

שבירת תרדמת פקעים: שחזור מסלול העברת הסיגנל

**צוות המחקר:** אתי אור, תמר הללי, שמעון לביא, עליזה אוגרודוביץ, המכון למטעים, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן, ת.ד. 50250.

דואר אלקטרוני: [vhattior@agri.gov.il](mailto:vhattior@agri.gov.il)

**Bud Dormancy Release: Reconstructing the signal transduction pathway**

Etti Or, Tamar Halali, Aliza Ogredovitch, Shimon Lavee, ARO, Beit Dagan, P.O.B. 50250.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא חתימת החוקר:

**תקציר**

שינויים שנמצאו בטרנסקריפטום פקעי גפן במחקר קודם העלו את ההשערה שלאיתילן עשוי להיות תפקיד במנגנון שבירת התרדמה. המחקר הנוכחי התמקד בבחינת השערה זו באמצעות מגוון נסיונות שבחנו השפעות שוברי תרדמה על התנהגות בקרים מרכזיים של ביוסינתזה והעברת סיגנל איתילן והשפעות של שיבוש ביוסינתזה והעברת סיגנל איתילן על ההשפעה ממריצת ההתעוררות של שוברי תרדמה ועל פרופיל ההתעוררות של פקעים.

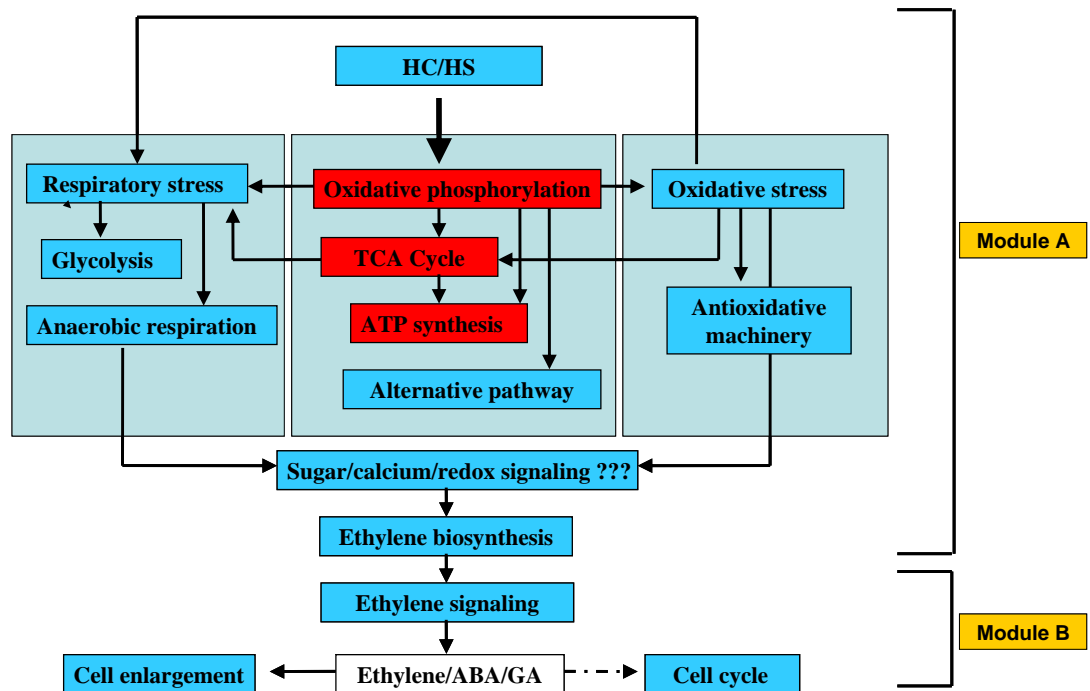
תוצאות המחקר מעלות כי שוברי תרדמה שונים מגבירים את ביטויים של בקרי סינתזה איתילן ומגבירים את רמת האיתילן האנדוגני. בהתאמה הם מגבירים גם את ביטויים של מרכיבים מרכזיים בשרשרת הובלת הסיגנל איתילן בדגם שהוא תלוי ריכוז שובר התרדמה. עיכוב סינתזת איתילן באמצעות קובלט כלוריד ועיכוב מעבר סיגנל איתילן באמצעות המעכב NBD פוגעים ביכולתם של שוברי התרדמה שנבחנו להמריץ התעוררות ומעכב את התעוררות הפקעים לדרגות משתנות התלויות במועד הטיפול על רצף מעגל התרדמה החורפי. על בסיס התנהגות פקעי הבקורת נראה כי יש קווי דמיון למנגנון ההתעוררות הטבעי אולם ישנם הבדלים שמקורם בהבדל בעיתוי ועצמת הסיגנל. ההבדלים המצויינים בהתנהגות הפקעים לאורך מעגל התרדמה ובין פקעי בקורת לפקעים מטופלים ראויים למחקר נוסף.

תוצאות המחקר המדווח תומכות בהנחת המוצא כי שוברי תרדמה מגבירים סינתזת איתילן ומעבר סיגנל איתילן ומציעים כי סיגנל איתילן הוא בעל תפקיד חשוב במנגנון שבירת התרדמה ובהעדרו-אם בגלל השבתת ביוסינתזה של איתילן או עיכוב מעבר סיגנל-מתבטל האפקט הממריץ של שוברי התרדמה ונפגעת יכולת ההתעוררות של הפקעים. איתור בקרים במורד הזרם המופעלים על ידי סיגנל האיתילן ומהווים החוליה הבאה במפל הארועים הממריץ את המריסטמה לחדש את פעילותה הוא החוליה החשובה הבאה בהבנת מנגנון שבירת התרדמה.

**רקע מדעי מקוצר**

על מנת לקדם את הבנת מנגנון שבירת התרדמה בפקעי גפן, בוססה במעבדתנו לפני כעשור מערכת מודל של ייחורים חד פרקיים המשמשת לאנליזה של השינויים הביוכימיים החלים בפקעי גפן בהשפעת הטיפול ב-HC, ולהשוואתם לשינויים החלים בעקבות טיפול חלופי לשבירת תרדמה. אסטרטגיה זו נבחרה מתוך הנחה כי היא עשויה להוביל לאיתור שינויים ביוכימיים משותפים ולשפר את יכולתנו לזהות מרכיבים הכרחיים הנחוצים להתקדמות תהליך השחרור מתרדמה, ללא תלות בסיגנל המשרה את תחילתו של מפל האירועים. נערכה השוואה רחבת היקף של השינויים החלים בטרנסקריפטום של הפקע בתגובה לטיפול ב HC ושוק חום ב-6 נקודות זמן בין 3 ל-96 שעות לאחר הטיפול. נמצא דמיון רב בתגובת הפקעים לשני הטיפולים. דמיון זה התבטא גם באופי הזמני של השינויים שהושרו וגם ברפרטואר של הגנים שביטויים השתנה באופן מובהק (811 גנים שביטויים עלה ו-707 גנים שביטויים ירד בהשפעת שני הטיפולים).

על בסיס תפקידם הביולוגי של הגנים שביטויים השתנה במחקר זה ובמחקרים שקדמו לו, על בסיס אופי השינוי, ועל בסיס אינטראקציות בין המסלולים המושפעים במערכות ביולוגיות אחרות, הוצע מודל לתיאור תהליכים המתרחשים בתא בזמן שבירת התרדמה בגפן. על פי מודל זה ישנה בשלב מוקדם פגיעה בתהליך הזרחון החמצוני במיטוכונדריה הגורמת להצטברות פראוקסידים ולעקה חמצונית.



מצב זה מוביל מחדד לשפעול המערכת האנטיאוקסידנטית ומאידך לפגיעה בתפקוד תקין של מעגל קרבס וביצור ATP. כתגובה על המשבר האנרגטי יש פרוק סוכר במסלול חסכוני באנרגיה, על ידי אינדוקציה של סוכרוז סינתאז שמופעל במצבי עקה אנרגטית, עלייה בפעילות הגליקוליטית ואינדוקציה של מסלולי נשימה אלטרנטיביים: שפעול האוקסידאז האלטרנטיבי ונשימה אנארובית. על פי המודל, תהליכים אלו גורמים להמשך מעבר אותות במורד הזרם במסלול שאינו ברור עדיין, המוביל להגברת סינתזת אתילן. בתגובה לסיגנל האתילן חל רצף תהליכים המוביל לשינויים במטבוליזם של חומצה אבסיסית (ABA). על פי המודל, שינויים אלו מעודדים בתורם שינויים במטבוליזם/חישה של ג'יברלין המובילים לתהליכי התרופפות דופן והתארכות תאים. על בסיס המתואר הוצעה חלוקה של מסלול הארועים המוביל לשבירת תרדמה לשתי חטיבות, הראשונה מופעלת ע"י שוברי תרדמה שונים ומובילה לביוסינתזה של אתילן (Module A בתמונה 1) והאחרת מופעלת על ידי סיגנל האתילן ומפעילה תהליכים המאפשרים הסרת עיכוב ועידוד צמיחתה של המריסטמה (Module B בתמונה 1). המודל המתואר נסמך על רמת דמיון גבוהה לרצף תהליכים שהוכחו באיברי צמח שונים במספר צמחים בתגובה למצבי עקה חמצונית והיפוקסיה המובילים להתארכות תאים.

נערכו מספר נסיונות על מנת לבחון את כושר הניבוי של המודל. בהתאמה למודל, הוביל לעיכוב נשימה של מיטוכונדריות שבודדו מפקעי גפן. עלייה בולטת וזמנית בפליטת אצטאלדהיד ואתנול בתגובה ל-HC ו-HS גם היא תומכת במודל. שימוש בסודיום אזיד (AZ), שהוא נתק נשימה, הוביל גם הוא לשבירת תרדמה ולעלייה בייצור אצטאלדהיד ואתנול. להרחבה הקורא מופנה לסיכום העבודה שפורסם בעיתונות המדעית, שכולל כבר גם חלק מהמצאים שיתוארו בדו"ח זה (Ophir et al., 2009 Plant Mol Biol). (71:403-423).

על בסיס עבודות שנערכו בצמחים אחרים והראו מעורבות מרכזית של אתילן בבקרת גדילה בתנאי היפוקסיה הועלתה האפשרות כי גם במהלך התעוררות הפקעים ישנה מעורבות של אתילן. המחקר הנוכחי עסק לכן בבחינת השערת המודל בדבר מעורבות אפשרית של אתילן בתהליך שחרור הפקעים מתרדמה.

## תוצאות ודיון

הערות: פרק התוצאות מסכם מספר נסיונות שנעשו במשך שלוש עונות בכל אחד מהנושאים. מובאות תוצאות מסכמות המייצגות את כלל התוצאות ואת המסקנה הכוללת בכל אחד מהנושאים על בסיס כלל התוצאות. תמונות ותאורן נספחו בסוף הדו"ח עקב מגבלות מקום.

### 1. סינתזת אתילן והתעוררות פקעים

#### 1.1. שוברי התרדמה HC ו-AZ משרים עלייה זמנית ברמות האתילן הנפלטות מפקעים מטופלים

ראשית נבחנה ההנחה ההשערה כי שוברי תרדמה דוגמת HC ו-AZ מובילים לאינדוקציה זמנית של סינתזת אתילן אנדוגני. מדידת רמות אתילן באויר שנדגם מצנצנות סגורות שהכילו קבוצות ייחורים חד פרקיים שטופלו ב-HC או ב-AZ הראתה כי שני שוברי התרדמה אכן משרים עלייה זמנית ברמות האתילן הנפלטות מפקעים מטופלים בהשוואה לאלו שנפלטו מפקעי בקורת (תמונה 2 ו-1 (Ophir et al., 2009)). הנתונים המוצגים מייצגים מספר נסיונות בלתי תלויים שנערכו בשלושת שנות המחקר.

#### 1.2. מעכב סינתזת אתילן גורם לעיכוב התעוררות

אסטרטגיה נוספת שננקטה על מנת לבחון את מעורבותו האפשרית של אתילן בתהליך התעוררות הפקעים נעשתה ע"י ניסיון לחסום את מסלול הבייסינטיזת של אתילן מתוך הנחה שלחסימה תהיה השפעה שלילית על שבירת התרדמה. בניסיונות לחסימת הבייסינטיזת נעשה שימוש ב-AOA (aminooxyacetic acid) – חומר המעכב פעילות של ACS וחוסם את המעבר של ADOMET ל ACC) וב- $\text{COCl}_2$  (חומר המשחרר יון קובלט המעכב את פעילותו של ACO ומונע מעבר מ ACC לאתילן).

##### 1.2.1. ניסיון לחסימת הבייסינטיזת תוך שימוש ב-AOA

לאחר הגמעה ראשונית של ייחורי גפן למשך 48 שעות ב-AOA הייחורים טופלו ב-3% HC או במים ואז הוחזרו לצנצנות בעלות נפח של 0.75 ליטר שהכילו AOA באותו ריכוז (נבחנו ריכוזים של 1, 5, 10 mM). הצנצנות נסגרו ל-48 שעות ואז הועברו הייחורים לכלים פתוחים עם מים למעקב התעוררות. אנליזה של דגימות אוויר שנלקחו מהצנצנות הסגורות הראתה כי AOA לא הוביל לירידה ברמת האתילן ובקצב ורמת ההתעוררות (נתונים לא מוצגים).

##### 1.2.2. עיכוב התעוררות תוך שימוש ב- $\text{COCl}_2$

ייחורים חד פרקיים הוכנסו להגמעה בתמיסת  $\text{CoCl}_2$  (3.6 mM) למשך 48 שעות ולאחר מכן רוססו ב-HC ובמים כביקורת. הייחורים הוחזרו לתמיסת ה- $\text{CoCl}_2$  ל-10 ימים נוספים, תוך החלפת תמיסת הקובלט מדי יומיים-שלושה. בנוסף הוצבו בקורות שגרתיות של טיפול HC וטיפול בקורת. הטיפול המתואר בקובלט כלוריד מנע התעוררות של פקעים מטופלים וגם התעוררותם של פקעי בקורת הושבתה (תמונה 3). תוצאה זו תומכת בהנחה שלאיתילן עשוי להיות תפקיד במנגנון של שחרור הפקעים מתרדמה ועשויה להעיד כי חסימה אפטיבית של הסינתזה למשך 10 ימים מבטלת אפשרות מעבר סיגל להתעוררות. ריכוז כפול של קובלט כלוריד הראה תוצאה דומה.

על בסיס מספר נסיונות קודמים לזה שתואר מעל למדנו כי הגמעה בתמיסת  $\text{CoCl}_2$  3.6mM למשך 48 שעות לפני ריסוס HC, שאינה מלווה בהגמעה בקובלט גם לאחר הטיפול (1.2 ו-3.6 מיקרומולר), מבטלת את רב השפעתו המזרזת של HC אולם אינה מונעת התעוררות הפקעים המטופלים ודגם ההתעוררות שלהם דמה לזה של פקעי הבקורת (תמונה 4A). טיפול דומה בתמיסת  $\text{CoCl}_2$  למשך 48 שעות לפני ריסוס פקעים במים (=בקורת לטיפול HC) לא הביא לירידה מובהקת בקצב התעוררות הפקעים בהשוואה לפקעי בקורת שלא הוגמעה בקובלט (תמונה 4B). בניסיון זה הודגמה השפעה תלוית ריכוז משום שטיפול זהה עם תמיסת קובלט בריכוז של 1.2 mM הראה מגמה דומה אולם רמת עיכוב נמוכה יותר (נתונים אינם מובאים).

על בסיס אינטגרציה של המידע מהניסויים המתוארים באיורים 3 ו-4 מועלית ההנחה כי גם בייחורי הבקורת יש לאיתילן השפעה, אולם מאחר שהסינתזה שלו מושרית מאוחר יותר הסרת המעכב לאחר יומיים לא פוגעת בסינתזת אתילן בייחורי הבקורת ולכן לא פגעה בפוטנציאל ההתעוררות של ייחורי הבקורת ובדומה אפשרה התעוררות ייחורים מטופלי HC בדגם דומה לזה של התעוררות

ייחורי הבקורת. אנו מניחים כי האחרונים החמיצו את האפקט המזרז הראשוני המופעל על ידי HC והתנהגו כייחורי בקורת. מן הנתונים מסתבר כי עבור עיכוב משמעותי יותר של התעוררות הפקעים יש לשמר חסימה אפקטיבית בדמות נוכחותו של מעכב למשך כ-10 ימים נוספים (לא נבחנו עדיין תקופות קצרות יותר). מאחר שאינקובציה שנערכה בתמיסת קובלט שלא הוחלפה במהלך 10 ימים היתה בעלת השפעה מוגבלת יותר ולעומתה החלפת תמיסה מדי יומיים-שלושה היתה בעלת השפעה מבהקת נראה כי יש לוודא שהאינקובציה היא במעכב פעיל ע"י החלפתו.

בהתאמה למדווח מעל, שימוש ב-  $\text{COCl}_2$  הוביל לירידה בריכוזי האתילן שנמדדו בצננות שהכילו ייחורים שטופלו ב-3% HC בהשוואה לייחורים שטופלו ב-3% HC בלבד, והעיכוב התגבר עם העלייה בריכוז המעכב מ-0.3 ל-0.6 מילימולר אולם ריכוזים נמוכים אלו לא פגעו ביכולת ההתעוררות של הפקעים (נתונים אינם מובאים).

### 1.3 ביטוי בקרי סינתזת אתילן מוגבר בתגובה לטיפול בשוברי תרדמה

במסגרת המחקר נבחנה התנהגותם של שבטי DNA המקדדים ל-SMA ו-ACO שנבחרו על בסיס אינדיקציה ראשונית לביטויים בפקעים ולרגישותם לטיפולים שוברי תרדמה שהתקבלה בנסיונות הגנומיים שבצענו ותוארו בסקירת הידע 1.3.1 עלייה בביטוי של SAM סינתאז - הגן המקדד לאנזים הראשון במסלול הסינתזה של אתילן

אנליזה ביואינפורמטית הצביעה על קיום של חמישה גנים בגנום הגפן בעלי הומולוגיה לקלון ששובט מפקעים. פריימרים ל-RTPCR תוכננו על הרצף הגנומי שאחוזי ההתאמה שלו היו גבוהים יותר לרצף הקלון שנמצא באנליזה הגנומית כי ביטוי הושפע מטיפולי שבירת תרדמה. cDNA סונטז מ-RNA שהופק מייחורים שטופלו בטיפולי חום, HC, AZ, וביקורת ונדגמו מהם פקעים לאחר 0-96 שעות מהטיפול.

אנליזת ביטוי נערכה באמצעות real time PCR (תמונה 5) ומוצג פרופיל הביטוי שהתקבל בשלוש ריאקציות בלתי תלויות. נראה כי טיפולי חום, אזיד ו-1 HC המתפקדים כטיפולים שוברי תרדמה מגבירים ביטוי SAM סינתאז ועיקר ההגברה חלה 12-24 שעות לאחר הטיפול כאשר נראה שטיפולי אזיד וחום מקדימים את HC בהשפעתם.

### 1.3.2 עלייה בביטוי ACC אוקסידאז - הגן לאנזים האחרון במסלול סינתזת אתילן - בתגובה לשוברי תרדמה

אנליזה ביואינפורמטית הצביעה על קיום שני גנים בגנום הגפן בעלי הומולוגיה לקלון ששובט מפקעים ופריימרים ל-RTPCR תוכננו לפי אותו הגיון שתואר מעל. עלייה בביטוי ACC אוקסידאז תגובה למספר טיפולים שוברי תרדמה (HC, AZ ו-HS) הודגמה באנליזה דומה לזו שתוארה עבור SAM סינתאז (תמונה 6) והובחנה בנקודות זמן דומות אם כי שיאה היה לאחר 24 שעות ממועד הטיפולים השונים בעוד שרמת תעתיק SAM סינתאז הגיעה לשיא כבר לאחר 12 שעות. האינדוקציה של SAM סינתאז ו-ACC אוקסידאז בהשפעת שוברי התרדמה יש הגיון משום שכולם שכולם הגבירו סינתזת אתילן. התוצאות תומכת בהנחת המודל כי אינדוקציה של סינתזת אתילן מבוקרת ברמת הביטוי.

### 1.4 טיפול באתילן אקסוגני מעודד התעוררות פקעים

מאחר שנראה שלאיתילן אנדוגני יש חלק בתהליך ההתעוררות נבחנה האפשרות שאיתילן אקסוגני יעודד התעוררות. בנסיון ראשוני מצאנו כי כליאת ייחורי בקורת הובילה להצטברות אתילן (בהתאמה להנחה ב-2.2 א. שגם ייחורי הבקורת מייצרים אתילן ברמה נמוכה) ולהתעוררות משופרת בהשוואה להתעוררות אותם פקעים באווירה פתוחה, שאינה מאפשרת צבירה אפקטיבית של אתילן. בהתאמה להנחה, הוראה כי סילוק של אתילן ממערכת סגורה המכילה ייחורי בקורת ע"י ספיחתו באמצעות שימוש ב- $\text{KMnO}_4$  מוביל לירידה ברמת אתילן במערכת (תמונה 7A1) ולירידה בקצב ואחוזי התעוררות בהשוואה לבקורת סגורה ללא  $\text{KMnO}_4$  ולהבדל מובהק בקצב ההתעוררות בין ייחורים מטופלי אתילן לייחורי בקורת במערכת סגורה שבה נספח אתילן (תמונה 7A2). על בסיס זה טיפולי הבקורת בנסיונות המתוארים בהמשך כלל  $\text{KMnO}_4$  לספיחת אתילן.

חשיפת ייחורים לאיתילן (100ppm) למשך 48 שעות נעשתה במספר מועדים במהלך מעגל התרדמה, בשלוש שנים עוקבות, שנבדלו בעומק התרדמה של הפקעים כמו שניתן ללמוד מפרופיל ההתעוררות של ייחורי הבקורת. מן הממצאים עולה כי כאשר הפקעים עדיין

לא בשלב התרדמה העמוק ביותר (בד"כ בתפר בין סוף נובמבר לתחילת דצמבר-בתלות במעגל התרדמה באותה שנה) אתילן אקסוגני ממריץ באופן מובהק התעוררות פקעים, בהשוואה לפקעי הבקורת (תמונות 7A2 ו-7B2). לעומת ההשפעה ממריצת ההתעוררות על פקעים שתדמתם אינה עמוקה מאוד (תמונות 7A2, 7B1), נראה כי בכניסה לתרדמה מקסימלית (שמתבטאת בירידה בקצב התעוררות ייחורי הבקורת) טיפול ב- 100ppm לאתילן אקסוגני למשך 48 שעות אין השפעה ממריצה בהשוואה לבקורת (תמונה 7B3). ממצא זה יכול להסביר מדוע טיפולי אתרל שניתנו בעבר בשיא תרדמה לא המריצו התעוררות והובילו להנחה כי לאתילן אין כל מעורבות בהתעוררות מתרדמה. לא ברור מדוע אתילן אקסוגני אינו משפיע בשלב זה של מעגל התרדמה וניתן להעלות אפשרות של מגבלת חדירות מחד ודרישה לריכוז גבוה באזור המריסטמה מאידך. טיפול אתילן לא הוביל לאינדוקציה של סינתזת אצטאלדהיד ואתנול (נתונים לא מובאים) שכן חלה בעקבות טיפול ב- AZ ו- HC (Ophir et al., 2009). על בסיס הבדל זה אנו מניחים כי אתילן פועל במורד הזרם ופעילותו אינה משרה נשימה אנאורבית ואינה תלויה בה, וזאת בשונה מ- HC ו- AZ שמנגנון פעולתם כרוך בעקה נשימתית שמהווה אולי טריגר לסינתזת אתילן.

## 2. העברת סיגנל אתילן והתעוררות פקעים

נוכח התמיכה בהנחה שלאתילן יש תפקיד במנגנון השחרור מתרדמה צפוי שלהעברת סיגנל האתילן תהיה חשיבות בתהליך והיא עשויה להתבטא בהשפעה חיובית של שוברי תרדמה על ביטוי תעתיקי בקרים מרכזיים ו/או רמת החלבון שלהם ובהשפעה שלילית של חסימת מעבר סיגנל אתילן על התעוררות. הנחות אלו נבחנו ואושרו כמתואר בהמשך.

### 2.1 השפעת שוברי תרדמה על ביטוי מרכיבי הולכת סיגנל אתילן 2.1.1 השפעת HC על רמת התעתיק של ההומולוגים מגפן ל- EIN3 ו- EIL3

מוכרים שני בקרים מרכזיים וחליפיים של הולכת סיגנל האתילן שהצטברותם בגרעין מתאפשרת רק בנוכחות אתילן ומאפשרת מעבר סיגנל האתילן. בגרעין בקרים אלו מהווים בו זמנית יחידת קלט של הסיגנל הליניארי המופעל בתא בתגובה לאתילן בגרעין ויחידת פלט המבקרת הפעלה של מניפת תהליכים מבוקרי אתילן במורד הזרם וידוע כי זמינותם מבוקרת ברמת החלבון ולא ברמת התעתיק. ההומולוגים של גפן לשני בקרים אלו המכונים EIN3 ו- EIL1 אותרו ושובטו. במקביל להכנת קונטרקטים לקראת ביטוי חלבון סינטטי והכנת נוגדנים על מנת ללמוד על השתנות אפשרית ברמת החלבון בתגובה לטיפול שוברי תרדמה שימשו הרצפים בסיס לתכנון תחלים עבור אנליזת ביטוי באמצעות Real Time PCR. מוצגות תוצאות מייצגות משתי אנליזות real time PCR בלתי תלויות שנערכו עם RNA שהופק מפקעים מנסיונות שנערכו במועדים שונים לפיהן נראה ש- HC גורם לעלייה בולטת ברמת התעתיק של שני הגנים הנבחנו בעוד שטיפול חום וטיפול AZ לא גרמו לעלייה ברמת EIL3 ואין הסכמה בין שני הנסיונות לגבי ההשפעה על ההומולוג של EIN3.

### 2.1.2 השפעת טיפולים שוברי תרדמה על רמת התעתיק של VvERFBr1 ו- VvERFBr2, הומולוגים של בקרי שעתוק שמבוקרים על ידי EIN3 ו- EIL1

נבחנו גם השפעת על ביטויים של שני גנים השייכים למשפחת ERF (ethylene response factor), משפחה של בקרי שעתוק המבוקרים לפחות בחלקם ע"י EIN3/ EIL1 ומהווים יחידת תווך בין מסלול הסיגנל הליניארי של אתילן המסתיים בגרעין לענפים שונים של מניפת התהליכים בצמח המושפעים על ידי אתילן. לאחרונה הוכח כי הומולוג מאורז מופעל על ידי אתילן ומבקר התארכות תאים בתגובה להצפה. שני הגנים שנבחנו נבחרו על בסיס אינדיקציה ראשונית להיותם רגישים לסיגנל HC שהתקבלה בנסיון הצ'יפים שתואר במבוא. אינדיקציה זו הובילה להשערה כי עשויה להיות להם משמעות בבקרת התעוררות פקעים. בתמונה 9 מוצגים פרופילי ביטוי מייצגים של VvERFBr1 ו- VvERFBr2 שנמצאו בשלושה נסיונות שונים המעידים כי HC ו- HS משרים עליה בביטוי שני הגנים ואילו טיפול באזיד משרה עליה בביטוי VvERFBr2 ולא ברור עדיין אם הוא משפיע באופן דומה על VvERFBr1. יצויין כי למרות שההבדלים בין פרופילי הביטוי יציבים בחזרות השונות קבלנו סדרי גודל שונים של הגברה בנסיונות שונים שלא מאפשרים מיצוע הגיוני. הללו יכולים לנבוע מכשל טכני או מהבדל בתגובת הפקעים (ראה פסקה הבאה לתמיכה בהשערה זו) ונצטרך לבצע עוד מספר נסיונות על מנת להגיע למסקנה.

פקעים שטופלו בריכוזים עולים של HC (0-7%) ונדגמו לאחר 24 ו 48 שעות מהטיפול שימשו להפקת RNA ונבחנה השתנות אפשרית של רמת תעתיקי הגנים VvERFBr1 ו-VvERFBr2 בתלות בריכוז באמצעות Real Time PCR. בתמונה 9 ניתן לראות כי עלייה בריכוז ה HC הובלה לעלייה ברמת תעתיק VvERFBr1. התקבלה תוצאה דומה גם עבור VvERFBr2 והיא הוצגה בדו"ח השנה השניה. עוד ניתן לראות כי רמת הביטוי בפקעים שנדגמו לאחר 24 שעות מהטיפול ב HC גבוהה יותר מרמת הביטוי בפקעים שנדגמו לאחר 48 שעות מהטיפול. נתונים אלו עשויים להעיד על מהירות התגובה של מערכת סיגנל האתילן ל-HC ואת הקשר הכמותי הישיר בין מידת התגובה ל- HC לבקרי השעתיק מסוג ERF האמורים לשמש כמתווכים בין מערכת העברת סיגנל האתילן לגורמים במורד הזרם המעורבים בשחרור מתרדמה.

## 2.2 השפעת חסימת מעבר סיגנל האתילן על התעוררות פקעים

על בסיס המודל והתוצאות שתוארו מעל הנחת העבודה היתה כי עיכוב מעבר סיגנל אתילן יעכב פעילותו שוברת התרדמה של HC, למרות הגברת סינתזת אתילן בתגובה לטיפול זה, משום שבהיעדר סיגנל אתילן לא תתאפשר הפעלת module B בתהליך (ראה תמונה 1). מאחר ושימוש ב-2% אזיד וב- HS הוביל לשבירת תרדמה בפקעי גפן ולעלייה בייצור אתילן, בדומה לתגובה ל-HC, הועלתה ההנחה כי הדרישה להולכת סיגנל אתילן הינה משותפת לשוברי תרדמה שונים ולכן עיכוב מעבר סיגנל אתילן יעכב גם את פעילותם שוברת התרדמה של אזיד ו-HS.

חומרים בעלי מבנה כימי דומה למבנה האתילן הינם בעלי פוטנציאל לחסימת מעבר הסיגנל של אתילן. בהתאמה, NBD ו-MCP1 ידועים כמעכבי מעבר סיגנל האתילן. יוני כסף המיושמים כ  $AgNO_3$  או כ  $Ag(S_2O_3)_2^{3-}$  (Silver thiosulfate, STS) ידועים אף הם כבעלי פוטנציאל לעיכוב סיגנל האתילן. מנגנון הפעולה של מעכבי הסיגנל אינו ידוע, ולא ידוע אם כולם נקשרים לכל הרצפטורים של אתילן או שקיימת ספציפיות מעכב-רצפטור. חשוב להזכיר כי במקביל לעיכוב התגובה לאתילן מעכבים המבוססים על יוני כסף וגם המעכב NBD מעודדים סינטזה של אתילן.

### 2.2.1 השפעת NBD על התעוררות ייחורי בקורת וייחורים מטופלי HS

בתמונה 10 ניתן לראות כי חשיפה של פקעים ל- NBD למשך 48 שעות מסיום טיפול HS הביאה לביטול האפקט הממריץ של HS ולעיכוב בולט בהתעוררות הפקעים. גם התעוררות פקעי בקורת עוכבה לרמה דומה. בנסיון דומה שבו נחשפו הייחורים ל-NBD למשך 48 שעות לפני הטיפול בנוסף לחשיפה ל-48 שעות לאחר הטיפול היתה השבתה מוחלטת של יכולת ההתעוררות של הפקעים (נתונים לא מובאים). ראוי לשים לב כי הנסיונות נערכו במחצית נובמבר, כאשר תרדמת פקעי הבקורת אינה עמוקה ולכן האפקט הממריץ של HS אינו בולט כמו שהוא בולט בהמשך מעגל התרדמה (Halaly et al. 2008; Ophir et al. 2009).

### 2.2.2 השפעת NBD על התעוררות ייחורים מטופלי AZ

במהלך המחקר למדנו כי במערכת סגורה יש לטיפול 2%-AZ השפעה טוקסית שמגבילה את האפקט המעורר שמתקיים עבור פקעים מטופלי 2%-AZ שלא נסגרו בצנצנת למשך 48 שעות. לפיכך נערכו הנסיונות המסכמים לבחינת השפעת NBD על האפקט המעורר של AZ עם פקעים מטופלי 1%-AZ (לאחר בחינה מקדימה של השפעתו המעוררת של ריכוז זה שנתונה אינם מובאים). בתמונה 11 ניתן לראות כי התעוררות פקעים שטופלו ב-1%-AZ מיד לאחר חיתוך הייחורים היתה טובה משל פקעי הבקורת שנחתכו במקביל. לעומת זאת, התעוררות פקעים שטופלו באופן זהה ואז נחשפו ל NBD למשך 48 שעות הושבתה לחלוטין. יצויין כי התעוררות ייחורי הבקורת עוכבה גם היא באופן מובהק על ידי NBD אך לא הושבתה כליל. גם כאן ההשערה היא שבייחורי הבקורת התהליכים עשויים לחול מאוחר יותר ולכן חסימת הסיגנל לתקופה של 48 שעות חוסמת את האפקט הממריץ של AZ שחל בסמיכות למועד מתן הטיפול טוב יותר משהיא חוסמת את ההתעוררות של ייחורי הבקורת.

### 2.2.3 השפעת NBD על התעוררות ייחורים מטופלי HC

ב-12 תמונה מובאות תוצאות ממספר נסיונות בלתי תלויים שנערכו במהלך חורף 2010. ניתן לראות כי חשיפה של פקעים מטופלים ב-12 NBD בשלושה נסיונות שונים שנערכו בשליש האחרון של נובמבר הביאה לביטול האפקט הממריץ של HC ולעיכוב מוחלט של התעוררות הפקעים בין אם נחשפו ל-12 NBD למשך 48 שעות לאחר הטיפול ב-12 HC (תמונות 12 D, H) או למשך 48 שעות לפני הטיפול ו-48 שעות אחריו (תמונה 12 F). התעוררות פקעי הבקורת בנסיונות אלו עוכבה אף היא על ידי NBD אולם נראה כי כאשר נחשפו ל-12 NBD למשך 48 שעות לאחר הטיפול עוכבו פחות מהפקעים מטופלי HC ונדרשה חשיפה למשך 48 שעות לפני הטיפול ו-48 שעות אחריו כדי להביא לעיכוב מוחלט של התעוררות (להשוואה ראה A מול B ו-C מול E).

בנסיונות דומים שנערכו בשליש הראשון של דצמבר בשלב מאוחר יותר של מעגל התרדמה (למעקב אחר העלייה בעומק התרדמה יש לעקוב אחר השתנות בפרופיל ההתעוררות של פקעי הבקורת הלא מטופלת בין תמונות A, E, G, I, K) דרגת העיכוב שהושגה על ידי חשיפה ל-12 NBD הצטמצמה מאוד (5 לדצמבר – תמונות 12 I, J) או התבטלה (12 לדצמבר – תמונות 12 K, L).

על בסיס נסיונות אלו מועלית ההנחה שכאשר הפקעים נמצאים בתרדמה מאוד עמוקה עשויה להיות הפעלה של מנגנון אלרנטיבי שאינו תלוי אתילן. יש לסייג השערה זו משום שבמסגרת נסיון אחר שהתחיל ב-13 בדצמבר 2010 (ראה תמונה 15) נראה עיכוב מאוד מובהק של התעוררות ייחורי בקורת וייחורים מטופלי HC. על מנת לאשש את הקשר האפשרי בין עומק התרדמה לשינויים במידת הרגישות ל-12 NBD יהיה צורך בבחינה חוזרת ומפורטת בין מחצית נובמבר למחצית דצמבר כדי לאשר את יציבות התנהגות הפקעים.

#### 2.2.4 השפעת מעכב מעבר סיגנל אתילן נוסף - 1-MCP

בנסיונות אלו הוכנסו ייחורי בקורת לצנצנות עם מים ולאחר מכן הוכנסה במהירות מבחנה עם 1-MCP, לאחר המסה מהירה במים של חומר באותה מבחנה שהוכן מראש בפורמולציה של אבקה ובמשקל שאמור לתת את הריכוז המבוקש בנפח צנצנת נתון. וסגירה מהירה של הצנצנת כדי למנוע איבוד חומר בנידוף מהיר. שיטה זו נועדה לחסוך בחומר שלא ניתן לקנייה בשוק החופשי אולם היא בעייתית מבחינת השליטה בריכוז ולצערנו לא היו לנו אמצעים על מנת לוודא שהריכוז בפועל הוא הריכוז המחושב. בשלב ראשון נבחנו 3 ריכוזי 1-MCP 5,10,100ppm בהשוואה לייחורי בקורת שנסגרו ללא 1-MCP ולא נראה עיכוב משמעותי בשבירת התרדמה בכל שלושת הריכוזים בהשוואה לייחורי הביקורת שנסגרו ללא החומר (נתונים לא מובאים). הועלתה האפשרות שהיישום אינו אופטימלי ובעתיד עדיף ליצור סטוק של גז בצנצנת ולהזריק את ה-1-MCP (בתלות בזמינות כמות מתאימה של חומר). בנוסף הועלתה האפשרות ש-1-MCP ו-NBD פועלים על רצפטורים שונים לאתילן (קיימים חמישה רצפטורים, הוכח קישור MCP לשניים ולא נעשתה עבודה על NBD). בשיחות עם מומחים בתחום בכנס אתילן בקיץ 2009 התברר שאפשרות זו סבירה ודווח על פירות ומצבים שבהם MCP אינו אפקטיבי ו-NBD אפקטיבי ועל מצבים/מינים בהם נדרשים ריכוזים גבוהים מאוד של MCP).

ב-2010 הצלחנו להשיג כמות קטנה של תחליף סיני ל-MCP וחזרנו על אותה פרוצדורה לא אופטימלית עקב מגבלת חומר כאשר נבחנו השפעת 2ppm ו-20ppm על התעוררות פקעי בקורת ופקעים מטופלים ב-12 HC בסוף נובמבר. בדומה לתוצאות מהשנה הקודמת לא נמצאה השפעה מעכבת מובהקת של החומר על התעוררות ייחורי בקורת אולם נמצא עיכוב מובהק אך לא דרמטי של ההשפעה הממריצה של HC בנוכחות 2ppm (תמונה 13). לעומת זאת לא נמצא עיכוב של ייחורים מטופלי HC או ייחורי בקורת בנוכחות 20PPM. התחמקות הבקורת מעיכוב הוראתה במקרים נוספים שתוארו מעל והועלו הסברים אפשריים. העדר עיכוב השפעה ממריצה של HC בריכוז גבוה של MCP הוא נתון שאין לו כרגע הסבר ואין ספק שיהיה צורך לחזור על הנסיונות בצורה איכותית יותר בהמשך בתלות בזמינות המעכב.

#### 3. תזמון נקודת מעבר סיגנל האתילן לאחר טיפול בשוברי תרדמה

בדו"ח השנה הראשונה דווח כי שימוש ב-NBD (שהוא מעכב העברת סיגנל אתילן) מוביל לעלייה דרמטית בייצור אתילן בפקעים, ככל הנראה כתוצאה מהיזון חוזר, ותוצאה זו מתאימה לדיווחים בספרות. ההשערה שהועלתה לאור התוצאה היתה כי סגירה של פקעים בנוכחות NBD למשך 12-24 שעות בלבד חושפת את הפקעים לרמות אתילן גבוהות שנוצרו בתגובה ל-NBD, מהד, אך אינה מספיק ממושכת על מנת לאפשר עיכוב העברת הסיגנל בחלון הזמן המתאים שבו מעבר סיגנל אתילן הוא בעל השפעה על

התעוררות פקעים, מאידך. ניתן לדמות סיטואציה זו של טיפול קצר ב-NBD לטיפול באתילן חיצוני או יתרה מזאת, לטיפול HC המעלה את רמת האתילן האנדוגני במערכת הסגורה בחלון הזמן האפקטיבי. בהתאמה הונח שעיקוב מעבר הסיגנל לפרק זמן שיחפוף לחלון הזמן שבו מעבר סיגנל אתילן הוא בעל השפעה על התעוררות פקעים יהיה בעל השפעה מעכבת על התעוררות, ואילו עיקוב מעבר סיגנל אתילן או רמת אתילן גבוהה במועד שהוא מעבר לחלון הזמן האמור לא השפעה ישפיעו על זירוז התעוררות.

לאור הנחות אלו נערכה בחינה של השפעת חלון הזמן בו נחשפו הפקעים ל-NBD לראשונה (כאשר החשיפה עצמה לתקופה קבועה) על מידת העיקוב של ההשפעה המזרזת של טיפול HC שניתן בנקודת האפס. כל הפקעים טופלו ראשית ב HC ולאחר זמנים שונים מטיפול HC, או טיפול בקורת בקורת, נסגרו הייחורים בנוכחות NBD למשך 48h. בחורף 2009 (בנסיון שנערך ב-22 לנובמבר) נמצא עיקוב התעוררות מירבי באוכלוסיות פקעים שנחשפו ל-NBD לאחר 24-96 שעות ממתן HC. בהשוואה, באוכלוסיות פקעים שנחשפו ל-NBD במועד הטיפול ולאחר 12 שעות היתה פחיתה בהשפעה המעכבת של NBD ואילו חשיפה ל-NBD לאחר 122 שעות לא עכבה התעוררות (הנתונים נמצאים בדו"ח שנה שניה).

נערכה חזרה נוספת על הנסיון המתואר נערכה בחורף 2010 (28 לנובמבר) תוך הכנסת שינוי- הנסיון התחיל מיד לאחר חיתוך הייחורים ולא לאחר 24 שעות. מן התוצאות (תמונה 14) נראה כי חשיפה ל-NBD לאחר 0,24,96,168 שעות מטיפול HC או בקורת עכבה מאוד את התעוררות הפקעים בהשוואה לטיפולים זהים לחלוטין שבהם לא היתה חשיפה ל-NBD. בדומה למה שתואר מעל נראה כי רמת העיקוב לאחר 12 ולאחר 168 שעות (עבור בקורת- תמונה 14E) ולאחר 120 (בטיפול HC) נמוכה מזו שהושגה בנקודות הזמן שביניהן. יצויין כי הטיפולים שנסגרו 0,24,96,168 לאחר טיפול לשבירת תרדמה ללא NBD הראו מגמת התעוררות דומה לזו המתקבלת מהביקורות הפתוחות. עוד חשוב לציין כי יחורי הבקורת הושפעו פחות מעיקוב סיגנל אתילן בהשוואה לייחורים מטופלי HC, כמו שדווח בנסיונות אחרים בדו"ח זה.

על פי הידע הנוכחי קשה לגבש מסקנה סופית לגבי חלון זמן מוגבל המעכב התעוררות אך יש עדויות ראשוניות שמכוונות לבחינה נוספת של האפשרות שחלון הזמן שבין 24 שעות ל- 96 שעות הוא החלון האפקטיבי ביותר.

בנסיון נוסף שנערך במחצית דצמבר 2009 נחשפו כל הייחורים ל-NBD למשך 48 שעות וטופלו ב- HC 24-120 שעות לאחר הוצאת הייחורים מטיפול NBD. מן התוצאות עלה שהשפעתו המזרזת של HC פוחתת ככל שעובר זמן רב יותר בין סיום תקופת החשיפה ל-NBD לתחילת החשיפה ל-HC (הנתונים הובאו בדו"ח שנה שניה). מאחר שלא הועמדה בקורת מתאימה ללא חשיפה ל-NBD לא ניתן היה ללמוד אם ל-NBD יש חלק בהתנהגות המתוארת או שהיא עשויה לנבוע בעלייה ברגישות האוכלוסיה ל-HC בתנאי המרצה בחדר הגידול ואינה תלויה ב-NBD.

נסיון דומה עם בקורות מתאימות נערך במחצית דצמבר 2010 תוך הכנסת שינוי- הנסיון התחיל מיד לאחר חיתוך הייחורים ולא לאחר 24 שעות שהייה בחדר גידול. מנסיון זה המתואר בגרף 16 למדנו כי (א) בטיפול HC שניתנו בנקודות זמן שונות ממועד החיתוך במערכת פתוחה (תמונה 15A) או סגורה וללא חשיפה ל-NBD דחיית יישום HC דחתה את התחלת ההתעוררות אך מרגע שהתחילה התעוררות פרופיל ההתעוררות היה דומה. מכך אנו למדים שמתן מאוחר של HC לא פגע בייחורים. (ב) טיפול NBD מקדים, למשך 48 שעות לאחר החיתוך, הקטין באופן מובהק את ההשפעה הממריצה של HC שניתן לאחריו, ללא תלות בפרק הזמן מועד מתן HC. התעוררות פקעים מטיפולים אלו לא הושבתה לחלוטין ופרופיל ההתעוררות שלהם דמה יותר לזה של פקעי הבקורת. ההבדל המשמעותי בתוצאות בין השנים מחייב לערוך בשנה הבאה נסיון זהה לחלוטין בשני מועדים במעגל התרדמה כדי לקבל מושג יציב על התנהגות הפקעים.



**מטרת המחקר לתקופת הדו"ח**

שינויים שנמצאו בטרנסקריפטום פקעי גפן במחקר קודם העלו את ההשערה שלאיתילן עשוי להיות תפקיד במנגנון שבירת התרדמה. המחקר הנוכחי התמקד בבחינת השערה זו באמצעות מגוון נסיונות שבחנו השפעות שוברי תרדמה על התנהגות בקרים מרכזיים של ביוסינתזה והעברת סיגנל איתילן והשפעות של שיבוש ביוסינתזה והעברת סיגנל איתילן על ההשפעה ממריצת ההתעוררות של שוברי תרדמה ועל פרופיל ההתעוררות של פקעים.

**עיקרי התוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח:**

תוצאות המחקר מעלות כי שוברי תרדמה שונים מגבירים את ביטויים של בקרי סינתזה איתילן ומגבירים את רמת האיתילן האנדוגני. בהתאמה הם מגבירים גם את ביטויים של מרכיבים מרכזיים בשרשרת הובלת הסיגנל איתילן בדגם שהוא תלוי ריכוז שובר התרדמה. עיכוב סינתזת איתילן באמצעות קובלט כלוריד ועיכוב מעבר סיגנל איתילן באמצעות המעכב NBD פוגעים ביכולתם של שוברי התרדמה שנבחנו להמריץ התעוררות ומעכב את התעוררות הפקעים לדרגות משתנות התלויות במועד הטיפול על רצף מעגל התרדמה החורפי. על בסיס התנהגות פקעי הבקורת נראה כי יש קווי דמיון למנגנון ההתעוררות הטבעי אולם ישנם הבדלים שמקורם בהבדל בעיתוי ועצמת הסיגנל. **המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו:** תוצאות המחקר המדווח תומכות בהנחת המוצא כי שוברי תרדמה מגבירים סינתזת איתילן ומעבר סיגנל איתילן ומציעים כי סיגנל איתילן הוא בעל תפקיד חשוב במנגנון שבירת התרדמה ובהעדרו-אם בגלל השבתת ביוסינתזה של איתילן או עיכוב מעבר סיגנל-מתבטל האפקט הממריץ של שוברי התרדמה ונפגעת יכולת ההתעוררות של הפקעים..

**הבעיות שנותרו לפתרון והתייחסות המשך המחקר לגביהן.**

ההבדלים המצויינים בהתנהגות הפקעים לאורך מעגל התרדמה ובין פקעי בקורת לפקעים מטופלים ראויים למחקר נוסף. איתור בקרים במורד הזרם המופעלים על ידי סיגנל האיתילן ומהווים החוליה הבאה במפל הארועים הממריץ את המריסטמה לחדש את פעילותה הוא החוליה החשובה הבאה בהבנת מנגנון שבירת התרדמה.

**האם כבר הוחל בהפצת הידע?**

לא.

**פרסום הדו"ח:** מומלץ לפרסם את הדו"ח ללא הגבלה.

**תמונה 1: מודל היפוטטי לתאור מהלך הארועים במהלך התגובה לשוברי תרדמה.**

**תמונה 2: טיפולים לשבירת תרדמה מגבירים פליטת אטילן מהפקעים.** זמורות מהזן early sweet הובאו מכרם בגלגל ב-8.11.09 ונחתכו לייחורים חד פרקיים באותו יום. 70 ייחורים חד פרקיים נסגרו בצננות 2 ליטר מיד לאחר שטופלו באלזודף בריכוז 3% או אזיד בריכוז 2%, במקביל נסגרו ייחורי ביקורת שטופלו במים. הועמדה ביקורת נוספת של ייחורים שטופלו במים ונסגרו בנוכחות KMNO<sub>4</sub> שסופה אטילן (תמיסה של 0.47 מולר נספחה לוורמקוליט שהוכנס לאחר מכן לצננות בתוך מבחנת 50 מ"ל מחוררת). דגימות אוויר נלקחו מהצננות לאחר 5, 24 ו 48 שעות מהטיפול והוזרקו למכשיר GC לאיתור אטילן. כל טיפול נערך בשלוש צננות המייצגות שלוש חזרות ומוצגת סטיית התקן מהמוצע.

**תמונה 3: השפעת טיפול ממושך במעכב סינתזת אטילן על התעוררות פקעים.** ייחורים הוכנו מחומר צמחי שהובא בתאריך 6.12.10 והוכן כמתואר בתמונה 2. הייחורים הוגמנו בתמיסת CoCl<sub>2</sub> (3.6 mM) למשך 48 שעות ולאחר מכן רוססו ב-HC או במים כביקורת. הייחורים הוחזרו לתמיסת ה-CoCl<sub>2</sub> ל-10 ימים נוספים, תוך החלפת תמיסת הקובלט מדי יומיים-שלושה. הייחורים הוצבו בחדר גידול (14 שעות אור, טמפרטורה של 22 מ"צ) ונוטרה פריצת פקעים למשך 28 יום ממועד הטיפול. בכל קבוצת טיפול היו 15 קבוצות בנות 10 ייחורים ומוצגת שגיאת התקן.

**תמונה 4: השפעת טיפול קצר מועד במעכב סינתזת אטילן על התעוררות פקעים.** ייחורים הוכנו מחומר צמחי שהובא ב-21.12.09. הייחורים הוגמנו בתמיסת CoCl<sub>2</sub> למשך 48 שעות ולאחר מכן רוססו ב-HC או במים כביקורת והועברו למיכלי עם מים בלבד למעקב אחר התעוררות. יתר הפרטים כמתואר בתמונה 3.

**תמונה 5: השפעת טיפולים שוברי תרדמה על רמת התעתיק של SAM סינתאז.** ייחורים מהזן early sweet הוכנו מחומר צמחי שהובא ב-15.12.08, טופל כמתואר בתמונה 2 עבור HC ואזיד ונטבל למשך שעה ב-50 מ"צ עבור טיפול חום (HS). טיפול ביקורת נטבל במים בטמפרטורת החדר. הייחורים הועמדו בכוסיות מים בחדר גידול בתנאים המתוארים בתמונה 3. 100 ייחורים נדגמו באקראי והוצבו בחדר גידול (14 שעות אור, טמפרטורה של 22 מ"צ) ונוטרה פריצת פקעים למשך 28 יום ממועד הטיפול. יתר הפקעים נאספו לאחר 0,3,6,12,24,48,96 שעות ממתן הטיפול והוכנסו להקפאה ב-80 מ"צ. רמת תעתיק הגן נבחנה באמצעות quantitative Real-Time PCR שהתבססה על עקומת כיוול. נערכו שלוש ריאקציות cDNA ל-RNA מפקעים שנאספו בכל נקודת זמן ששמשו לשלוש אנליזות בלתי תלויות והיו שתי חזרות טכניות בכל הרצת RT-qPCR. הביטוי היחסי (RE) נקבע על ידי נרמול ערכי הביטוי כנגד כמות התעתיק של אקטין בכל אחת מהדוגמאות והיחסים חושבו בהמשך על פי מתן ערך של 1 לערך הנמוך ביותר שהתקבל באנליזה.

**תמונה 6: השפעת טיפולים שוברי תרדמה על רמת התעתיק של ACC אוקסידאז.** הנסיון נערך כמתואר בתמונה 5.

**תמונה 7: השפעת טיפול באטילן על התעוררות פקעים.** (A1) חומר צמחי שהובא ב-7.12.08 הוכן וטופל כמתואר בתמונה 2. במקביל לטיפולי אלזודף, בקורת ובקורת בנוכחות KMNO<sub>4</sub> הועמד טיפול בו נסגרו ייחורים בנוכחות אטילן (100ppm). מכל טיפול נסגרו 3 צננות (סה"כ 210 ייחורים). יתר פרטי הניסוי היו כמתואר בתמונה 2. (A2) הייחורים מהטיפולים המתוארים ב-A1 הוצאו מהצננות לאחר 48 שעות, 70 ייחורים נדגמו באקראי וקובצו ל-7 קבוצות של 10 ייחורים והוכנסו לחדר גידול. תנאי הגידול ומעקב ההתעוררות כמתואר בתמונה 3. 3B, 2B, 1B נסיונות נערכו עם חומר צמחי שהובא מהכרם ב-8.12.09, ב-23.11.10 וב-12.12.10 בהתאמה. יתר פרטי הניסוי כמפורט עבור 2A.

**תמונה 8: השפעת טיפולים שוברי תרדמה על רמת התעתיק של ההומולוגים של EIN3.** הנסיון נערך כמתואר בתמונה 5.

**תמונה 9: השפעת טיפולים שוברי תרדמה על רמת התעתיק של VvERFBr1 ו-VvERFBr2.** הנסיון נערך כמתואר בתמונה 5.

**תמונה 10: השפעת מעכב מעבר סיגנל אטילן על ההשפעה ממריצת ההתעוררות של טיפול חום.** חומר צמחי הובא ב-15.11.10, נחתכו ביום למחרת ונטבל למשך שעה ב-50 מ"צ או במים בטמפרטורת החדר כביקורת. מיד בתום הטיפול הוכנו 5 קבוצות של 10 ייחורים שהושארו למעקב התעוררות בחדר גידול מבוקר ו שש קבוצות בנות 70 ייחורים הוכנסו ל 6 צננות של 2 ליטר. הייחורים בשלוש צננות מכל טיפול נחשפו לNBD ע"י הכנסת 10 מ"ל של החומר במבחנה פתוחה לצננות) והצננות נסגרו ל-48 שעות. לאחר פתיחת הצננות הייחורים הוצבו בכלים עם מים בחדר גידול לניטור התעוררות במספר נקודות זמן ממועד פתיחת הצננות. יתר הפרטים כמפורט בתמונה .

**תמונה 11: השפעת מעכב מעבר סיגנל אטילן על ההשפעה ממריצת ההתעוררות של טיפול אזיד.** הניסוי נערך כמתואר בתמונה 10 עם חומר צמחי שהובא מהכרם ב-12.12.10. החומר הוכן וטופל כמתואר בתמונה 2 והנסיון בוצע כמתואר בתמונה 10. טיפול

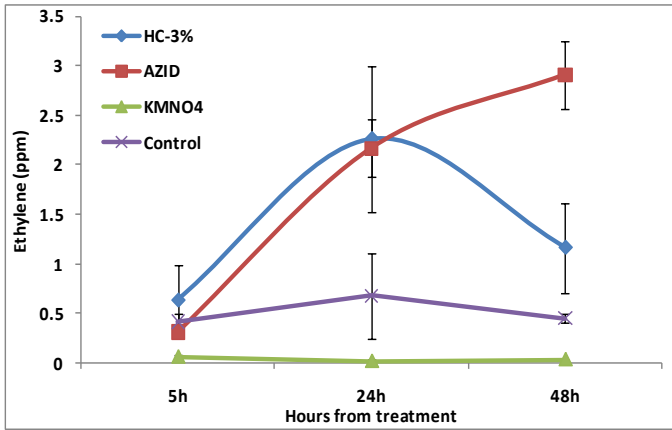
הבקורת נסגר בנוכחות  $KMnO_4$  אך בנוכחות NBD. לאחר פתיחת הצננות נדגמו 30 ייחורים מכל צנצנת להכנת 9 קבוצות בנות 10 ייחורים למעקב אחר התערורות שנערך כמתואר בתמונה 3.

**תמונה 12: השפעת מעכב סיגנל אתילן על ההשפעה ממריצת ההתערורות של טיפול HC.** ייחורים טופלו בטיפול אלזודף 3% או מים ונסגרו בצנצנות עם ובלי NBD למשך 48 שעות כאשר פרטי הניסוי זהים למתואר בתמונה 11. התבצעו מספר נסיונות עם חומר צמחי שנדגם במספר מועדים שונים: (A) 14.11.10 (B) 15.11.10 (C, D) 21.11.10 (E, F) 21.11.10 (G, H) (I, J) 5.12.10 (K, L) 12.12.10. בנסיונות המוצגים בפנלים A, E ו-F נסגרו הייחורים עם NBD 48 שעות לפני הטיפול ו-48 שעות לאחריו. ביתר הנסיונות נערכה החשיפה ל-NBD למשך 48 שעות לאחר הטיפול.

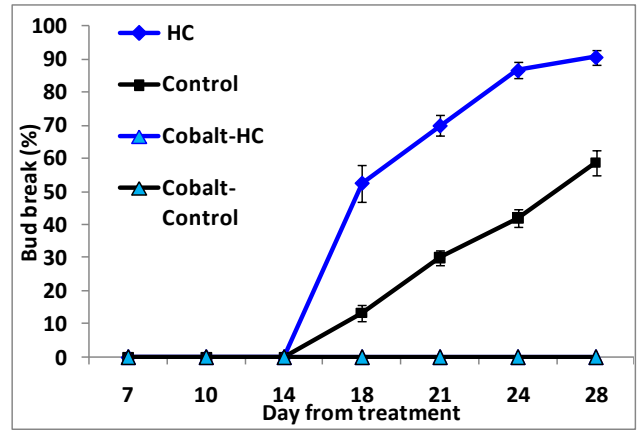
**תמונה 13: השפעת MCP1 על התערורות פקעים.** חומר צמחי הובא בתאריך 23.11.10, הוכן כמתואר בתמונה 2 וטופל במים כבקורת אן ב-3% אלזודף. לאחר הטיפול הוכנסו קבוצות בנות 60 ייחורים חד פרקיים לצנצנות 2 ליטר ונסגרו. עבור כל טיפול הוכנו 6 צנצנות שרק ל-3 מהן הוכנסה מבחנה עם אבקה למתן ריכוז סופי של MCP1 2ppm. טיפול הביקורת ללא ה-MCP נסגר בנוכחות  $KMnO_4$ . לאחר 48 שעות הצנצנות נפתחו והייחורים הועברו למעקב התערורות כמתואר בתמונה 3.

**תמונה 14: השפעת מועד הטיפול ב-NBD לאחר מתן טיפול HC על התערורות פקעים.** חומר צמחי הובא בתאריך 28.11.10, הוכן כמתואר בתמונה 2 מיד עם הבאתו וטופל באותו יום. מחצית הייחורים טופלו באלזודף כמתואר בתמונה 2 ומחצית טופלה במים ושימשה כבקורת. במספר נקודות זמן לאחר מתן טיפול שבירת התרדמה נסגרו בכל צנצנת 6 קבוצות בנות 10 ייחורים מטופלים ב-6 צנצנות 2 ליטר למשך 48 שעות כאשר רק לשלוש מהן הוכנס NBD. ייחורי בקורת טופלו באותה מערך טיפולים. באיורים A-D מוצג דגם ההתערורות לאחר 0,24,96,168 שעות ממתן הטיפול שתועד וחושב כמתואר בתמונה 3. באיורים E ו-F מוצגת השוואה בו זמנית של התנהגות פקעי טיפול ובקורת שנחשפו ל-NBD במועדים שונים.

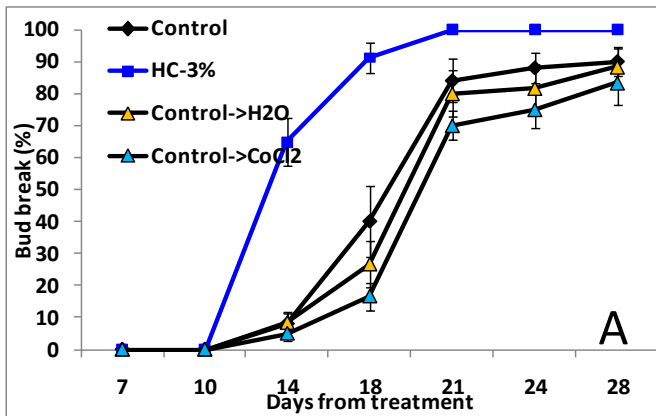
**תמונה 15: השפעת מועד הטיפול ב-HC לאחר מתן טיפול NBD על התערורות פקעים.** חומר צמחי הובא בתאריך 12.12.10, הוכן כמתואר בתמונה 2 מיד עם הבאתו והוכנס לצנצנות באותו יום. שליש מהייחורים נסגרו בנוכחות  $KMnO_4$  (KM), שליש עם NBD ושליש נשארו בכלים פתוחים בחדר גידול. לאחר 48 שעות הועברו כל הייחורים הועברו לכלים פתוחים בחדר גידול וטופלו בנקודות זמן שונות (24,48,96,120) ב-3% HC או במים כביקורת. ייחורים שטופלו ב-KM או NBD שמשו להצבת שלוש חזרות של שלוש צנצנות עם 60 ייחורים בכל צנצנת עבור כל טיפול C ו-HC. ייחורים ששהו בתחילת הניסוי במיכלים פתוחים שמשו להצבת 9 חזרות בנות 10 ייחורים לטיפולי HC ובקורת. מעקב התערורות תועד וחושב כמתואר בתמונה 3. מעקב התערורות נערך עם פתיחת הצנצנות והכנסת הייחורים לחדר גידול בפנל A מתוארת התנהגותם של ייחורים שהושארו בכלים פתוחים וטופלו ב-HC במספר נקודות זמן. בפנלים B, C, D מובאת השוואה בין התנהגות ייחורים שטופלו ב-HC מיד עם סיום טיפול NBD לכאלו שנחשפו לטיפול לאחר 24, 48 ו-120 שעות, בהתאמה. מצורפות בקורות טיפול HC שלא נחשפו ל-NBD בכל נקודות זמן (KM-HC) ובקורות שנחשפו או לא נחשפו ל-NBD אך לא טופלו ב-HC (NBD-C, KM-C).



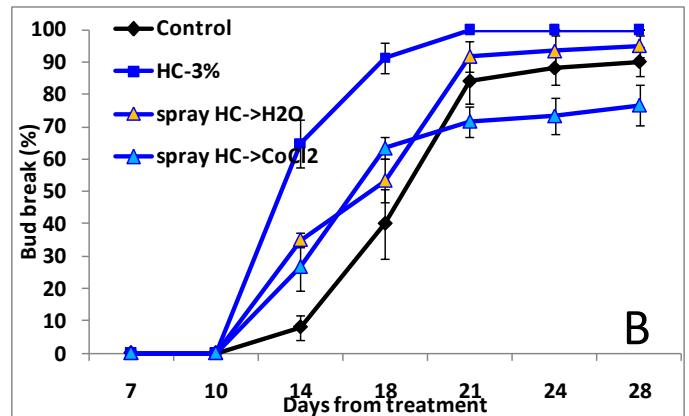
תמונה 2



תמונה 3

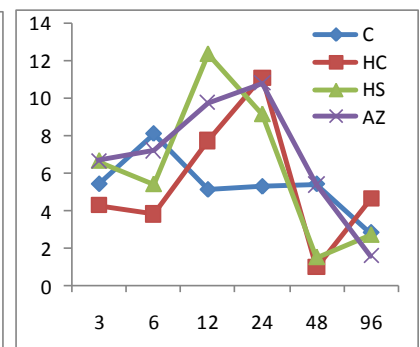
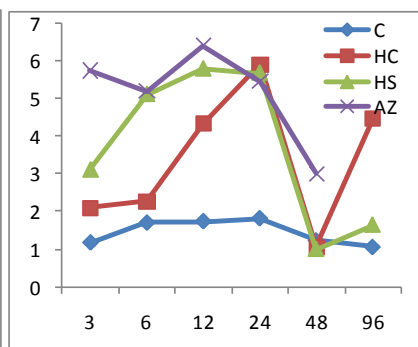
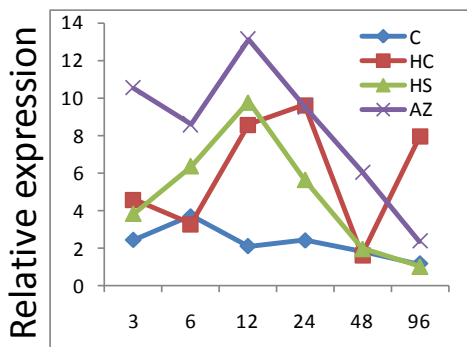


A



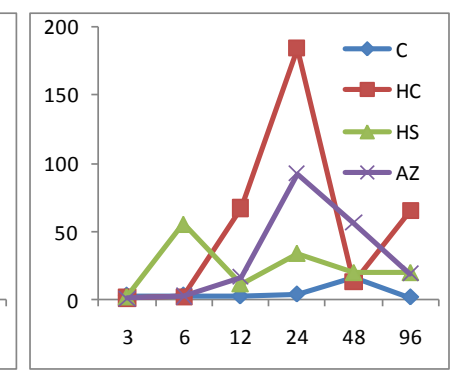
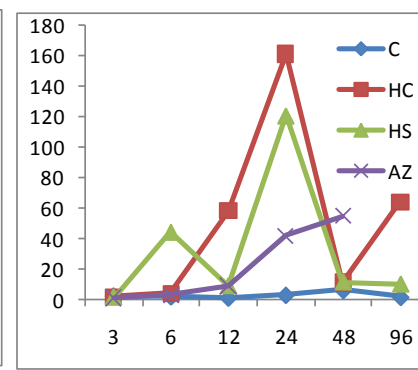
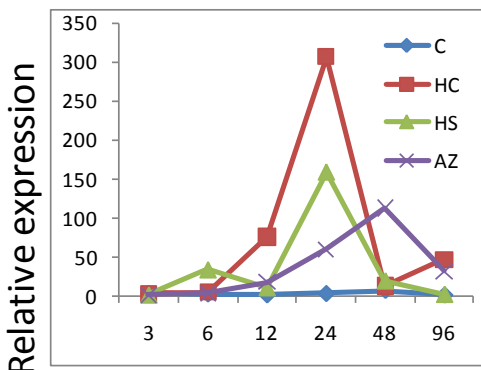
B

תמונה 4



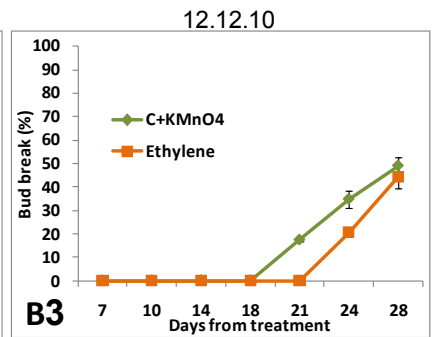
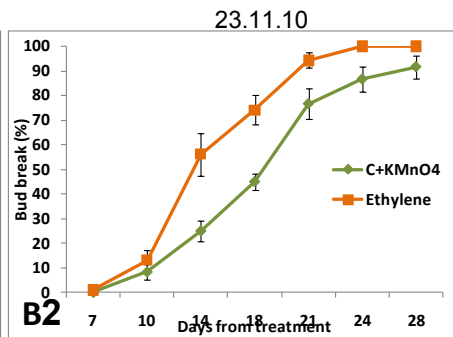
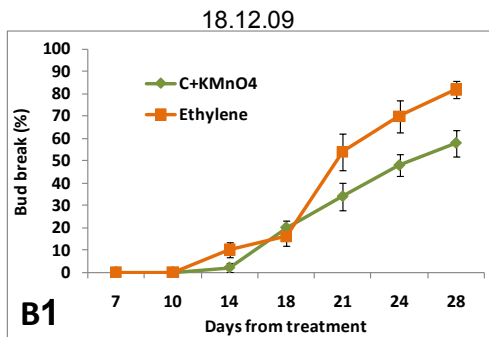
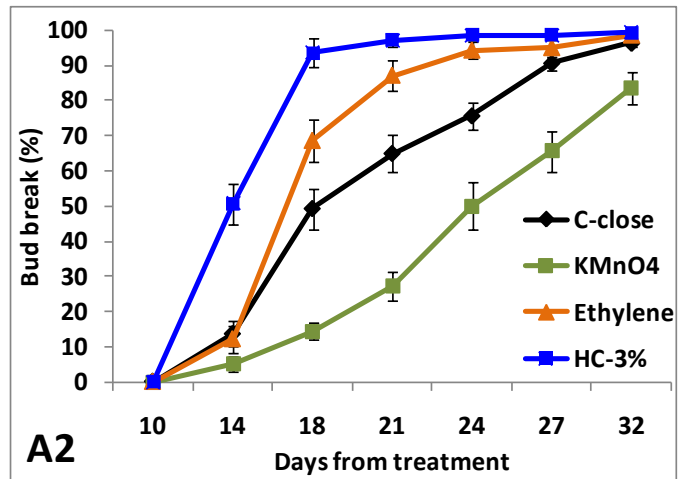
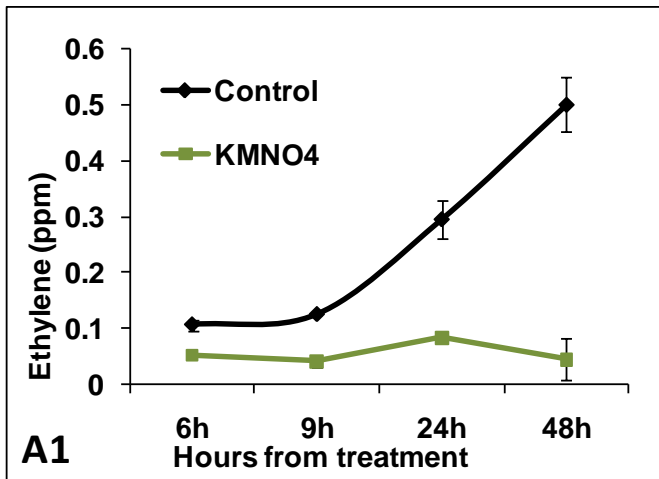
Hours from treatment

תמונה 5

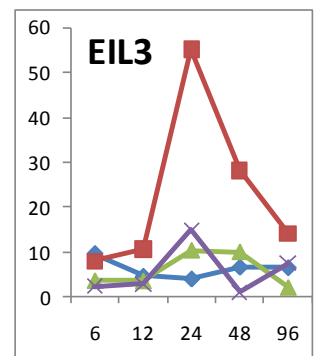
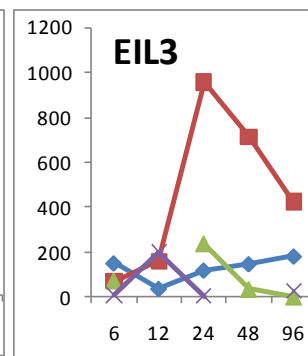
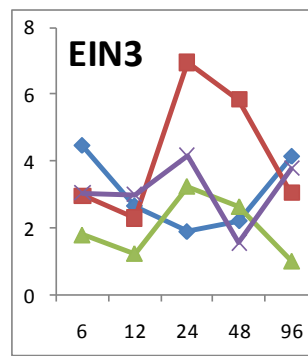
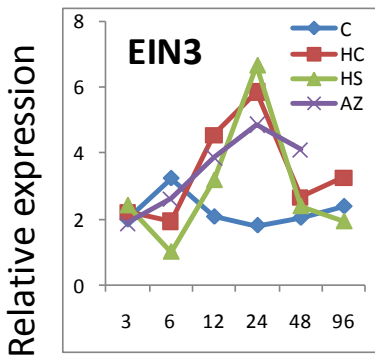


Hours from treatment

תמונה 6

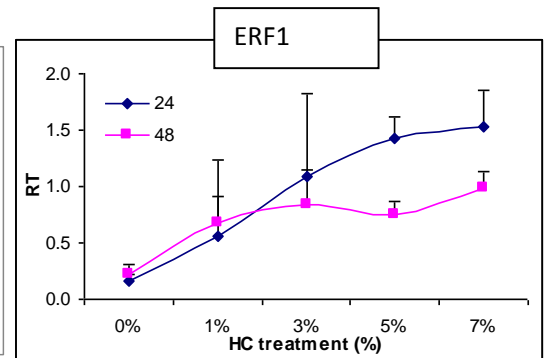
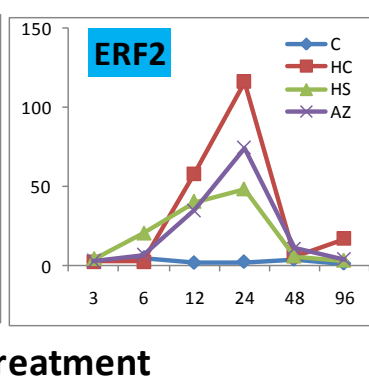
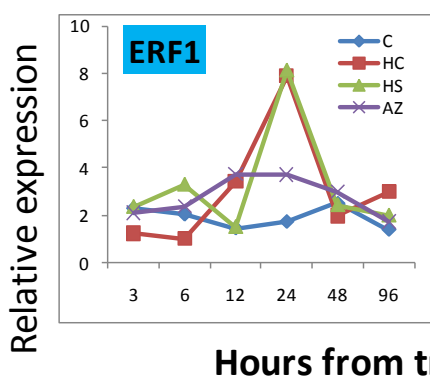


### תמונה 7

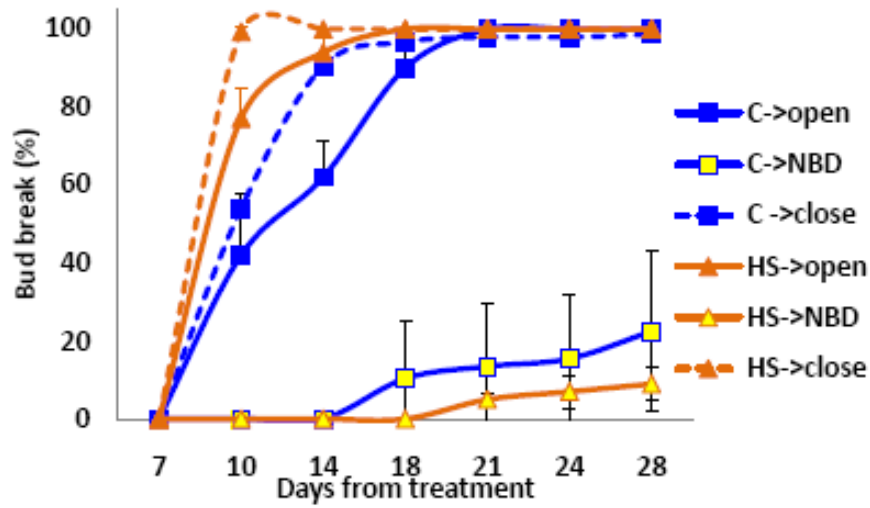


### תמונה 8

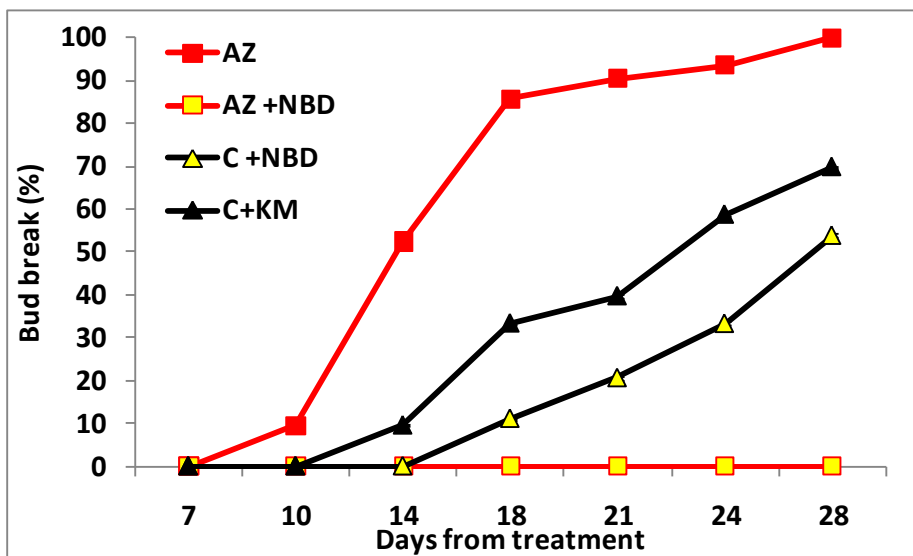
### תמונה 8



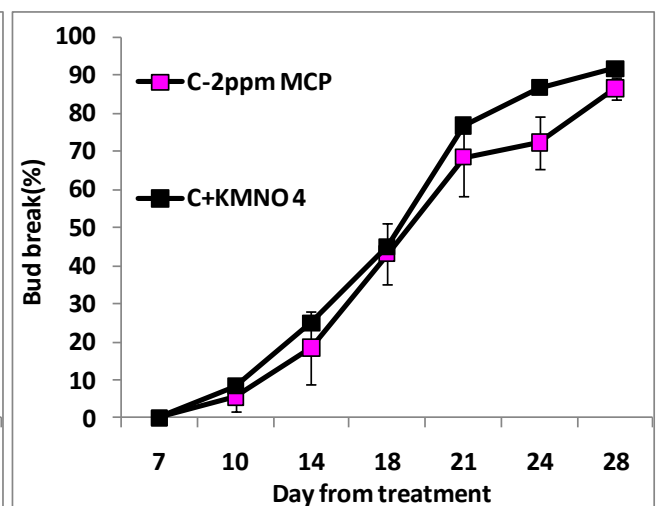
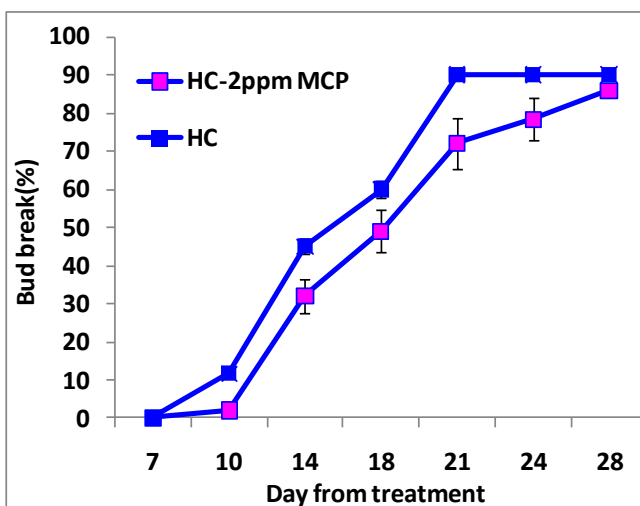
### תמונה 9



תמונה 10



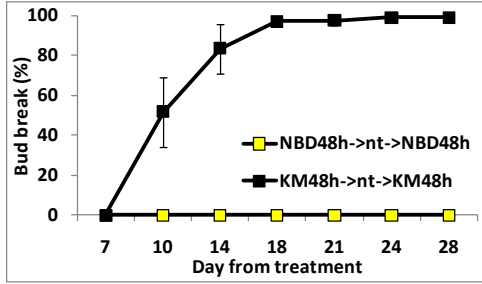
תמונה 11



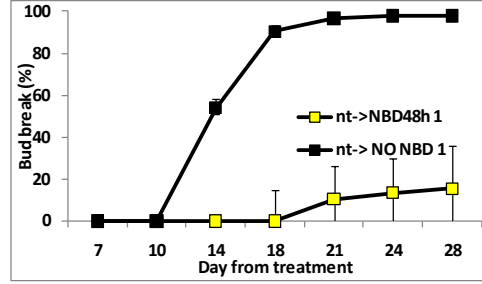
תמונה 13

# תמונה 12

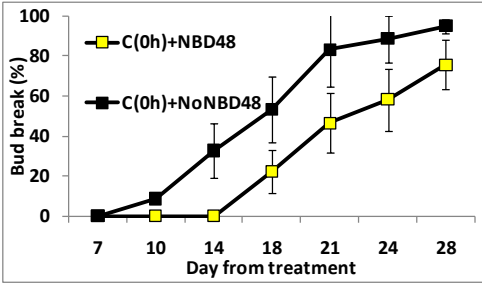
A



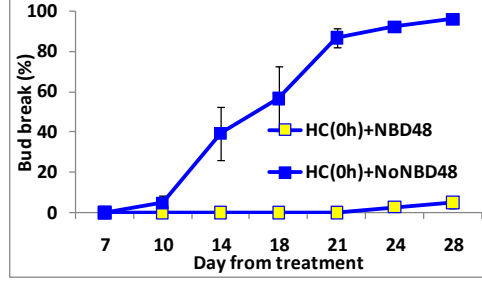
B



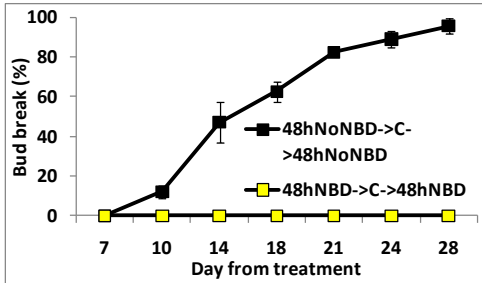
C



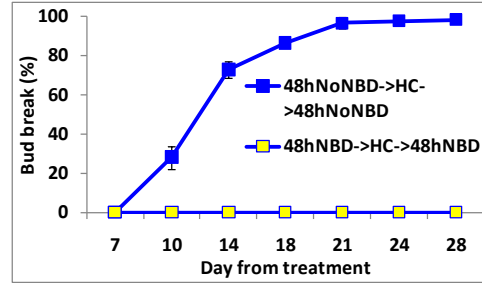
D



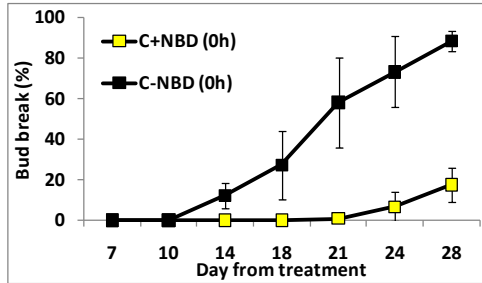
E



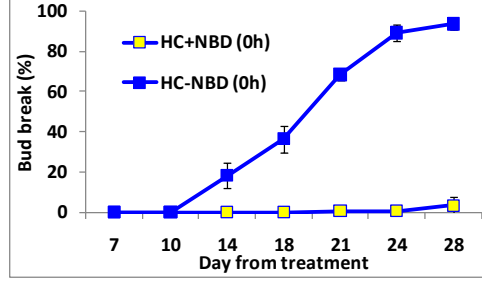
F



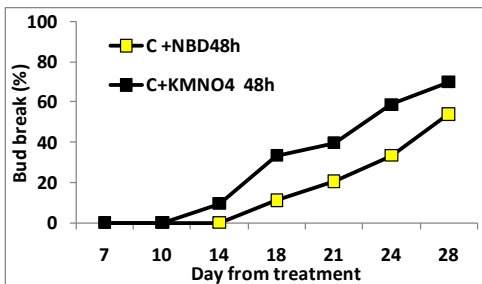
G



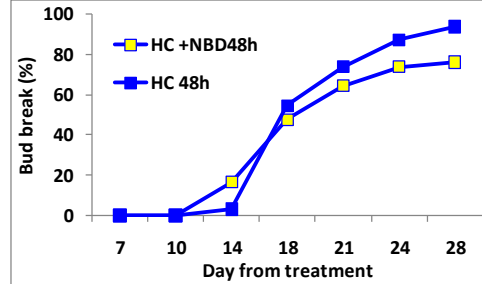
H



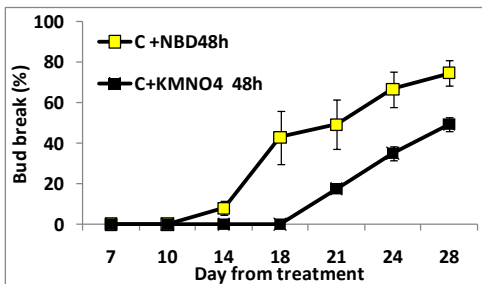
I



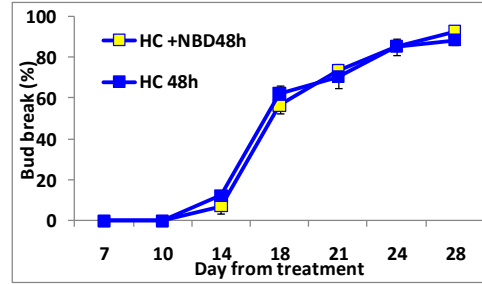
J

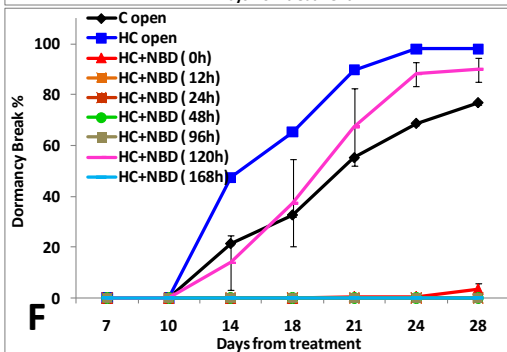
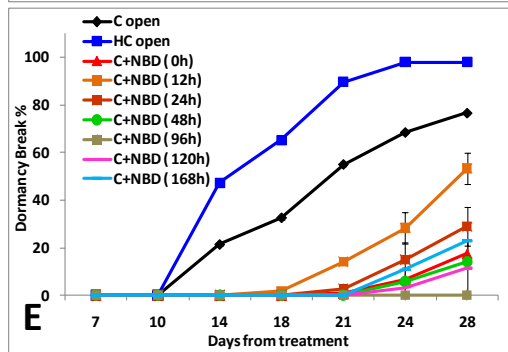
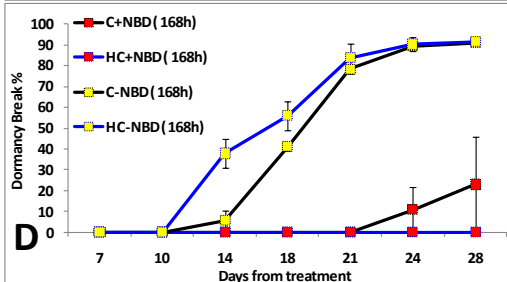
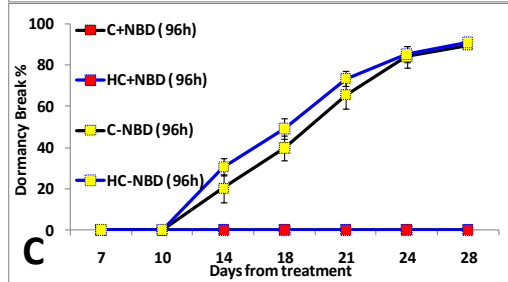
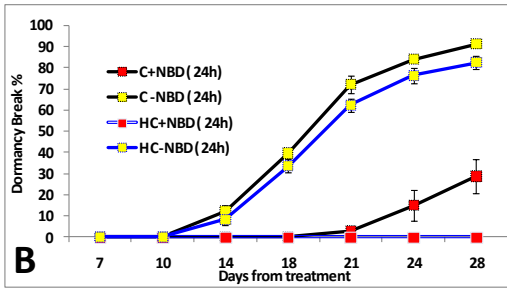
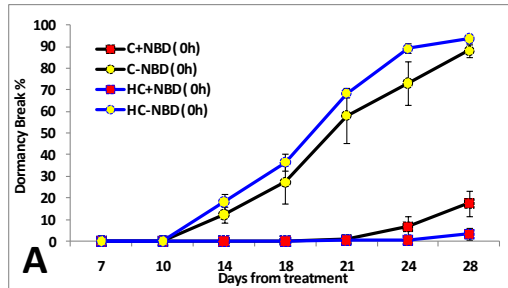


K

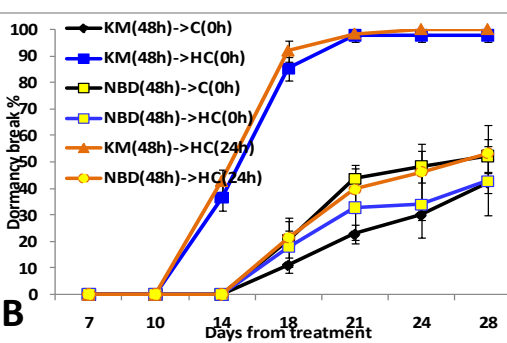
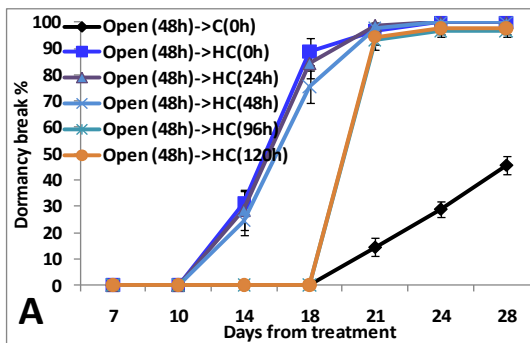


L





תמונה  
14



תמונה  
15

