: המידע שהתקבל בחלק הזה של העבודה מציע תובנות חדשות לגבי המכניזם המבקר חלוקת תאים באבוקדו. מידע זה קושר את חלבון *PaKRP* עם היציאה המוקדמת ממחזור התא, ומורה כי עלייה מוגברת בביטוי *PaKRP* עשויה להיות מבוקרת ע"י ABA. בהתבסס על תוצאותינו, אנו משערים כי היקשרות חלבון *PaKRP* לחלבוני D-type-Cyclins שונים, המהווים חלק מתצמיד CDKA/CYCD מובילה לשיבוש פעילותם, מונעת את המעבר לשלב G1/S ומדכאת את תהליך חלוקת התאים. יש לציין כי תוצאות עבודה זו לא רק שופכות אור על תפקידה האפשרי של חומצה אבסיסית בבקרת תהליך

חלוקת תאים בפירות קטנים, אלא מורות שכל הנראה שינויים ברמת ABA, המווסתים ע"י שינויים בין קצב סינטזת ופירוק ההורמון, משחקים באופן כללי תפקיד בבקרת חלוקת התאים בשלבים ראשוניים של התפתחות הפרי.

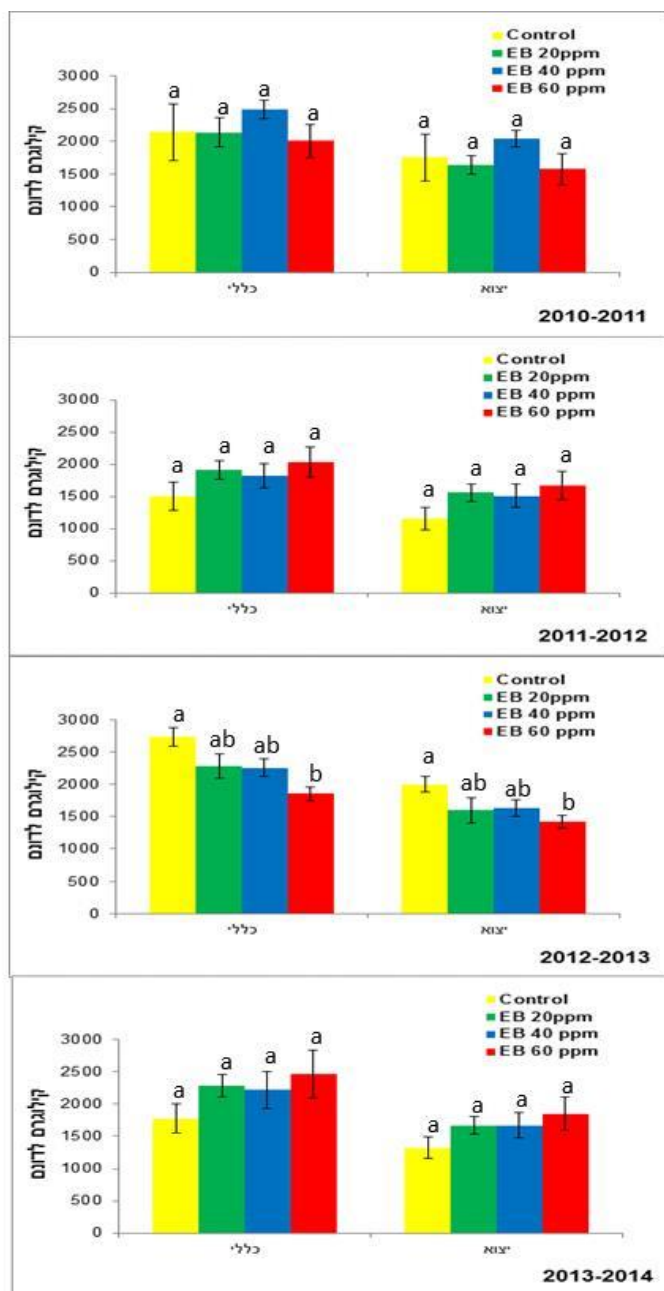
לבסוף, למרות שהמודל המתואר לעיל מציג תרחיש בו ל-ABA תפקיד מרכזי בבקרת ביטוי *PaKRP*, ניתן להעלות על הדעת מודלים נוספים בהקשר לבקרת ביטוי *PaKRP*. כך לדוגמא, בעבודה קודמת שנערכה במעבדתנו הועלתה ההשערה כי חלבון *Pafw2.2-like*, המבקר באופן שלילי את חלוקת התאים בפרי, עשוי לבקר באופן ישיר או עקיף את ביטוי ו/או פעילותו של גורם כדוגמת *Pa KRP* (13). אולם בהסתמך על מכלול הנתונים שהתקבלו, ניתן לומר כעת כי תרחיש זה אפשרי רק בחלקו. בפרט, הנתונים המראים כי ביטוי *PaKRP* יורד במהלך התפתחות הפרי, בעוד שעבודה קודמת הדגימה כי *Pafw2.2-like* מתבטא גם בשלבים מאוחרים יותר של הפרי הקטן (13), שוללים חלקית השערה זו. למרות זאת, ולאור תוצאות מחקרים הטוענים כי FW2.2 עשוי לתפקד כ"סנסור" הפועל במעלה הזרם ומאתחל מפל זירחוני המבקר את מחזור חלוקת התאים בפרי (12), האפשרות ש-*Pafw2.2-like* מעורב בבקרת פעילות החלבונים של PaICK, נותרת כתרחיש אפשרי.

5. פירוט עיקרי הניסויים - חלק ג' תוצאות ודיון: במקביל למחקר הבסיסי, בתוכנית זו התמקדנו בביצוע ניסיונות שדה

לבדיקת השפעת שילוב טיפולים הורמונאליים על הייבול הכללי וגודל הפרי הסופי. בניסיונות שטח בתוכנית הקודמת, נבחנה השפעת יישום ציטוקינין (בפורמולציות של "בנזיל אדנין" ו"גולית") ונבחן באופן פרלימנרי, יישום טריפטופאן (חומצה אמינית המשמשת פרקורסור של אוקסין) לצורך הגדלת פרי. סך ממוצעי הנתונים לגבי שלוש העונות בהם בוצע יישום ציטוקינין ביד-חנה הצביעו על מגמה חיובית ועל הגדלת ייבול כללי לאחר טיפול בציטוקינין בתכשיר "בונגרו" (80 ח"מ) בסוף פריחה. כמו כן לטיפול טריפטופאן הייתה השפעה חיובית שהובילה לעלייה במספר הפירות לעץ. חשוב לציין כי בבדיקת גודל הפרי הממוצע, נמצא כי העלייה ברמת הייבול נבעה כתוצאה מעלייה במספר הפירות הכללי ולא כתוצאה מעלייה בגודלם. מכאן, למרות שמלכתחילה טיפולי הטריפטופאן ניתנו במטרה להגדיל את רמת חלוקת התאים ובהתאם את גודל הפרי, תוצאותינו הראו שטיפול טריפטופאן ככל הנראה מנעו נשירת חנטים ובכך תרמו להגדלת הייבול הכללי. (ראה דו"ח מסכם תוכנית 203-0708). בתוכנית הנוכחית הצענו להמשיך ולבצע ניסיונות שטח נוספים לבדיקת השפעת יישום טריפטופאן, יישום ציטוקינין ויישום משולב של שני חומרים אלו.

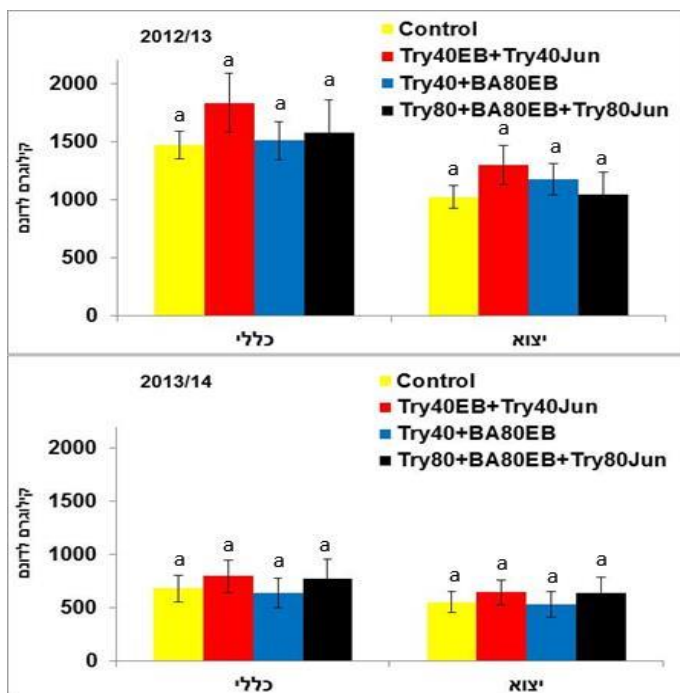
במהלך תקופת המחקר בוצעו ביד-חנה, להבות חביבה, ומגל ניסיונות שטח במתכונות רחבה של ארבע-חמש חזרות לטיפול, כאשר כל חזרה מונה שורת עצים (ניסויים אלו רוכזו ע"י ד"ר ליאו וינר) ובמתכונת מצומצמת בעצים בודדים בגעתון אילון ויחיעם. (ניסויים אלו רוכזו ע"י ד"ר אדולפו לוי). התוצאות שהתקבלו באתרים השונים הראו מגמות מעורבות והן מוצגות להלן:

במגל נבדק יישום טריפטופאן בריכוזים של 20, 40 ו-60 ח"מ במועד אחד (סוף פריחה) במהלך 4 עונות רצופות. כפי שניתן לראות באיור 7, טיפולי טריפטופאן שבוצעו בעונות 2010/11 ו-2012/13, בהן ממוצע הייבול הכללי עמד על 2-2.5 טון לדונם, לא תרמו להעלאת היבול. בפרט, בעונת 2012/13 נצפה אף אפקט שלילי לטיפול 60 ח"מ. במקביל, טיפולי הטריפטופאן שניתנו בעונות 2011/12 ו-2013/14, בהן ממוצע הייבול הכללי עמד על 1.5 טון לדונם, הראו עלייה מסויימת הן ברמת הייבול הכללי והן ביבול הייצוא בהשוואה ביקורת, אולם התוצאות לא היו מובהקות. על פניו נראה כי השונות בתוצאות, בין העונות השונות קשורה בשונות ברמת הסירווגיות הכללית של המטע. . בעוד שבשנה בה עומס הפרי נמוך יחסית מתקבלת מגמת השפעה חיובית (אם כי לא מובהקת), כאשר עומס הפרי בעצים גבוה מאוד, נצפה אף אפקט שלילי.



איור 7. סיכום בחינת השפעת טיפולי טריפטופאן במהלך ארבע עונות רצופות – מגל. רמת היבול הכללי (ק"ג לדונם) חושבה ע"פ נתונים שהתקבלו מבית האריזה במשך ארבע עונות עוקבות כל עמודה מייצגת ממוצע $\pm$ שגיאת תקן של 5 חזרות ביולוגיות (שורת עצים במטע = חזרה ביולוגית)

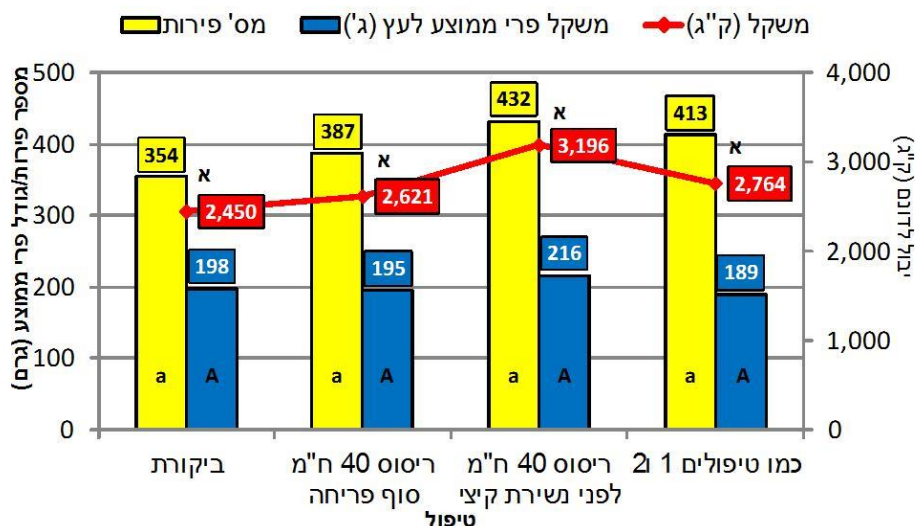
תוצאות ניסויים שבוצעו ביד חנה במהלך שתי עונות רצופות מוצגות באיור מספר 8. כפי שניתן לראות תוצאות טיפולים אלו הראו כי טיפולי טריפטופאן (40 ח"מ), שניתנו בסוף הפריחה (EB) ובתחילת חודש יוני, במועד בו חלה נשירת חנטים מסיבית, לא השפיעו באופן מובהק לא על הייבול הכללי ולא על הייבול לייצוא. כמו כן לא נצפה אפקט חיובי מובהק לטיפול הטריפטופאן ובנוזיל אנדין המשולבים, בהשוואה לביקורת במהלך שתי העונות.



איור 8. סיכום בחינת השפעת טיפולי טריפטופאן וטיפול טריפטופאן + BA משולבים במהלך שתי עונות-יד חנה. רמת היבול הכללי (ק"ג לדונם) חושבה ע"פ נתונים שהתקבלו מבית האריזה. כל עמודה מייצגת ממוצע $\pm$ שגיאת תקן של 4 חזרות ביולוגיות (שורת עצים במטע=חזרה ביולוגית)

בתוצאות ניסויים שבוצעו בגעתון, אילון (לא מוצגים) וביחיעם (ראה איור 9) נצפו תוצאות דומות במקצת, גם במקרה זה לא נמצא הבדל מובהק לטיפול טריפטופאן לעומת ביקורת.

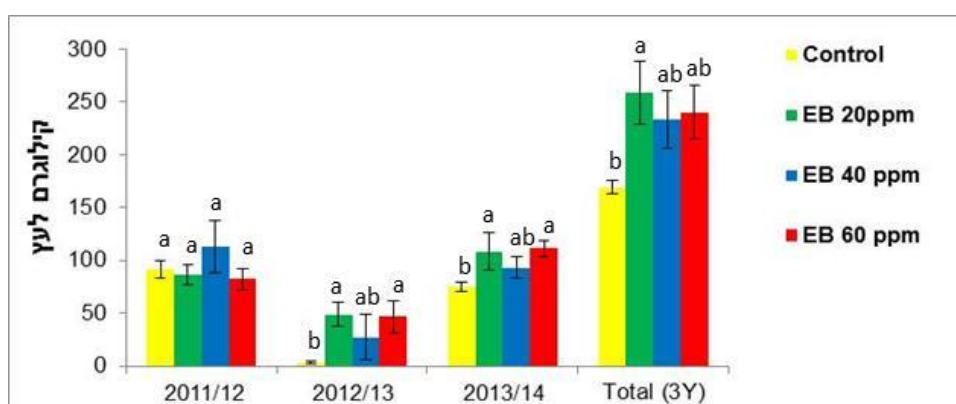
איור 9. סיכום בחינת השפעת טיפולי טריפטופאן יחיעם עונת 2013/14.



מכיוון שברוב האתרים התקבלו תוצאות שהדגימו כי קיים אפקט חיובי אך לא מובהק לטיפול טריפטופאן, העלנו את ההשערה כי ייתכן שמצב עומס הפרי (שאינו אחיד בתוך שורות הטיפול), גורם למיסוך התוצאות. בכדי לבדוק פרמטר זה בחרנו לבדוק, ברמת העץ, את השפעת יישום טריפטופאן. לצורך הניסוי נבחרו 20 עצים שעמדו במצב שפע (עמוסי פרי) בעונת 2011/12, במצב שפל- בעונת 2012/13, ושוב במצב שפע - בעונת 2013/14. העצים חולקו ל-4 קב' (חמישה עצים לטיפול). קב' העצים הראשונה שימשה כקב' ביקורת ולשלוש קב' העצים הנותרות ניתן טיפול בריכוזים של 20, 40 ו-60 ח"מ במועד אחד (סוף פריחה), בכל עונה. הניסוי התבצע במגל.

התוצאות שנאספו ורוכזו מוצגות באיור 10. כפי שניתן לראות במקרה זה טיפולי הטריפטופאן (20 ח"מ ו-60 ח"מ) שניתנו בעונות 2012/13 כמו גם ב 2013/14 השפיעו באופן חיובי ומובהק על רמת הייבול הכללי לעץ. בנוסף, חישוב השפעת הטיפולים על סך הייבול הכללי במהלך שלוש העונות, הראה כי טיפולי הטריפטופאן השפיעו באופן חיובי ומובהק על רמת

הייבול לעץ. תוצאות אלו מדגימות את המורכבות הקיימת ב'האסי' באינטרפרטציה של התוצאות המתקבלות מטיפולי יישום חומרי צמיחה להגדלת הייבול וגודל הפרי.



איור 10. השפעת טיפולי טריפטופאן על עצים במצב שפע ושפל. רמת הייבול הכללי (ק"ג לעץ) נאמדה במהלך הקטיפ של שלוש עונות עוקבות. כל עמודה מייצגת ממוצע $\pm$ שגיאת תקן של 5 חזרות ביולוגיות (עץ=חזרה ביולוגית)

מה הלאה ? התוצאות הללו מובילות למסקנה שיש לשנות את מתכונת הניסויים ולבצע תחילה ניסויים ברמת העץ במשך כמה עונות, ורק לאחר מכן ניסויי שטח בקנה מידה גדול (בשורות). כאשר בתהליך עיבוד התוצאות יש לקחת בחשבון את עומס הפרי בעצים בעונות הניסוי השונות, כמו גם את עומס הפרי בעצים השונים לאורך שורות הניסוי. מכיוון שבשנתיים הראשונות של תוכנית מחקר זו, לא לקחנו בחשבון פרמטרים אלו, אין אנחנו יכולים לבצע ניתוח תוצאות מחודש. לפיכך, לא ניתן להשתמש בתוצאות שהתקבלו בתוכנית זו ולהפכם להמלצות לטיפול. כמו כן מכיוון שהתקבלה שונות גדולה בתוצאות (בין עונות ואתרים) לא בחנו את השפעת הטיפולים על ביטויים של הגנים הקשורים לתהליך חלוקות תאים ועל גודל הפרי הסופי. בכדי לבצע זאת היה צריך לדגום את החומר צמחי מהניסויים שהתבצעו בעצים בודדים.

1. Cowan AK, Moore-Gordon CS, Bertling I, Wolstenholme BN: Metabolic control of avocado fruit growth. *Plant Physiol* 1997, 114:511-518.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Taylor NJ, Cowan AK: Plant hormone homeostasis and control of avocado fruit size. *Plant Growth Regulation* 2001, 35:247-255.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. Inze, D: Green light for the cell cycle. *The EMBO Journal* 2005, 24: 657-662.
10. Inze, D and Veylder, L : Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genetics* 2006, 40: 77-105.
11. Frary A, Nesbitt TC, Grandillo S, Knaap E, Cong B, Liu J, Meller J, Elber R, Alpert KB and Tanksley SD: *fw2.2*: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science* 2000, 289: 85-88.
12. Cong B and Tanksley, S.D: FW2.2 and cell cycle control in developing tomato fruit: a possible example of gene co-option in the evolution of a novel organ. *Plant Molecular Biology* 2006, 62: 867-880.
13. Dahan Y, Rosenfeld R, Zadiranov V and Irihimovitch V: A proposed conserved role for an avocado *fw2.2-like* gene as a negative regulator of fruit cell division. *Planta* 2010, 232: 663-676.
14. Schroeder CA: Growth and development of the 'Fuerte' avocado fruit. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 1953, 68:253-258.
15. Wang H, Kong H, Sun Y, Zhang W, Altman N, dePamphilis CW and Ma H : Genome-wide analysis of the cyclin family in *Arabidopsis* and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiol* 2004, 135: 1084-1099.
16. Mironov D, De Veylder L, Van Montagu M and Inze D: Cyclin dependent kinases and cell division in plants-the nexus. *Plant Cell* 1999: 11:509-522.

17. Riou-Khamlichi, C., Menges, M., Healy, J.M., and Murray, J.A. Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Molecular and Cellular Biology* 2000, 20: 4513-4521.
18. Wang, H., Qi, Q., Schorr, A., Cutler, A.J., Crosby, W. L., Fowke, L.C: ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *The Plant Journal* 1998, 15: 501-510.
19. Wang, H., Zhou, Y., Bird, D.A., Fowke, LC: Functions, regulation and cellular localization of plant cyclin-dependent kinase inhibitors. *Journal of Microscopy* 2008, 231: 234-246.
20. Chevalier C : Cell cycle control and fruit development. 2007 In: Inze D (ed). Cell cycle control and plant development, Annual Plant Reviews, 32. Oxford, United Kingdom: Blackwell 269-290.
21. Nafati M, Frangne N, Hernould M, Chevalier C and Gévaudant F: Functional characterization of the tomato cyclin-dependent kinase inhibitor SlKRP1 domains involved in protein-protein interactions. *New Phytol.* 2010.
22. Pettkó-Szandtner A, Mészáros T, Horváth GV, Bakó L, Csordás-Tóth E, Blastyák A, Zhiponova M, Miskolczi P and Dudits D: Activation of an alfalfa cyclin-dependent kinase inhibitor by calmodulin-like domain protein kinase *The Plant Journal* 2006, 46: 111-123.
23. Cong B, Liu J and Tanksley SD: Natural alleles at a tomato fruit size quantitative trait locus differ by heterochronic regulatory mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:13606-13711.
24. Baldet, P., Hernould, M., Laporte, F., Mounet, F., Just, D., Mouras, A., Chevalier, C and Rothan, C : The expression of cell proliferation-related genes in early developing flowers is affected by a fruit load reduction in tomato plants. *Journal of Experimental Botany* 2006, 57: 961-970.
25. Nafati M, Frangne N, Hernould M, Chevalier C, Gevaudant F Functional characterization of the tomato cyclin-dependent kinase inhibitor SlKRP1 domains involved in protein-protein interactions. *New Phytol* 2010, 188: 136-149.
26. Torres Acosta JA, Fowke LC, Wang H Analyses of phylogeny, evolution, conserved sequences and genome-wide expression of the ICK/KRP family of plant CDK inhibitors. *Ann Bot* 2011, 107: 1141-1157.
27. Wang H, Zhou Y, Bird DA, Fowke LC Functions, regulation and cellular localization of plant cyclin-dependent kinase inhibitors. *J Microsc* 2008, 231: 234-246.

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.

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה. מחקר המשך זה הציע להתמקד בחקר אחת הבעיות החקלאיות העיקריות בזן האבוקדו 'האס' - בעיית גודל פרי. לצורך כך הוצע שילוב מחקר בסיס שכלל זיהוי ואפיון גנים הקשורים למערכת חלוקת התאים ואיפיונם במהלך ההתפתחות הפרי ושילוב טיפולי טריפטופאן ובנזיל אדנין ובדיקת השפעתם על גודל הפרי ועל ביטוי הגנים הנ"ל.
עיקרי הניסויים והתוצאות: מחקר בסיסי שובטו ארבעה גנים מאבוקדו המקודדים לכאורה לחלבוני CDKA, ICK/KRP, CYCD1 ו-CDKB1. המידע שהתקבל מבדיקת דגם ביטויים של גנים אלו במהלך התפתחות הפרי מציע תובנות חדשות לגבי המכניזם המבקר חלוקת תאים באבוקדו. מידע זה קושר את חלבון PaKRP/ICK עם היציאה ממחזור חלוקת התאים, ומורה כי עלייה מוגברת בביטוי PaKRP עשויה להיות מבוקרת ע"י ABA. אנליזות ביטוי משלימות אמנם הראו כי במערכת תרבית תאי אבוקדו, שפותחו במיוחד לצרכי עבודה זו, ניתן להשרות אינדוקציה של ביטוי PaKRP ע"י ABA. בהתבסס על תוצאותינו, אנו משערים כי היקשרות חלבון PaKRP לחלבוני D-type-Cyclins שונים, המהווים חלק מתצמיד CDKA/CYCD מובילה לשיבוש פעילותם, מונעת את המעבר לשלב G1/S ומדכאת את תהליך חלוקת התאים. יש לציין כי תוצאות עבודה זו לא רק שופכות אור על תפקידה האפשרי של חומצה אבסיסית בבקרת תהליך חלוקת תאים בפירות קטנים, אלא מורות שככל הנראה שינויים ברמת ABA, המווסתים ע"י שינויים בין קצב סינטזת ופירוק ההורמון, משחקים תפקיד בבקרת חלוקת התאים בשלבים ראשונים של התפתחות הפרי.
מחקר יישומי - בוצעו ניסיונות שדה לבדיקת השפעת יישום טריפטופאן, לצורך הגדלת פרי וייבול. תוצאות הניסויים שהתקבלו באתרי הניסוי השונים הראו מגמה מעורבת. מכלול הנתונים הורה כי טיפול טריפטופאן בסוף פריחה, השפיע באופן חיובי, אך לא תמיד מובהק, על רמת הייבול הכללי. לא ניתן להשתמש בתוצאות שהושגו במסגרת תוכנית זו ולהפכם להמלצות לטיפול.
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח? מטרות המחקר אשר הוצבו לתקופת הדוח הושגו בחלקן.
בעיות שונות לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנותנה לביצוע תוכנית המחקר? התוצאות שהתקבלו בחלקו היישומי של המחקר הדגימו את המורכבות הקיימת באינטרפרטציה של התוצאות המתקבלות מטיפולי חומרי צמיחה להגדלת הייבול וגודל הפרי ב'האס'. יש לשנות את מתכונת הניסויים ולבצע תחילה ניסויים ברמת העץ במשך כמה עונות ורק לאחר מכן ניסויי שטח בקנה מידה גדול. בתהליך עיבוד התוצאות יש לקחת בחשבון את עומס הפרי בעצים בעונות הניסוי השונות כמו גם את עומס הפרי בעצים השונים לאורך שורות הניסוי. כמו כן מכיוון שהתקבלה שונות גדולה בתוצאות (בין עונות ואתרים) לא בחנו את השפעת הטיפולים על ביטויים של הגנים הקשורים לתהליך חלוקת תאים ועל גודל הפרי הסופי. בכדי לבצע זאת היה צריך לדגום את החומר צמחי מהניסויים שהתבצעו בעצים בודדים-איסוף חומר צמחי שכזה זה לא בוצע.
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 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. <i>Plant Science</i> 213:18-29. ממצאי העבודה הוצגו ע"י החוקרת הראשית בכנסים הבאים: 2011-VII World Avocado Congress, Cairns, Australia (Speaker). 2012- Avocado Genetics Meeting, Riverside, California (Invited participant and speaker).
פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)
רק בספריות
ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)
ניתן לפרסם

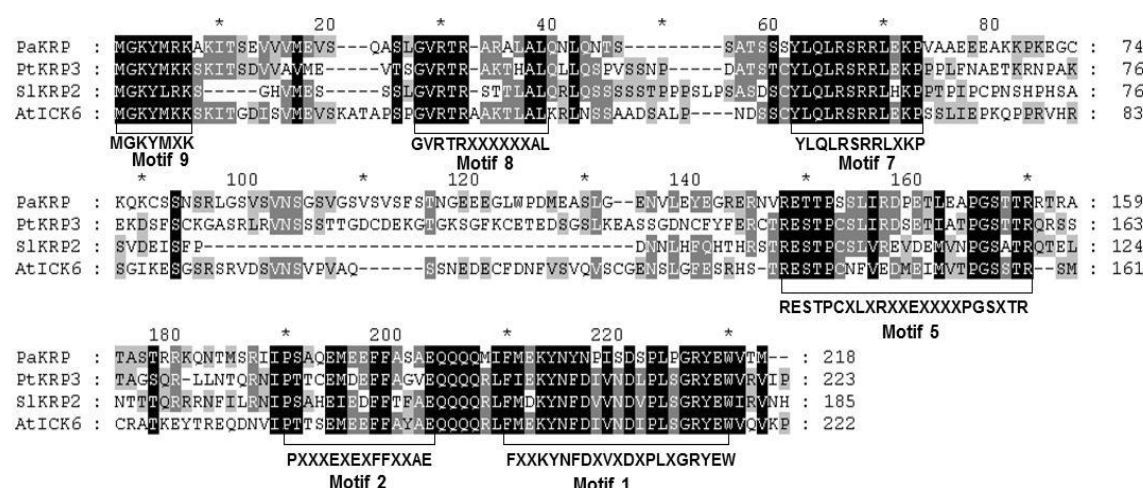


Fig 1. Amino acid sequence comparison and structural features of avocado PaKRP. Comparison of the deduced amino acid sequence of PaKRP (ac: AEZ35251.1) with three representative ICK/KRP proteins, namely *Populus trichocarpa* PtKRP3 (ac: XP_002301783.1), tomato (*Solanum lycopersicum*) SlKRP2 (ac: CAD29649.1) and *Arabidopsis* AtICK6 (ac: NP_001190495.1). Residues on black, dark gray and light gray backgrounds indicate 100%, 75% and 50% amino acid similarity, respectively. Dashed lines indicate gaps introduced to achieve maximum alignment.

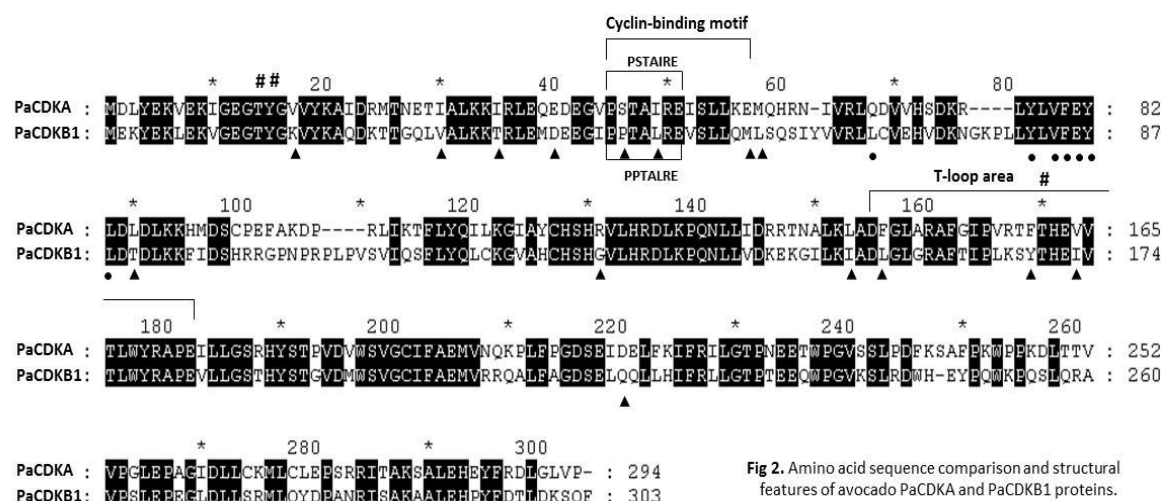


Fig 2. Amino acid sequence comparison and structural features of avocado PaCDKA and PaCDKB1 proteins.

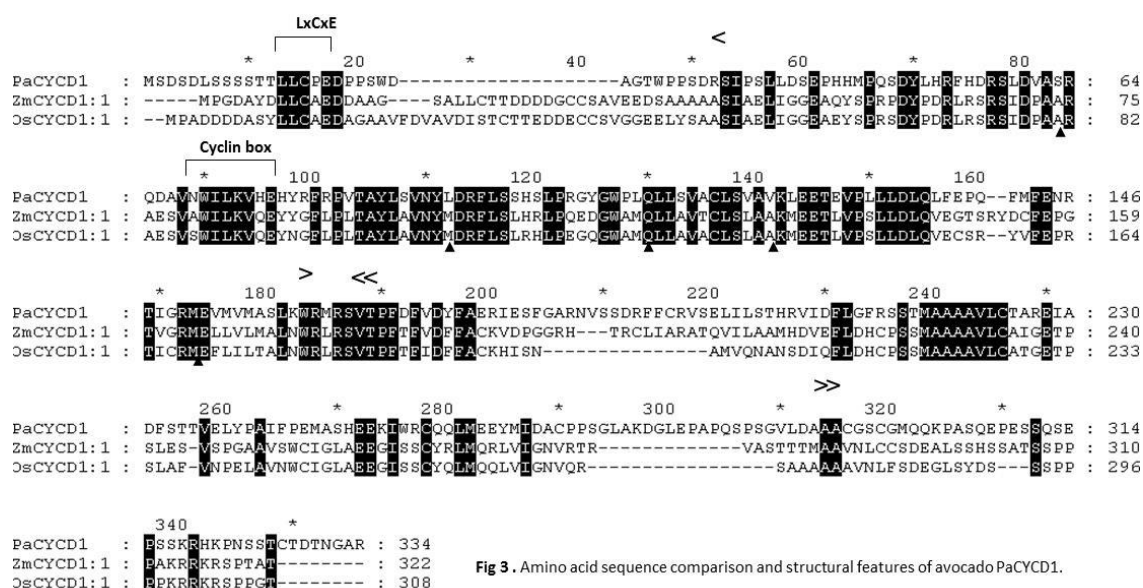


Fig 3. Amino acid sequence comparison and structural features of avocado PaCYCD1.