

דו"ח מסכם לתכנית מחקר מספר 203-1062-17

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

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

מוגש לקרן המדע הראשי במשרד החקלאות
ע"י

ורד יריחמוביץ: המחלקה למטעים מינהל המחקר החקלאי בית דגן

טלי צבירן: המחלקה למטעים מינהל המחקר החקלאי בית דגן

Vered Irihimovitch. : Horticulture Department. The Institute of Plant Sciences –ARO
Bet Dagan 50250 E-mail: veredi@agri.gov.il

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

ינואר 2018

אדר תשע"ח

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.
הניסויים מהווים המלצות לחקלאים כן/לא

:



חתימת החוקר

תקציר

באבוקדו 'האס' עומס פרי בשנת שפע מדכא מעבר לפריחה ומשפיע על רמת הסירוגיות. בתוכנית מחקר קודמת, שיבטנו גן מאבוקדו המקודד לחלבון "מתזמן הפריחה" (*PaFT1*) והראנו כי ביטוי מוגבר שלו בעלים מבקר את המעבר לפריחה בשנת שפל, ומאידך עומס פרי מדכא את ביטוי. הרעיון ששינוי במאזן ההורמונים בעלה, המושפע מנוכחות פרי על העץ, מבקר ו/או משפיע על ביטוי *PaFT1*, ו/או על גני מבקרי פריחה נוספים, הועלה כתרחיש אפשרי שיש לבססו. בדיקות לבחינת פרופיל הורמונאלי הדגימו כי העדר עומס פרי גרם לעלייה מובהקת ברמת הצטברות ציטוקינים (CKs) בעלים במצב שפל בהשוואה למצב שפע. טיפול חיגור ענפים במצב שפע, הוביל לחזרה לפריחה, והעלה אף יותר את רמת הציטוקינים בעלים. בשני המקרים, העלייה ברמת הציטוקינים, נבעה מצבירה מוגברת של iPR. בחינת דגם ביטויים של גנים הקשורים לסינטזת ופירוק ציטוקינים בדוגמאות הללו העידה כי ככל הנראה עומס פרי בשנת שפע משפיע באופן שלילי על הצטברות CKs בעלים, הן על ידי מיתון סינטזת CKs והן ע"י אינדוקציית פירוק CKs. כדי לנסות ולאמת את תפקידם ההשראתי של ציטוקינים על ביטוי *PaFT1* ועל מידת החזרה לפריחה ביצענו ניסיונות בשטח. תוצאות ניסויי עונת 2015/2016 הורו כי טיפול ציטוקינים (ppm 80 BA) בעצי שפע בסוף נוב' אפשר חזרה מסוימת לפריחה, ללא תלות בעלייה בביטוי *PaFT1* בעלים. בניגוד לתוצאות שקיבלנו בעונת 2015/2016, ריסוסי ציטוקינים שבוצעו בעצים במצב שפע בעונת 2016/2017, לא תרמו באופן מובהק להעלאת הפריחה והיבול באביב ובעונה העוקבת. מהות השוני בין תוצאות הטיפולים אינה ברורה לנו, יחד עם זאת, תוצאות הניסויים הצביעו על הפוטנציאל הקיים בטיפולים אלו, להעלאת הפריחה החוזרת על רקע שנת שפע. אנו סבורים כי יש מקום למציאת דרכים לשיפור הטיפולים בין היתר ע"י שימוש בציטוקינים סיננטי יציב יותר כדוגמת CPPU ו/או TDZ. בחלקה האחרון של דו"ח זה אנו מדווחים על שיבוט גן נוסף מאבוקדו המקודד לחלבון FT-like (*PaFT2*). תוצאות בחינת ביטוי הגן במצבי שפע ושפל ובחינת ביטוי האקטופי בארבידופסיס מרמזות כי תפקידו של *PaFT2* שונה ככל הנראה (או לפחות אינו זהה) לזה של *PaFT1*. דיון בתוצאות מוצג בגוף הדו"ח.

4-5.....	1. מבוא ותיאור הבעיה.....
4.....	1.1 בעיית הסירוגיות בזן האבוקדו 'האס'.....
4.....	1.2 בקרת המעבר מרקמה וגטטיבית לרפרודוקטיבית.....
5.....	1.3 סיכום תוצאות עבודה קודמת.....
5.....	2. מטרות המחקר.....
6-16.....	3. פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר.....
6-7.....	3.1 בדיקות פרופיל הורמונאלי בעלים.....
7.....	3.2 שיבוט ואפיון רצפי גנים מאבוקדו המקודדים לחלבונים הפועלים בסינטזה ופירוק של ציטוקינים.....
8.....	3.3 בחינת רמת ביטויים של גנים הקשורים בסינטזת ופירוק ציטוקינים.....
	3.4 בחינת השפעת טיפולי ציטוקינין בשנת שפע על המעבר לפריחה, על ביטוי גנים המבקרים פריחה, ועל רמת היבול בשנת הטיפול ובעונה העוקבת.....
8-10.....	3.5 בחינות חוזרות של השפעת טיפולי ציטוקינין בשנת שפע על המעבר לפריחה ועל היבול העוקב.....
10-12.....	3.6 שיבוט גן נוסף מאבוקדו המקודד לחלבון FT-like ואפיון דגם ביטוי בהעדר ובנוכחות פרי.....
12-14.....	3.7 ביטוי ביתר של הגן <i>PaFT2</i> בארבידופסיס.....
15.....	4. סיכום ודיון.....
15-16.....	5. הבעת תודה.....
18.....	6. ביבליוגרפיה.....
18-19.....	7. נספחים.....
20-21.....	

1. מבוא ותיאור הבעיה:

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

1.2 בקרת המעבר מרקמה וגטטיבית לפרודוקטיבית מהספרות, ידוע כי האינדוקציה לפריחה במסלולים השונים מבוקרת ע"י קבוצה קטנה של גנים הקרויים "מתזמני פריחה". אחד מהגנים האלו הינו *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) (11, 12). גן זה, המכונה גם "פלוריגן", מבוטא סמוך לרקמות הווסקולריות של העלה. בכדי להשרות פריחה, מועבר חלבון ה-*FT* דרך מערכת השיפה אל עבר המרסטימה הקודקודית, שם הוא מעודד את ביטויים של גנים הפועלים ב"מורד הזרם", אשר אחראים על התפתחות הפרח. כך למשל, במריסטמה הקודקודית מבקר חלבון ה-*FT* יחד עם בקרי השעתוק *FD*-3-3-14 את שעתוקם של גנים המעורבים בהפיכת המריסטמה הוגטטיבית למריסטמה רפרודוקטיבית ביניהם *APETALA1 (AP1)* ו-*LEAFY (LFY)*. הגורמים המבקרים את ביטוי *FT* הינם מגוונים ועשויים להיות קשורים בין היתר בשינויי טמפרטורה, אורך יום ואף בשינויים במאזן הסוכרים וההורמונים בעלה (14, 15). לדוגמא, בשנים האחרונות הוכחה היפוטזה הטוענת כי סוכרוז משחק תפקיד בבקרת שעתוק הגן *AtFT* (13). בהתאם, מעורבות של סוכרוז בהשראת ביטוי *AtFT* הודגמה באופן אלגנטי, כתלות ביצירתו של המטבוליט של סוכרוז *Trehalose-6-phosphate (T6P)* (16). מעורבות אפשרית של *CK* בבקרת ביטוי גני *FT-like* הודגמה אף היא בארבידופסיס. בפרט, דווח כי ביטוי ביתר של *CKX* (*CYTOKININ OXIDASE DEHYDROGENASE*), הגורם לפירוק בלתי הפיך של הציטוקינינים החופשיים הפעילים- איזופנטיל אדינין (*iP*) וטרנס זאטין (*tZ*), גרם לעיכוב בפריחה (17). כמו כן דווח כי ביטוי *AtTSF* (*TWIN SISTER OF FT*), שהינו פארלוג של *AtFT*, הוגבר לאחר מתן ציטוקינין סינטטי *BA* (6-benzyladenine) (18).

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

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

1.3 סיכום תוצאות עבודה קודמת: בעבודה קודמת הדגמנו כי בזן 'האס' נוכחות פרי על העץ מעבר לחודש אוקטובר, דיכאה באופן משמעותי את המעבר לפריחה. בהמשך, שיבטנו גן מאבוקדו המקודד לחלבון FT (*PaFT1*) והתמקדנו באפיון דגם ביטוי ההתפתחותי ברקמות צמחיות מעצים במצב שפע ושפל. תוצאות עבודתנו תמכו ברעיון ש-*PaFT1* עשוי לתפקד כ"פלורוגן" באבוקדו וכי ביטוי מוגבר וזמני שלו ברקמת העלה בחודשים אוק'-נוב', עשוי לבקר את המעבר לפריחה בפקעים (28). מנגד, דיכוי ביטוי הגן בעלים מעצים במצב שפע, עשוי לשחק תפקיד במניעת המעבר לפריחה ובהתאם להשפיע על תופעת הסירוגיות. כתמיכה ברעיון ש-*PaFT1* פועל כפלורוגן, הדגמנו כי ביטוי ביתר של *PaFT1* בצמחי ארבידופסיס ובטבק השרו פריחה מוקדמת (28). בחלקה השני של העבודה, העלנו היפותזה הטוענת כי בעצים במצב שפל, בהעדר פעילות מבלעים חזקים (פירות), חלה הצטברות יתרה של סוכרים בעלים. הצטברות זו עשויה להשפיע באופן ישיר או עקיף על ביטוי ביתר של *PaFT1*. תוצאות כימות סוכרים אכן הראו כי רמת כלל הסוכרים המסיסים הייתה גבוהה באופן מובהק בעלים מעצי Off, בהשוואה לעלים מעצי On. בהמשך, בדקנו את השפעת העלייה ברמת הסוכרים על ביטוי *PaFT1*, הן לאחר ביצוע חיסור בענפים מעצים במצב שפע והן במערכת דסקיות עלי אבוקדו. תוצאות ניסויים אלו תמכו ברעיון שעליה ברמת סוכרז ו/או פרסאיטול בעלים (המושגית באופן עקיף בהעדר פרי), עשויה להשרות עליה בביטוי *PaFT1* ולהשפיע באופן חיובי על הפריחה. תוצאות אלו הדגימו יחד עם זאת, את מורכבות בקרת ביטוי *PaFT1*. ההיתכנות שגורמים נוספים, שעשויים אף הם להיות מושפעים מנוכחות פרי על העץ (כגון שינויים במאזן ההורמונים), משפיעים על ביטוי *PaFT1* ו/או על ביטויים של גנים נוספים המבקרים פריחה, נותרת כטרחיש אפשרי שיש לבססו.

2. מטרות המחקר על בסיס התוצאות שצברנו ניתן להניח כי באבוקדו האינדוקציה לפריחה חלה בחודשים אוק'-נוב', לאחר ירידה בטמפ' וכתלות בביטוי הפלורוגן *PaFT1* בעלים, ומשרה פריחה באביב הבא. מנגד, עומס פרי מדכא את העלייה בהצטברות תעתיק *PaFT1* ואת האינדוקציה לפריחה. עוד הראנו, כי חיסור ענפים נושאי פרי בספטמבר, השרה עליה מסוימת בביטוי *PaFT1* בעלים ופריחה בענפים המטופלים. תוצאות אלו מעניינות מכיוון שהן מורות כי למרות עומס הפרי הקיים בעץ, וויסות ביטוי הפלורוגן בעלים ע"י מניפולציה חיצונית, בנקודת זמן מסוימת, מאפשר מעבר לפריחה. חיסור ענפים בודדים אינו יכול להיות מוצע כפרקטיקה חקלאית למיתון תופעת הסירוגיות, אולם אם ניטיב להבין כיצד עומס פרי מדכא את ביטוי *PaFT1* ו/או גנים נוספים המשויכים למשפחה זו נוכל בהתאם להציע אמצעים יעילים יותר למיתון התופעה. מחקר המשך זה להתמקד א. בלימוד השפעת הורמונים צמחים על בקרת שעתוק הגן *PaFT1* ועל מעבר לפריחה בנוכחות ובהעדר עומס פרי. ב. בשיבוט גנים מבקרי פריחה נוספים מאבוקדו ובלימוד דגם ביטוי ההתפתחותי בהעדר ובנוכחות עומס פרי. בפרט, צפינו כי לתוצאות שיתקבלו מחלק א' של המחקר תהיינה השלכות יישומיות ובהתבסס עליהן ניתן יהיה להציע טיפול מסוים (או שילוב טיפולים) למיתון הסירוגיות. במקביל, הערכנו כי הידע שיתקבל מעבודה זו יתרום להבנה מעמיקה יותר של מנגנונים מולקולריים המבקרים פריחה.

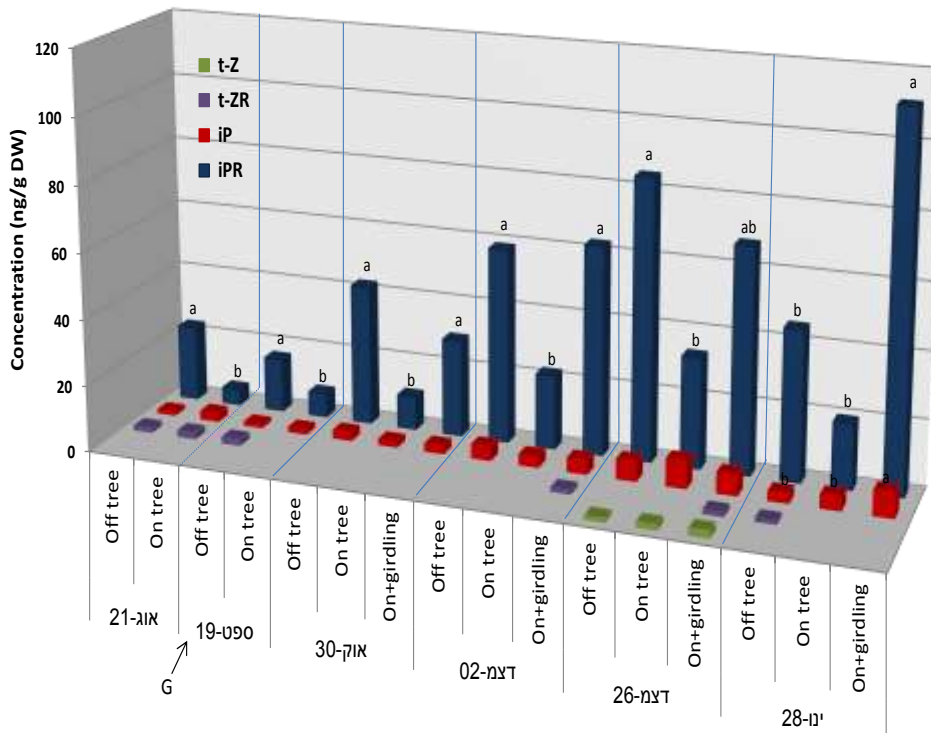
הערה – בתוכנית המחקר המקורית הצענו לבחון מעורבות אפשרית של מולק' רנ"א קטנות (miRNAs) בבקרת שעתוק הגן *PaFT1*. מכיוון שבהערכת השיפוט נטען שחלק זה תופס חלק נרחב מתוכנית המחקר ולא ברור לאן הוא מכון, עסקנו בנושא באופן מוגבל בלבד בחודשים האחרונים של המחקר (תוצאות לא מוצגות).

3. פירוט עיקרי הניסויים, תוצאות ודיון.

3.1 בדיקות פרופיל הורמונאלי בעלים תוצאות קודמות לבחינת ביטוי *PaFT1* הדגימו כי במצב שפל, רמת ביטוי הגן עלתה באופן חד החל מאוק', הגיעה לשיא בתחילת דצמ' וחזרה לרמתו ההתחלתית מסוף דצב' ואילך. מאידך, רמת *PaFT1* נותרת נמוכה וכמעט ללא שינוי בעלים ממצב שפע, בהם החזרה לפריחה הייתה כמעט אפסית. לבסוף, טיפולי חיגור בענפי עצי שפע, שהוביל לחזרה לפריחה, גררו עלייה זמנית ברמת ביטוי *PaFT1*, והודגם כי למרות נוכחות פרי על העץ, רמת הגן עלתה במהלך חודש דצב' ולאחר מכן ירד ביטוי לרמתו ההתחלתית (ראה איור 8A – בהמשך).

בשלב ראשון, כדי לבדוק האם קיים מתאם כלשהו בין דגם הביטוי של *PaFT1* ובין שינוי ברמת הורמונים מסוימים ו/או מטבוליט שלהם בשנת שפל לעומת שנת שפע ביצענו במהלך מחקר זה איפיון הורמונאלי של רקמות עלים שנאספו מעלים במצב שפע, שפל, ומענפי עצי שפע בהם בוצעו חיגורים (ראה נספח א'). לצורך האיפיון ההורמונאלי נשלחו דגימות מנקודות זמן שונות למעבדת שירות בקנדה לקבלת פרופיל הורמונאלי מקיף לאחר הרצה במכשיר UPLC-ES-MS/MS. תוצאות כימות ההורמונים שהתקבלו הדגימו כי קיימת שונות מובהקת ברמת הצטברות ציטוקונינים (CKs) בין עלים שנדגמו מעצים במצבי שפל ושפע+חיגור, בהשוואה לעלים מעצים במצב שפע. לעומת זאת, כמעט ולא הודגמה הצטברות GAs שונים בדוגמאות שנשלחו (לא מוצג). איור 1, מורה כי בשלושת סוגי העלים הודגמה נוכחות ה-CKs החופשים הפעילים iP-tZ ו-iP ושל הפרקורסורים הריבוזידים שלהם dhZR (Dihydrozeatin riboside) ו-iPR (Isopentenyladenosine), כאשר האחרון שבהם הצטבר ברמה גבוהה באופן משמעותי בכל נק' הזמן. בפרט, החל מאמצע אוגוסט ועד לסוף דצמבר חלה הצטברות יתרה של iPR בעלים מעצים במצב שפל, ולאחר מכן חלה ירידה מסוימת ברמתו. מגמה דומה נצפתה בעלים מעצי שפע, למרות זאת בכל נק' הזמן רמת iPR הייתה גבוהה יותר בעלים מעצי שפל בהשוואה לעלים מעצי שפע. בעלים מענפי עצי שפע שחוגרו, נצפתה מגמת עלייה כללית ברמת הצטברות iPR ונראה כי החל מסוף אוק', כחודשים לאחר ביצוע החיגורים, עלתה בהם רמת הצטברות iPR ורמתם נותרה גבוהה גם בסוף ינואר.

איור 1. שינויים בצבירת
ציטוקינים בעלים שנדגמו
מעצים בשלושה מצבים: שפל
(Off), שפע (On)
ושפע+חיגור
(On+Girdling). כל נקודה
מייצגת ממוצע + שגיאת תקן
של 3 חזרות ביולוגיות.
אותיות שונות מייצגות את
המובהקות בשונות ברמת
הצטברות iPR בין המצבים
השונים בכול נקודת זמן. האות
G מורה על מועד ביצוע
החיגור. (ראה נספח א'ו)



3.2 שיבוט ואפיון רצפי גנים מאבוקדו המקודדים לחלבונים הפועלים בסינטזה ופירוק של ציטוקינים

ראוי לציין כי בעבר היה מקובל לטעון כי ציטוקינים נוצרים בשורש ומועברים אל עבר הנוף. מאידך, בהתבסס על עבודות המראות כי גני IPT מתבטאים גם ברקמות עלים, גבעולים ופרחים, מקובלת כיום הסברה הטוענת כי בעוד tZR מיוצר בעיקר בשורש ומועבר בעצה, במוהל השיפה מצוי בעיקר iPR, המיוצר בצנר ועשוי לנוע אל עבר השורשים (29). במקרה שלנו, תוצאות בדיקת הפרופיל ההורמונאלי בעלים עשויות להעיד כי עומס פרי משפיע באופן שלילי על סינטזת CKs בעלים, ו/או כי עומס פרי משפיע באופן חיובי על פירוק ציטוקינים ברקמה זו. בכדי לבדוק נושא זה, זוהו ונבחרו מתוך מאגר טרנסקריפטום 'האס' שבידינו, שני רצפים מאבוקדו המקודדים לכאורה לחלבונים הפועלים בתהליך סינתזת ציטוקינים (*PaIPT3* ו-*PaLOG8*), ורצף המקודד לחלבון CKX, הפועל בפירוק ציטוקינים (*PaCKX5*) (ראה גם נספח א'ו). שיבוט רצפי cDNA המקודדים לחלבונים אלו בוצע בשיטת RT-PCR ע"י שימוש ב-RNA שהופק מרקמת עלים של עצים במצב שפע ושפל (לא מוצג)

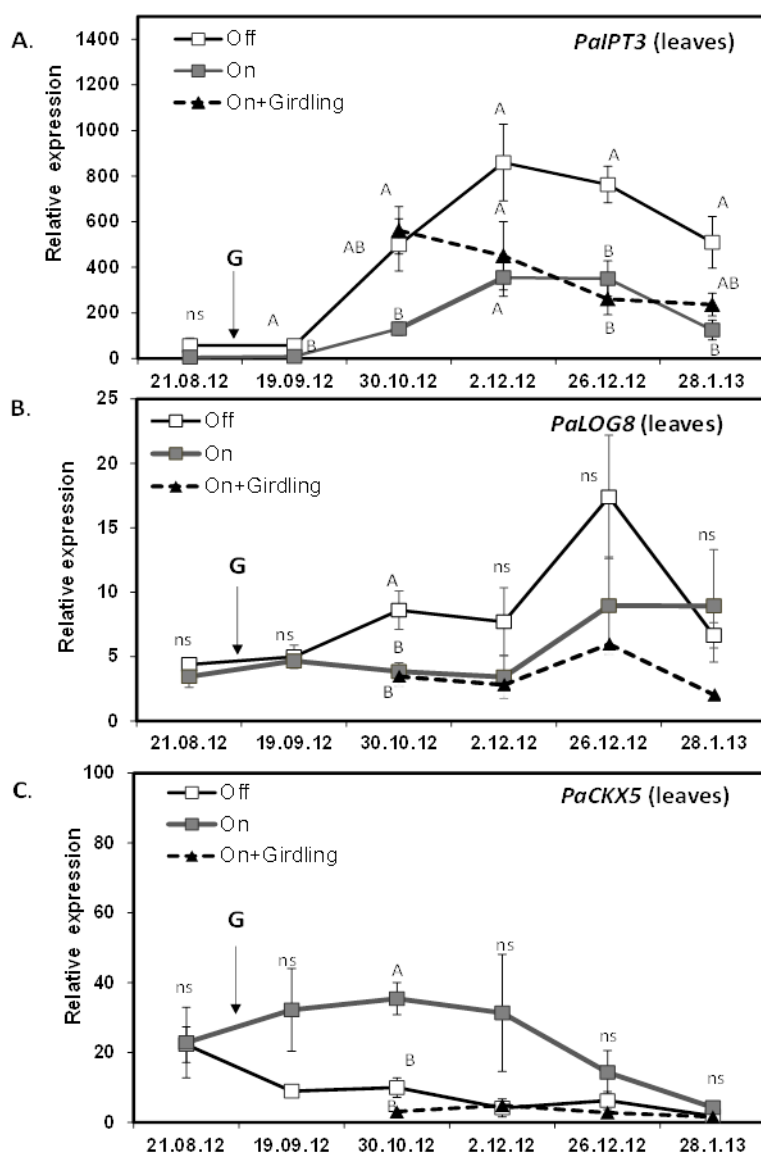
3.3 בחינת רמת ביטויים של גנים הקשורים בסינטזת ופירוק ציטוקינים

הפועלים בסינטזה ופירוק של ציטוקינים (לא מוצג), בחרנו לבדוק את דגם ביטויים באותן דוגמאות עלים ששימשו לאנליזה ההורמונאלית.

תוצאות בדיקה זו הראו כי החל מאמצע ספטמבר עלתה רמת ביטוי *PalPT3* בעלים מעצים ממצב שפע ושפל, הגיעה לשיא במהלך דצמבר, וירדה לאחר מכן. למרות הדמיון בדגם הביטוי, בפרט, מסוף אוקטובר ועד סוף ינואר, הייתה רמת ביטוי הגן גבוהה יותר באופן מובהק במצב שפל בהשוואה למצב שפע. התוצאות שהתקבלו הורו בנוסף כי חיסור ענפים בעצי שפע, גרם בסוף אוקטובר לעלייה בביטוי *PalPT3*, בהשוואה למצב שפע, אולם מנק' זמן זו ירדה רמת ביטוי הגן (ראה איור מס' 2A). דגם הביטוי של *PaLOG8*, המעורב גם כן במסלולי הסינטזה של ציטוקינין, תאם במידה מסוימת לדגם ביטוי של *PalPT3*. במקרה זה, רמת ביטוי הגן עלתה כבר מאמצע ספטמבר בעלים מעצי השפל, בעוד שבעלים מעצי השפע היא נותרת נמוכה והחלה לעלות רק בתחילת דצמבר. שיא הביטוי של הגן נצפה בסוף חודש דצמבר בעלים מעצי השפל והשפע, אולם בנקודת זמן זו לא הודגמה שונות בין רמת הביטוי בשני המצבים. התוצאות שהתקבלו הורו במקביל כי לחיסור ענפים בעצי השפע לא הייתה השפעה מכרעת על ביטוי של *PaLOG8*, שכן רמתו ביטוי לאחר חיסור ענפים לא הייתה שונה מרמות ביטוי התעתיק בעלים מעצי השפע (איור מס' 2B)

לבסוף, תוצאות בדיקת ביטוי *PaCKX5*, המקודד לאנזים המפרק ציטוקינין, הראו מגמת ביטוי הפוכה. במקרה זה

רמת ביטוי הגן במצב שפע הייתה גבוהה יחסית החל מסוף אוגוסט וירדה ברמתה לקראת סוף פרק הזמן הנבחן. לעומת זאת, בעלים מעצי שפל, וגם בעלים מטיפול החיסור, נותרה רמת ביטוי הגן נמוכה מאוד לאורך כל פרק הזמן הנבחן, ובפרט בסוף אוק' הודגמה שונות מובהקת בין שני מצבים אלו בהשוואה למצב שפע (ראה איור 2C).



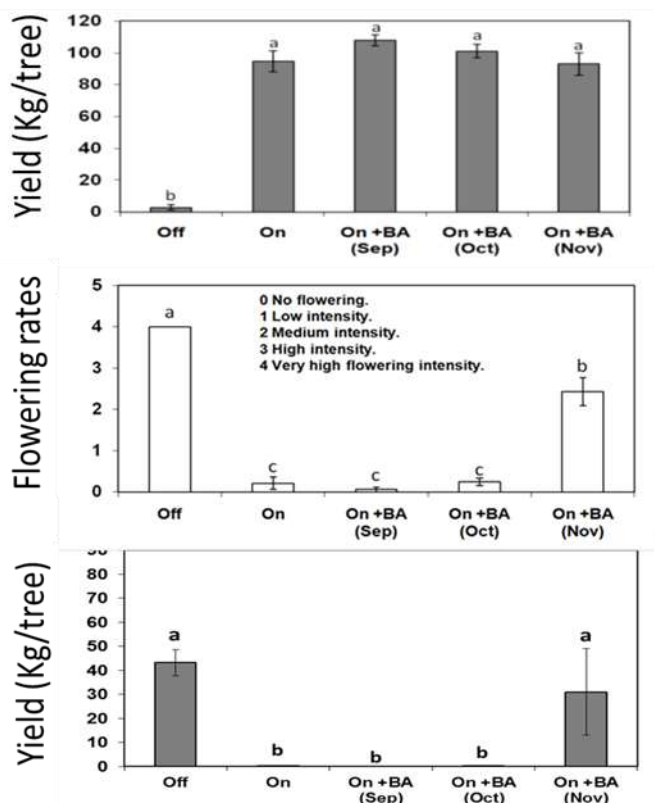
איור מס' 2: בחינת דגם הביטוי העונתי של *PalPT3* (A), *PaLOG8* (B) ו- *PaCKX5* (C) בעלים שנדגמו מעצים בשלושה מצבים: שפל (Off), שפע (On) ושפע+חיסור (On+Girdling). כל נקודה מייצגת ממוצע $\pm$ שגיאת תקן של 3 חזרות ביולוגיות. אותיות שונות מייצגות את המובהקות בשונות בין המצבים, בכל נקודת זמן. האות G מורה על מועד ביצוע החיסור. (ראה נספח א')

3.4 בחינת השפעת טיפולי ציטוקינין בשנת שפע על המעבר לפריחה, על ביטוי גנים המבקרים פריחה, ועל רמת

היבול בשנת הטיפול ובעונה העוקבת

בהתחשב בקשר החיובי שהודגם בצמחי מודל בין עליה ברמת CKs וביטוי גני *FT-like* (17-18), והתוצאות המוצגות לעיל, המודל הפשוט ביותר שניתן היה להעלות על הדעת היה שייתכן שצבירה מוגברת של IPR, שהודגמה בעלים מעצי שפל החל מסוף חודש אוק', משפיעה על עליה בביטוי *PaFT1*. יש לציין עם זאת, שרמת IPR נותרת גבוהה גם בסוף דצמ', לאחר הירידה שנצפתה בביטוי *PaFT1*. בכדי לנסות ולאמת את תפקידם ההשראתי של ציטוקינינים על ביטוי *PaFT1* ועל מידת החזרה לפריחה ביצענו ניסיונות בשטח. ניסוי תצפית ראשוני בוצע בעונת 2014/2015 בחלקת 'האס' בקיבוץ אייל. בניסוי זה נבחרו עצים במצב שפע שחולקו לשלוש קבוצות טיפול. כל קבוצת עצים טופלה ע"י ריסוס בציטוקינין סינטטי (BA 80 ח"מ כתכשיר גוליתית בתוספת 0.1% "שטח-90" (חברת תרסיס), בשלושה מועדים שונים לפני מועד האינדוקציה לפריחה המשוער (ספט' אוק' ונוב' 2014)). עצים במצב שפע ושפל, לא מטופלים, שימשו לצרכי ביקורת פנימית. לאחר הטיפולים, בעונת הקטיף המסחרית (תחילת פברואר 2015), נבדקה רמת היבול הכללי בעצים מטופלים ולא מטופלים. בדיקה זו הראתה כי כפי שניתן היה לצפות, בעצים במצב שפל - בהם רמת הפריחה הייתה כמעט אפסית באביב הקודם (אפריל 2014), רמת היבול הכללי שהתקבלה הייתה גם כמעט אפסית. בניגוד לכך בעצים במצב שפע, רמת היבול הכללי שהתקבלה הייתה גבוהה מאוד ונאמדה בכ-90 ק"ג לעץ בממוצע גם בעצי השפע שטופלו בציטוקינין בשלושת המועדים השונים, רמת היבול הכללי הייתה גבוהה ולא נבדלה באופן מובהק מרמת היבול של עצי הביקורת במצב שפע. (ראה איור 3-פנל עליון). בכדי לקבוע את השפעות הטיפולים, נערכו תצפיות באביב העוקב בהן נאמדה רמת הפריחה החוזרת ונבדק בהמשך היבול החוזר (ינואר 2016). תוצאות סקר הפריחה הראו כי עוצמת הפריחה הגבוהה ביותר התקבלה כצפוי בעצי הביקורת במצב שפל. לעומת זאת, בעצי ביקורת במצב שפע ובעצי שפע שרוססו בציטוקינין במהלך ספטמבר ואוקטובר רמת הפריחה החוזרת שהתקבלה הייתה נמוכה מאוד. עצי שפע שרוססו בציטוקינין במהלך חודש נובמבר הראו חזרה משמעותית לפריחה ויבול חוזר גבוה (ראה איור 3 ונספח ב'). יצוין עם זאת כי רמת היבול החוזר של העצים שעמדו במצב שפע בשנה ב' (שפל-Off, בעונה הקודמת), הניבו ממוצע של 40 ק"ג לעץ. ממוצע זה הוא יחסית נמוך לעצים במצב שפע.

אחד הגורמים לתופעה זו, נעוץ ככל הנראה בתנאים האקלים. בפרט, רוחות חזקות שעליהן דווח במהלך העונה גרמו ל"נשר" מסיבי בחלקת הניסוי.



איור 3 - השפעת טיפולי ציטוקינין באבוקדו 'האס' על חזרה לפריחה ועל יבול חוזר. טיפולי ציטוקינין בעצי שפע בוצעו בשלושה מועדים: במהלך ספטמבר, אוקטובר, נובמבר 2014. עצי שפע ושפל, לא מטופלים, שימשו כעצי ביקורת. גרף עליון - היבול הכללי נקטף במועד הקטיף המסחרי-בתחילת פברואר 2015. כל עמודה מייצגת ממוצע $\pm$ שגיאת תקן של ארבעה עצים לטיפול. התוצאות מורות כי לטיפול הציטוקינין לא הייתה השפעה כלשהי (חיובית/או שלילית) על רמת היבול הכללי ומדגימות כי עצי השפע שנבחרו לצורך הניסוי היו בעלי שונות מינימלית בינם לבין עצמם. גרף אמצעי - דרגות הפריחה נקבעו לאחר תצפיות שבוצעו בשיא פריחה בחודש אפריל 2015. התוצאות מדגימות כי לטיפול נוב' בעצי שפע הייתה השפעה חיובית על חזרה לפריחה. גרף תחתון - היבול הכללי החוזר במועד הקטיף המסחרי-בתחילת ינואר 2016.

הניסוי התבצע במסגרת עבודת המסומך של התלמידה אושרת ז'ק. בדיקות היבול החוזר בינואר 2016, בוצעו במסגרת עבודת המוסמך של התלמיד גיל יוסף.

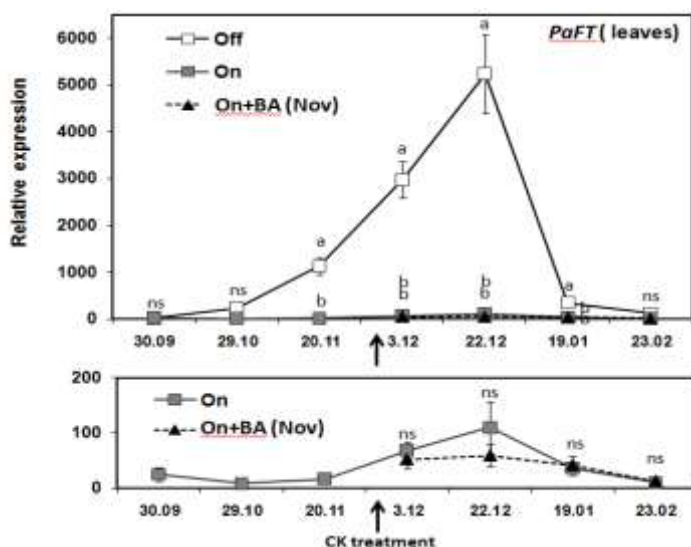
מכלול התוצאות שהתקבל בניסוי המתואר מעלה הראה כי בפרט, טיפול הציטוקינין שניתן לעצי שפע באמצע חודש נוב' (טיפול מאוחר), השפיע באופן חיובי וגרר חזרה מסוימת לפריחה. בשלב הבא הוחלט לבדוק מה הייתה השפעת הטיפול הן על דגם ביטוי *PaFT1* בעלים, והן על דגם ביטוי *PaLFY* ו-*PaAP1* בפקעים (כאמור, עלייה בביטוי גנים אלו

מורה כי חל מעבר לפריחה ברקמת זר). תוצאות אנליזה RT-PCR הראו כי בפקעים שנדגמו מעצי שפע נותר ביטוי *PaAP1* נמוך לאורך כל תקופת הדיגום. בניגוד לכך, בפקעים שנדגמו מעצים במצב שפל חלה עלייה משמעותית בביטוי *PaAP1* כבר בחודש נובמבר. רמת הצטברות התעתיק נותרה גבוהה עד אמצע ינואר ולאחר מכן לקראת סוף פברואר, חלה ירידה בביטוי הגן. במקביל, נצפה כי תעתיק *PaAP1* הצטבר ברמות גבוהות יחסית גם בפקעים מעצי שפע שטופלו בציטוקינין. תוצאות דומות הודגמו לגבי *PaLFY* (ראה איור 4).

איור מספר 4 - בחינת דגם הביטוי העונתי של הגנים *PaAP1* ו-*PaLFY*, ברקמת הפקעים מעצים בשנת שפע (On) ושפל (Off) ומעצי הטיפול המאוחר (On+BA-nov). האותיות מייצגות את המובהקות בשונות בין שלשות המצבים בכול נקודת זמן. כל נקודה מייצגת ממוצע +/- שגיאת תקן של 3-4 חזרות ביולוגיות. החץ מייצג את מועד בטיפול בנוב' 2014.

תוצאות אנליזה RT-PCR לבחינת דגם ביטוי *PaFT1* בעלים מוצגות באיור 5. תוצאות אלו הראו כי במקרה זה רמת ביטוי *PaFT1* בעלים שנדגמו מעצים במצב שפע הייתה נמוכה עד אפסית וללא עלייה משמעותית לכל אורך תקופת הדיגום. בניגוד לכך, ובהתאם לתוצאות קודמות, רמת ביטוי הגן בעלים שנדגמו מעצים במצב שפל החלה לעלות באופן חד החל מסוף נובמבר, הגיעה לשיא באמצע דצמבר וירדה באופן ניכר לאחר מכן. באופן מפתיע, בעלים מעצי הטיפול בציטוקינין נצפה דגם ביטוי כמעט זהה לזה שהודגם בעצי השפע, רמת ביטוי הגן נותרה נמוכה מאוד לאורך כל תקופת הדיגום. תוצאות מעניינות אלו מורות כי ככל הנראה מתאפשרת חזרה מסוימת לפריחה בעצי שפע לאחר מתן ציטוקינין, ללא תלות בעלייה בביטוי *PaFT1* בעלים.

איור 5- בחינת דגם הביטוי העונתי של הגן *PaFT1* ברקמת עלים מעצים בשנת שפע (On), שפל (Off) ובעלים מעצי טיפול בציטוקינין (On+BA-nov). כל נקודה מייצגת ממוצע +/- שגיאת תקן של 3-4 חזרות ביולוגיות. אותיות מייצגות את המובהקות בשונות בין שלשות המצבים בכול נקודת זמן. תאריכי דיגום הרקמות הצמחיות מופיעות על ציר ה-X. באיור התחתון מוצגת הגדלה של חלקו התחתון של הגרף העליון.



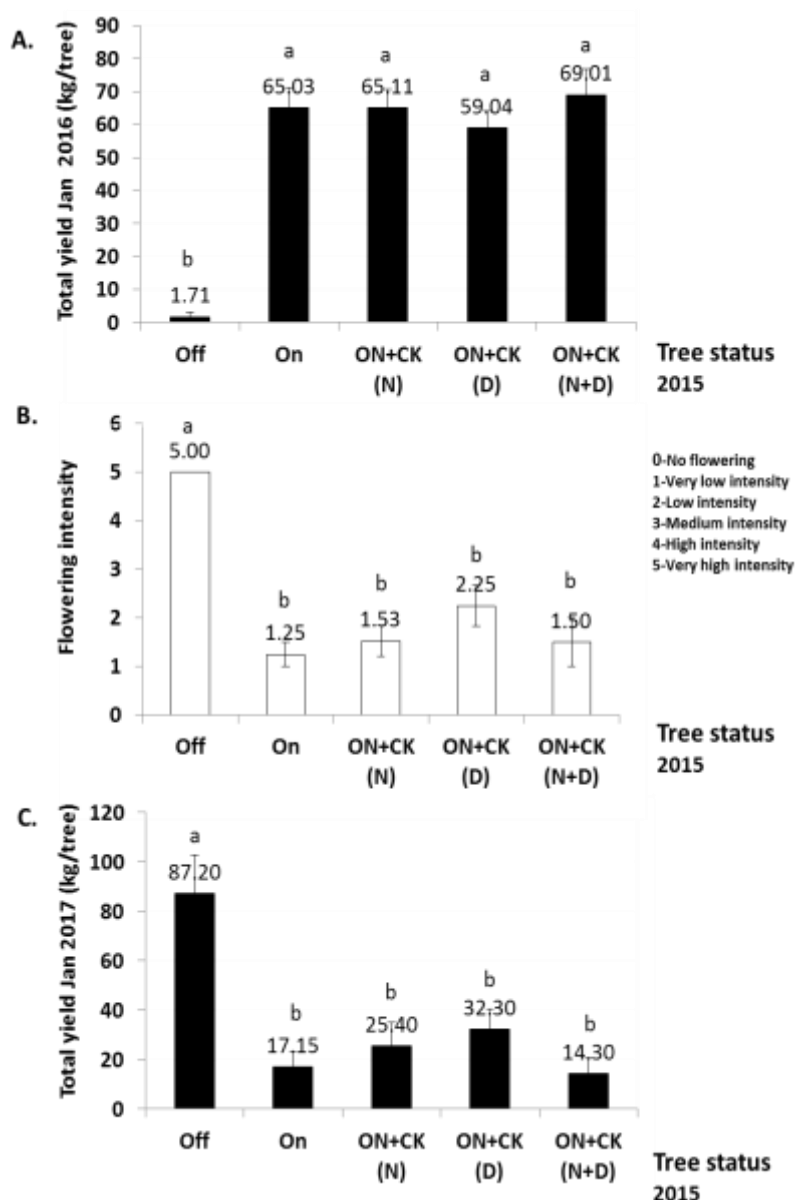
3.5 בחינות חוזרות של השפעת טיפולי ציטוקינין בשנת שפע על המעבר לפריחה ועל היבול בשנה החוזר.

כאמור, תוצאות ניסוי ראשוני הורו כי טיפול ציטוקינין (80 ח"מ) בעצי שפע בסוף נוב' אפשר חזרה מסוימת לפריחה, ללא תלות בעלייה בביטוי *PaFT1* בעלים וגרם לעלייה ביבול החוזר. תוצאות אלו היו תוצאות פרלימינריות. מכיוון שלתוצאות אלו השלכות יישומיות חזרנו שוב בעונת 2016/2017 על הניסוי בשני אתרים (במטעים 'האס' מסחריים באייל וביקום).

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

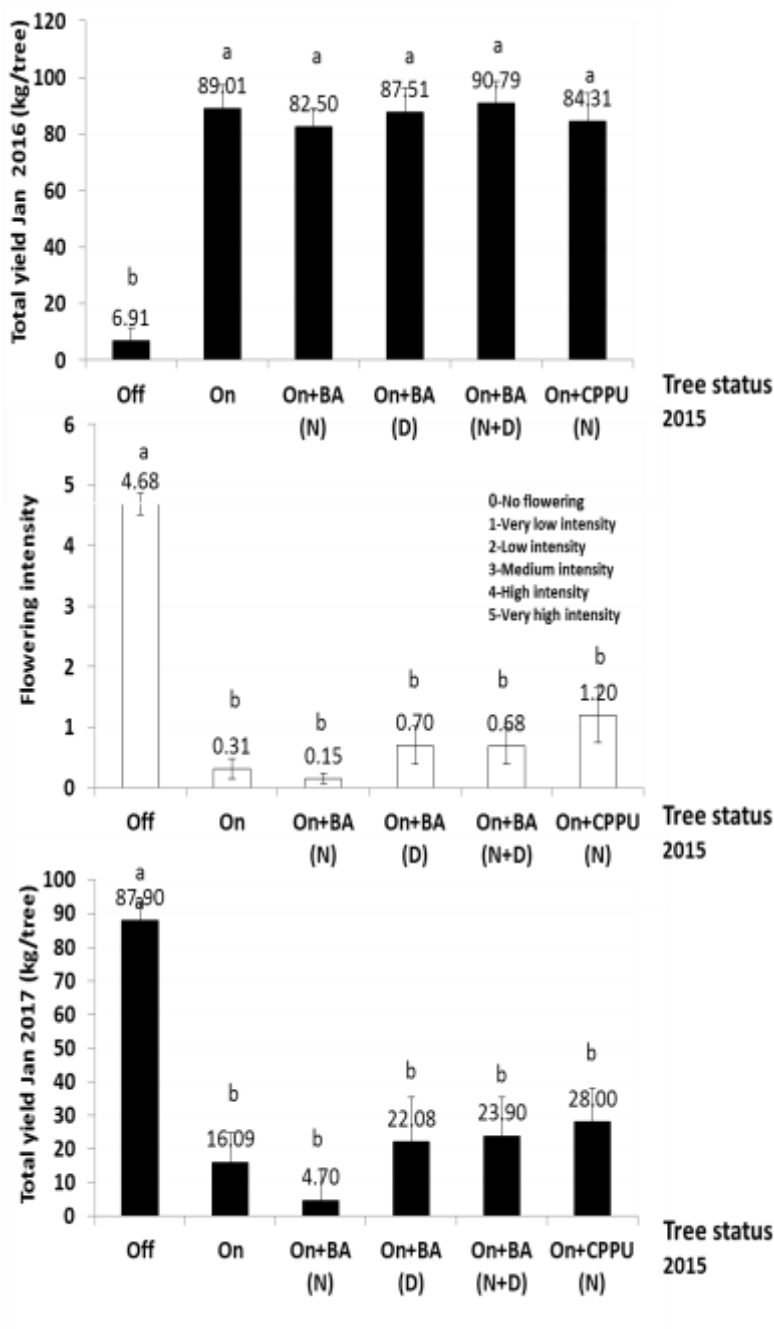
תוצאות הניסוי שבוצע במטע באייל מוצגות באיור 6. בדיקת היבול הכללי בעונת הקטיף המסחרי בינו' 2016, לאחר ביצוע הטיפולים בנוב ובדצמ', הראתה כי בעצים במצב שפל רמת היבול הכללי הייתה כמעט אפסית. בניגוד לכך, בעצים במצב שפע, רמת היבול הכללי שהתקבלה הייתה גבוהה מאוד. גם בעצי השפע שטופלו בציטוקינין רמת היבול הכללי הייתה גבוהה ולא נבדלה באופן מובהק מרמת היבול של עצי הביקורת, ולכן ניתן להסיק כי לטיפול הציטוקינין לא הייתה השפעה כלשהי (חיובית ו/או שלילית) על רמת היבול הכללי. תוצאות היבול הדגימו אם כן כי עצי השפע שנבחרו לצורך הניסוי היו אחידים. בהמשך, כדי לקבוע את השפעות הטיפולים שבוצעו בסתיו על הפריחה ביצענו תצפיות באביב העוקב. איור 6B מורה כי עוצמת הפריחה הגבוהה ביותר התקבלה בעצי הביקורת שהיו במצב שפל במהלך העונה (Off trees). לעומת זאת, בעצי ביקורת במצב שפע (On trees), רמת הפריחה שהתקבלה הייתה נמוכה מאוד, אך לא אפסית כפי שנצפה בעונה הקודמת. בחינת תוצאות טיפולי הציטוקינין הראתה כי בניגוד לתוצאות שהתקבלו בשנה הקודמת (נספח ב'), בשנה זו טיפולי הציטוקינין לא תרמו לעליה מובהקת ברמת הפריחה החוזרת. בדיקות היבול החוזר (בינואר 2017), הדגימו בהתאם כי טיפולי הציטוקינין לא תרמו לעלייה מובהקת ברמת היבול החוזר בהשוואה לביקורת. למרות זאת, מבין שלושת הטיפולים, הטיפול שניתן בדצמבר גרר עלייה יחסית ברמת הפריחה החוזרת. מדדי היבול הראו כי בטיפול זה בקטיף של 2017 התקבל יבול ממוצע גבוה יותר מיבול הביקורת של עצי השפע (32 ק"ג לעץ בהשוואה ל 17 ק"ג בעץ), אך תוצאה זו לא הייתה מובהקת.

איור 6. השפעת טיפולי ציטוקינין באבוקדו 'האס' על חזרה לפריחה ועל יבול חוזר –ניסוי אייל. פנל עליון - טיפולי ציטוקינין (CK) (80 BA ח"מ) בעצי שפע בוצעו בשני מועדים: בסוף נוב' (N), בסוף דצמ' (D) וריסוס כפול בסוף נוב' + סוף דצמ' (D+N). עצי שפע ושפל, לא מטופלים, שימשו כעצי ביקורת. היבול הכללי נקטף במועד הקטיף המסחרי בסוף ינואר 2016. **פנל אמצעי -** דרגות הפריחה נקבעו לאחר תצפיות שבוצעו בשיא פריחה בחודש אפריל 2016. **פנל תחתון -** היבול הכללי החוזר נקטף במועד הקטיף המסחרי, בתחילת ינואר 2017. כל עמודה מייצגת ממוצע + שגיאת תקן של שמונה עצים לטיפול.



תוצאות הניסוי שבוצע במטע ביקום מוצגות באיור 7. התוצאות שהתקבלו בניסוי זה דמו לתוצאות שהתקבלו באייל. גם במקרה זה, בניגוד לעונה הקודמת, טיפולי הציטוקינין שניתנו לעצים במצב שפע בחורף, לא תרמו לעליה מובהקת ברמת החזרה לפריחה. מדדי היבול החוזר שהתקבלו היו קורלטיבים למדדי הפריחה ובמועד הקטיף ב-2017 נמצא כי טיפולי הציטוקינין לא תרמו באופן מובהק להגדלת היבול בשנה העוקבת. יש לציין עם זאת, כי בניסוי זה הוסף טיפול נוסף (ריסוס ב-20 ח"מ CPPU). טיפול זה הוביל לעלייה הגבוהה ביותר (לא מובהקת) ברמת הפריחה יחסית לביקורת. מדדי היבול הראו כי בטיפול זה התקבל יבול ממוצע גבוה יותר מיבול עצי הביקורת (28 ק"ג לעץ בהשוואה ל 16 ק"ג בעץ), אולם גם תוצאה זו לא הייתה מובהקת.

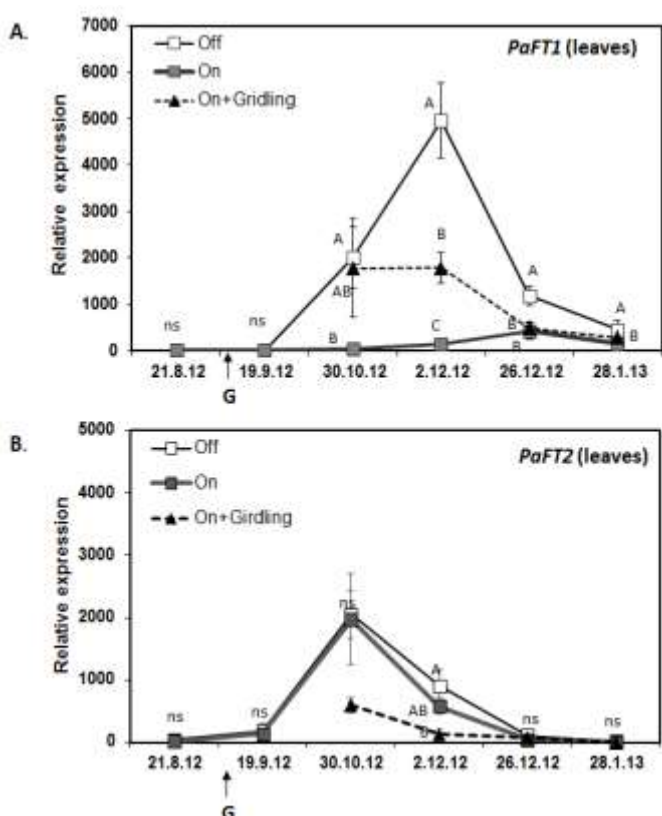
איור 7. השפעת טיפולי ציטוקינין באבוקדו 'האס' על חזרה לפריחה ועל יבול חוזר- ניסוי יקום. פנל עליון - טיפולי BA (80 ח"מ) בעצי שפע בוצעו בשני מועדים סוף נוב' (N), סוף דצמ' (D) וריסוס כפול סוף נוב' + סוף דצמ' (D+N), טיפול CPPU (20 ח"מ) בעצי שפע בוצע בסוף נוב' (N). עצי שפע ושפל, לא מטופלים, שימשו כעצי ביקורת. היבול הכללי נקטף במועד הקטיפה המסחרי בסוף ינואר 2016. פנל אמצעי - דרגות הפריחה נקבעו לאחר תצפיות שבוצעו בשיא פריחה בחודש אפריל 2016. פנל תחתון - היבול הכללי החוזר נקטף במועד הקטיפה המסחרי בתחילת ינואר 2017. כל עמודה מייצגת ממוצע + שגיאת תקן של שמונה עצים לטיפול



3.6 שיבוט גן נוסף מאבוקדו המקודד לחלבון FT-like ואפיון דגם ביטוי בהעדר ובנוכחות פרי. כפי שצוין במבוא, בעבודות שנערכו במספר מינים נמצא כי הגן *FT* עשוי להיות משויך למשפחת גנים המונה מספר נציגים. על בסיס רצף EST שזוהה במאגר מידע של NCBI בודדנו בעבר גן המקודד לחלבון *FT*. כיום, מצויי בידינו טרנסקריפטום אבוקדו 'האס' אשר רוצפו בטכנולוגיות של 454 Illumina HiSeq מתערובת RNA מעלים (מסגרת מיזם חוסן בוטריוספרה).

בעזרת אנליזת BLAST ושימוש במאגר זה זיהינו ובודדנו גן נוסף המקודד לכאורה לחלבון נוסף ממשפחת FT. הגן החדש שבודד מקודד לחלבון בעל 174 חומצות אמינו (ח"א) ומשקלו המוערך הינו 19.6 kDa. רצפו של חלבון זה חולק 80.5% זהות עם חלבון *PaFT* שזוהה בעבודה הקודמת, ו-78-83% זהות עם חלבוני FT ממינים אחרים. לאחר זיהוי הגן החדש, הוחלט לכנות את הגן שבודדנו בעבודה הקודמת בשם *PaFT1*, ואת הגן החדש בשם *PaFT2*. כפי שניתן לראות באיור ג' שבנספח, השוואה ברמת החלבון הדגימה כי כמו *PaFT1*, גם *PaFT2*, מכיל ח"א שמורות המאפיינות את חלבוני FT-like ממינים שונים, ומאפשרת להבדיל בינם ובין חלבוני TFL1 ו-BFT. אנליזה פילוגנטית הדגימה בנוסף שניתן לסווג חלבון זה כ-FT אך לא כ-TSF (לא מוצג). לאחר זיהוי הגן *PaFT2*, לבדיקת דגם ביטוי בהשפעת/ או העדר עומס פרי, תוכננו תחלים ספציפיים ונעשה שימוש בחומר צמחי (עלים) שנאספו מעצים במצב שפע, שפע, ושפע+חיגור.

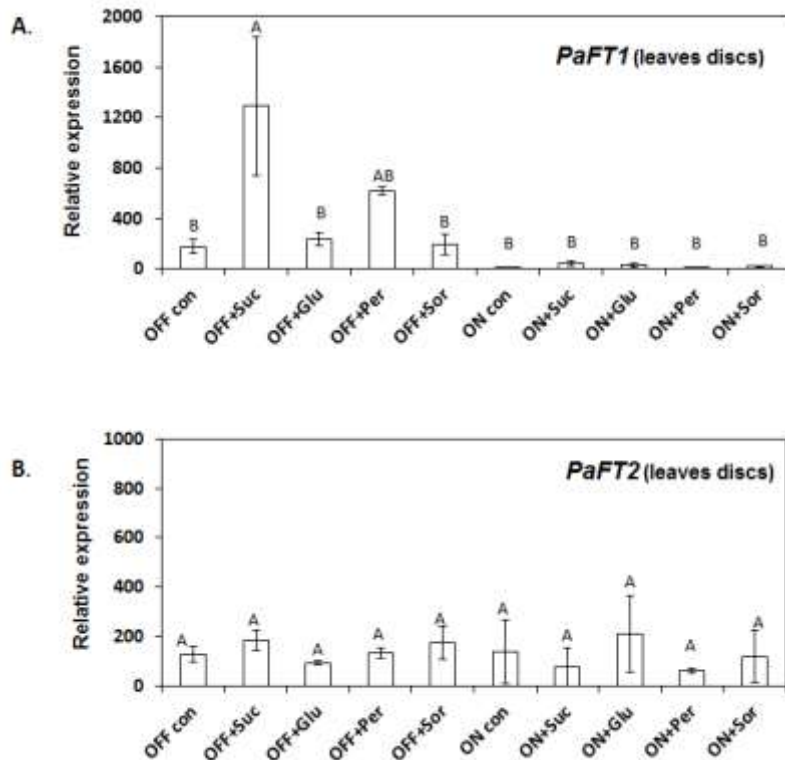
תוצאות בחינת ביטוי *PaFT1* הדגימו בעבר כי בעלים ממצב שפל, רמת ביטוי *PaFT1* עלתה באופן זמני והגיעה לשיא בתחילת דצמ'. מאידך, רמת *PaFT1* נותרה נמוכה בעלים ממצב שפע. כמו כן הודגם כי חיגור ענפי עצי שפע גרר עלייה זמנית ברמת ביטוי *PaFT1* בעלים, למרות נוכחות פרי בבסיס הענפים (ראה איור 8A*). בבדיקה שנערכה במסגרת עבודה זו הודגם כי באותן דוגמאות, ביטוי *PaFT2* בעלים מעצי שפל החל לעלות מוקדם יותר, החל מאמצע חודש ספט', הגיע לשיא בסוף אוק', ובהמשך חלה ירידה בביטוי עד להגעה לרמתו התחלתית באמצע דצמ'. בעלים מעצים במצב שפע (On) נצפה דגם ביטוי דומה. אולם, הממצא הבולט שהתקבל היה היעדר הבדלים מובהקים ברמת ביטוי הגן בין מצבי שפע ושפל. בנוסף הודגם כי בניגוד להשפעתו החיובית על ביטוי *PaFT1*, טיפול החיגור לא השפיע באופן דומה על ביטוי *PaFT2*, שכן רמתו נותרה נמוכה בפרק הזמן הנבחן לאחר החיגור, ואף ירדה יחסית למצב שפע. יצוין כי תוצאות דומות לתוצאות המוצגות להלן, הודגמו בבדיקות שנערכו תוך שימוש בחומר צמחי (עלים) שנדגמו מעצי שפי ושפל בשנה עוקבת (לא מוצג).



איור מס' 8 - בחינת דגם ביטוי העונתי של הגן *PaFT1* (A*) ושל הגן *PaFT2* (B) בעלים שנדגמו מעצים בשלושה מצבים: שפל (Off), שפע (On) ושפע+חיגור (On+Girdling).

כל נקודה מייצגת ממוצע $\pm$ שגיאת תקן של 3 חזרות ביולוגיות. אותיות שונות מייצגות את המובהקות בשונות בין שלושת המצבים, בכול נקודת זמן. האות G מורה על מועד ביצוע החיגור. ערכי הביטוי היחסיים חושבו ביחס לגן המנרמל *PaACT*. * התוצאות המוצגות בהקשר ל-*PaFT1* לקוחות מתוך עבודת המסטר של דפנה זיו ומוצגות לצורך השוואה.

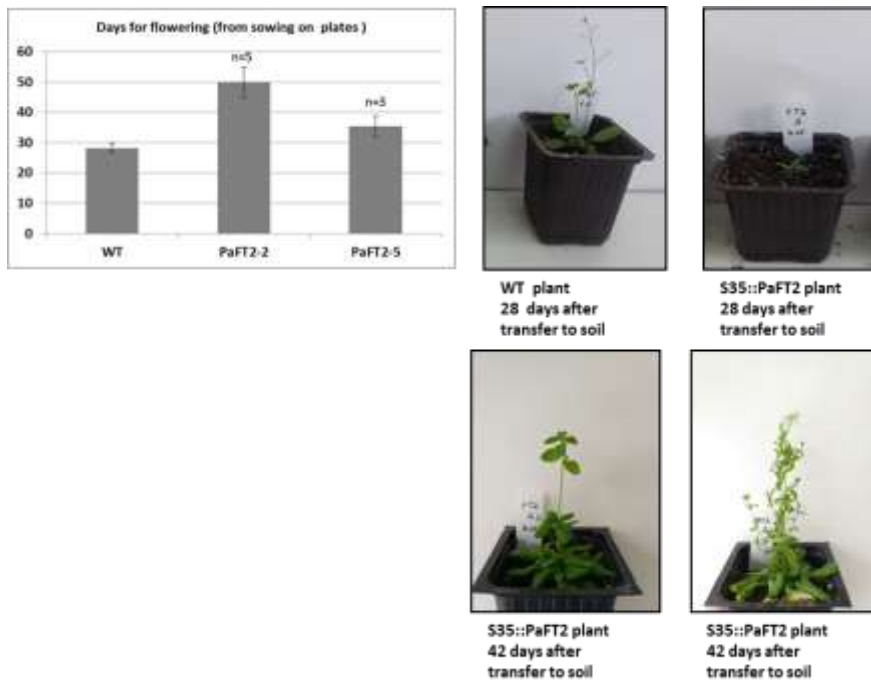
בעבודה קודמת שערכנו, לביסוס הנחת העבודה הטוענת כי בעצים במצב שפל, בהעדר פעילות מבלעים חזקים (פירות), חלה הצטברות יתרה של סוכרים בעלים המשפיע על ביטוי *PaFT1* ביצענו ניסיונות במערכת דיסקיות עלים. בחנו את השפעת טיפולי סוכרים מסיסים שונים על ביטוי *PaFT1*. לצורך הניסויים נדגמו עלים מעצים במצב שפע ושפל ומהם הוכנו דיסקיות. דיסקיות אלו הודגרו למשך 24 ש' בהעדר ו/או בנוכחות סוכרים מסיסים שונים ביניהם: סוכרוז, גלוקוז ופרסאיטול. לצורכי ביקורת פנימית נעשה שימוש בסורביטול בריכוז מולרי שווה, המשנה את הריכוז האוסמוטי של התמיסה. תוצאות אנליזת ביטוי *PaFT1* במערכת זו מוצגות באיור 9A. כפי שניתן לראות ביטוי *PaFT1* בנקודת הזמן הנבדקת (תחילת דצמבר, 2014), תאם את דגם ביטוי הגן בעלים. בהתאם, רמת *PaFT1* הייתה נמוכה מאוד בדיסקיות עלים מעצי שפע בהשוואה לדיסקיות עלים מעצי שפל. בנוסף בחינה של תוצאות השפעת מתן סוכרים מסיסים על דגם ביטוי *PaFT1* הראתה כי עלייה בביטוי הגן התאפשרה בעיקר בנוכחות סוכרוז ובמידה מסוימת בנוכחות פרסאיטול. יש לציין אם זאת כי עלייה מובהקת בביטוי הגן לאחר מתן סוכרוז נצפתה אך ורק בדיסקיות עלים מעצי שפל. תוצאות אלו חיזקו את הרעיון כי לסוכרוז, ויתכן אף לפרסאיטול, השפעה חיובית על השראת העלייה בביטוי *PaFT1*. בעבודה זו, לאחר זיהוי *PaFT2*, החלטנו להשתמש בחומר הצמחי שנאסף בניסוי הדיסקיות ולבחון גם את השפעתם של סוכרים מסיסים שונים על ביטוי *PaFT2*. תוצאות הבדיקה חשפו אותנו לדפוס תגובה שונה של שני הגנים מאותה המשפחה. במקרה זה, לא נצפה שינוי ברמת ביטוי הגן בין הדסקיות מעלים של עצי השפל לבין אלו של עצים במצב שפע. כמו כן, לא הודגמו הבדלים מובהקים ברמת ביטוי *PaFT2* בין הביקורות מעלים מעצי שפל ושפע ובין שאר דיסקיות העלים שהודגרו בנוכחות סוכרים מסיסים שונים (איור מס' 9B).



איור מס' 9: דגם הביטוי של *PaFT1* (A*) ושל *PaFT2* (B) בדיסקיות עלים מעצים במצב שפע ושפל, בהעדר ו/או בנוכחות סוכרים מסיסים שונים. העלים ששימשו להכנת הדיסקיות נדגמו מעצים במצב שפל או שפע בתחילת חודש דצמבר 2014. הדיסקיות הודגרו בארלנמירים במדיום נוזלי בהעדר ו/או בנוכחות 100mM סוכרוז, גלוקוז, פרסאיטול, וסורביטול. כל עמודה מייצגת ממוצע $\pm$ שגיאת תקן של 3 חזרות ביולוגיות (דיסקיות) הוכנו מעלים של שלושה עצים בכל מצב, כל עץ שימש כחזרה ביולוגית). אותיות שונות מייצגות את המובהקות בשונות בין הטיפולים.

* התוצאות המוצגות בהקשר ל-*PaFT1* לקוחות מתוך עבודת המסטר של אושרת ז'ק, ומוצגות לצורך השוואה.

3.7 ביטוי ביתר של הגן *PaFT2* בארבידופסיס התוצאות המוצגות לעיל, מורות כי ככל הנראה רמת ביטוי *PaFT2* אינה מושפעת מנוכחות פרי על העץ (ו/או מהשפעתו העקיפה על הצטברות סוכרים בעלה). התוצאות מרמזות בהתאם כי תפקידו של *PaFT2* שונה ככל הנראה (או לפחות אינו זהה) לזה של *PaFT1*. כתמיכה ברעיון ש-*PaFT1* פועל כפלורוגן, הדגמנו בעבר כי ביטוי ביתר של *PaFT1* בצמחי ארבידופסיס, השרה פריחה מוקדמת בהשוואה לצמחי ביקורת (28). בכדי לנסות ולהתחקות אחר תפקידו האפשרי של *PaFT2*, בעבודה זו שובט מקטע cDNA של הגן בוקטור ביטוי pART-27, תחת פורמוטור S35. לאחר טרנספורמציה של צמחי ארבידופסיס (Col-0) נבחרו צמחונים מ 2 אירועי טרנספורמציה ב"ת תלויים שהראו עמידות לקנמיצין ותוצאות PCR חיוביות לנוכחות המחדר. באופן מעניין הצמחים שנבחרו הראו שונות פנוטיפית מצמחי ה-WT ופרחו מאוחר יותר. הפריחה המאוחרת התרחשה לאחר ייצור מוגבר של עלים ועלעליים (לא מוצג). הצמחים הטרנסגניים עברו הפריה עצמית ומחלקם הצלחנו לאסוף זרעים (נצפו פרחים שלא ייצרו פירות). זרעי קווים אלו יזרעו ויונבטו במהלך החודש הקרוב תחת תנאי תאורה אינדוקטיביים של יום ארוך (LD) להמשך האפיון הפנוטיפי.



איור מס' 10. ביטוי ביתר של החלבון *PaFT2* בצמחי ארבידופסיס מעכב פריחה בהשוואה לצמחי WT. מוצג גרף המציג מספר הימים שנדרשו לפריחה בצמחי WT ובצמחי 2 קווי T1 מותמרים שגודלו בתנאי יום ארוך. כל עמודה מייצגת ממוצע ($n=3-5$) $\pm$ שגיאת תקן. **מימין בחלק העליון** מוצגות תמונות מייצגות מקבילות של צמחים מותמרים (שלא פרחו) וצמחי WT (פורחים). התמונות צולמו 28 יום מזריעה. **בחלק התחתון:** מוצגות של צמחים מותמרים לאחר פריחה התמונות צולמו כ-50 יום מזריעה.

4. סיכום ודין

התוצאות שהתקבלו בחלק הראשון של העבודה (3.1-3.3) מובילות למסקנה שעומס פרי בשנת שפע עשוי להשפיע באופן שלילי על הצטברות CKs בעלים גם ע"י על ידי מיתון סינטזת CKs וגם ע"י אינדוקציה פירוק CKs. ראוי לציין עם זאת שלמרות שתוצאות ביטוי *PalPT3* בעלים ממצב שפע ושפל מראות כי קיימת הלימה בין שינוי ברמת ביטוי *PalPT3* ובין רמת הצטברות iPR, תוצאות ביטוי הגן אינן עומדות בהלימה עם התמונה המתקבלת מבדיקת רמות iPR בעלים מהענפים

המחוגרים. במקרה זה, בעוד רמת ביטוי הגן יורדת לקראת סוף פרק הזמן הנבחן, נצפית מגמת עלייה כללית ברמת הצטברות iPR לקראת סוף פרק הזמן הנבחן. ייתכן שביטוי של גנים נוספים השייכים למשפחת IPT, שלא נבדק על ידינו, מושפע אף הוא מעומס פרי ורמת הצטברותו עולה לאחר חיסור הענף וניתוק הקשר בין הפרי לעלה.

מהספרות, ידוע כי במקרים מסוימים, עלייה ברמת ציטוקינים עשויה להשפיע על חזרה לפריחה (17-18). יש להזכיר בנוסף כי מספר עבודות הקיימות בספרות טוענות כי לציטוקינים המועבר מעלים אל עבר הפקעים עשוי להיות תפקיד המעודד מעבר לפריחה, באופן בלתי תלוי ב-FT, דרך השפעה ישירה על ביטוי *SOC1* (מסומן ב30). כדי לנסות ולאמת את תפקידם ההשראתי של ציטוקינים על ביטוי *PaFT1* ועל מידת החזרה לפריחה ביצענו ניסיונות בשטח. תוצאות ניסויים ראשונים שביצענו (עונת 2015/2016) הורו כי טיפול ציטוקינין (80 ח"מ) בעצי שפע בסוף נוב' (טיפול מאוחר) אפשר חזרה לפריחה, אולם ללא תלות בעלייה בביטוי *PaFT1* בעלים (ראה 3.4). על בסיס התוצאות שהתקבלו ניתן היה להניח שטיפול CK משפיעים באופן חיובי, לא דווקא על שלב האינדוקציה לפריחה (התלוי בעלייה בביטוי *PaFT1*), אלא על ההתמיינות לפריחה, ו/או על התעוררות פקעים רדומים (ראה 30-31). ראוי לציין בהקשר זה כי בעבודות שנערכו לאחרונה בג'טרופה (צמח המעורר עניין לגידול ביודיזל), דווח כי טיפול BA גרמו לעלייה במספר הפרחים שהתקבלו לתפוח (32-33). על סמך תוצאות אנליזה ביטוי שבוצעה הועלתה השערה הטוענת כי אחת המנגנונים דרכם טיפול ציטוקינין משפיעים על רמת הפריחה, היא בין היתר ע"י הורדת רמת ביטוי בקר שעתוק *TEMPRANILLO* (TEM), המבקר באופן שלילי חזרה לפריחה (33).

בהתבסס על התוצאות שקיבלנו בשנת המחקר הראשונה, ביצענו ניסויים חוזרים במתכונת דומה בעונת 2016/2017. בניגוד לתוצאות שקיבלנו בעונת 2015/2016, טיפול ציטוקינין שניתנו לעצים במצב שפע לא תרמו באופן מובהק להעלאת רמת הפריחה והיבול באביב ובעונה העוקבת. מהות השוני בין תוצאות הטיפולים אינה ברורה לנו. למרות האמור לעיל, כאן המקום לציין כי לאור הממצאים שקיבלנו, הצענו שיש מקום לנסות ולשפר את השימוש בציטוקינין סיננטי יציב יותר כדוגמת CPPU ו/או TDZ. מעניין לציין בהקשר זה כי בעבודות עדכניות שבוצעו בסחלבים צוין כי טיפול TDZ הגבירו את רמת האנדוגנית של ציטוקינין ואוקסין במהלך המעבר לפריחה (34). זאת ועוד, באופן מעניין בדיקה טרנסקריפטומית שבוצעה בעבודת המשך לבדיקת השפעת הטיפול על המעבר לפריחה, הדגימה כי טיפול ב TDZ גרם לעלייה בביטוי הגנים *SOC1*, *AP1* ו *LFY*, גנים המעורבים כאמור בהפיכת המריסטמה הוגטטיבית למריסטמה רפרודוקטיבית (35).

במקרה שלנו, כדי לבדוק האם ל-CKs (ו/או לשינוי ביחס בין רמת CKs:GAs), תפקיד בהשראת המעבר לפריחה, בוצעו ניסויי שטח נוספים בזנים 'האס' ו'פינקרטון'. חלק יישומי זה של העבודה, שהתבסס על תוצאותינו, מומן ע"י שולחן מגדלי האבוקדו בתוכנית נפרדת (בה היינו שותפים), ורוכז ע"י ד"ר ליאור רובינביץ. תוצאות ניסויים אלו הדגימו כי בפרט, שילוב טיפול Uniconazol+TDZ בעצי 'האס' שעמדו במצב שפע בפב', השפיע באופן חיובי ומובהק על רמת הפריחה החוזרת ורמת היבול החוזר, זאת למרות עומסי פרי גבוהים שהיו בעצים. תוצאות ניסויים אלו והצעות להמשך עבודה בכיוון זה, ובכיוונים אחרים מוצגים בתוכנית שאושרה לא מכבר שכותרתה: "שיפור ממשק גידול זני אבוקדו

מסחריים להעלאת יבול ושיפור רווחיות הענף" (תוכנית 20-01-0160 הממומנת הן ע"י מדען החקלאות והן ע"י מועצת הצמחים).

בחלק האחרון של המחקר עסקנו בשיבוט ואיפיון גן נוסף מאבוקדו המקודד לחלבון FT-like, גן זה כונה בהתאם *PaFT2*. תוצאות בדיקת דגם ביטוי הגן במצב שפע ושפל הורו כי בשונה מ *PaFT1* רמת ביטוי *PaFT2* אינה מושפעת מנוכחות פרי על העץ. בפרט, נמצא כי עלייה זמנית בביטוי *PaFT2* בעלי עצים במצב שפע ושפל, חלה מוקדם יותר יחסית לעלייה החדה ב-*PaFT1* המתרחשת בעלי עצים ממצב שפל. תוצאות אלו מרמזות אם כן כי תפקידו של *PaFT2* שונה ככל הנראה (או לפחות אינו זהה) לזה של *PaFT1*. כאן המקום לציין כי קיימים דיווחים בספרות המורים על קיומם של שני גני *FT* המקודדים לחלבונים הפועלים באופן אנטגוניסטי (36). כך לדוגמה במחקר שבוצע בסלק הוצע שקיימים שני גנים פאראלוגיים ל-*FT* מארבידופסיס, בעוד אחד הפאראלוגים גורר אינדוקציה לפריחה, הפאראלוג השני מדכא את המעבר לפריחה וירידה ברמת הביטוי שלו הכרחית לתהליך הקיוט (ורנליזציה) (37). באופן דומה דווח כי בצפצפה, קיימים שני גני *FT* שמקורם ככל הנראה מגן יחיד אשר עבר אירוע הכפלה שלוהה ביצירת מוטציות. אירועים אלו גרמו ליצירת שני גנים בעלי תפקידים מנוגדים. בעוד המעבר לפריחה מבוקר ע"י *PtFT1*, הגידול הווגטיבי מבוקר ע"י *PtFT2* בהשפעת טמפרטורות חמות (38). תוצאות ראשוניות של ביטוי אקטופי של *PaFT2* בארבידופסיס הורו אומנם כי בשונה מ *PaFT1* ביטוי ביתר של *PaFT2* לא רק שלא גרר פריחה מוקדמת אלא גם עיכב פריחה ועודד צימוח עלים. במסגרת מחקר בסיסי בכוונתנו להמשיך ולבחון את תפקידו האפשרי של *PaFT2*, תוך התמקדות א. בבחינת דגם ביטוי במהלך עונה שלמה ומעקב אחר גלי הגידול הווגטיבי. וב. בביצוע שינויים בח"א ספציפיות בחלבון *PaFT2* (מוטציות מכוונות) ובחינת השפעת שינויים אלו על פנוטיפ פריחה בצמחי ארבידופסיס מותמרים (בכדי לראות האם ניתן להחזיר לחלבון את פעילותו הפלורוגנית).

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

5. ביבליוגרפיה

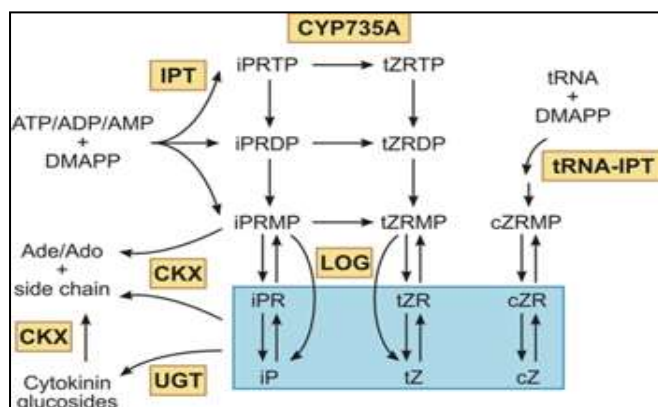
1. Lovatt CJ (2010) Alternate Bearing Of 'Hass' Avocado. *California Avocado Society Yearbook* (93):125-140.
2. Verreyne JS & Lovatt CJ (2009) The Effect of Crop Load on Budbreak Influences Return Bloom in Alternate Bearing 'Pixie' Mandarin. *J Amer Soc Hort Sci* 134(3):299-307.
3. Lavee S (2007) Biennial bearing in olive (*Olea Europea*). *Annales Ser Hist Nat* 17:101-112.
4. Goldschmidt EE, Aschkenazi N, Hezano Y, Schaffer AA, & Monselise SP (1985) A role for carbohydrate levels in the control of flowering in *Citrus*. *Scientia Horticulturae* (26):159-166.
5. Samach A & Smith HM (2013) Constraints to obtaining consistent annual yields in perennials. II: Environment and fruit load affect induction of flowering. *Plant Sci* 207:168-176.
6. Wilkie JD, Sedgley M, & Olesen T (2008) Regulation of floral initiation in horticultural trees. *Journal of experimental botany* 59(12):3215-3228.
7. Whaley AW, Schaffer B, & Wolstenholme BN (2002) *The Avocado: Botany, Production and Uses* (CABI, New York, NY) 1 Ed.
8. Salazar-Garcia S, Lord EM, & Lovatt CJ (1998) Inflorescence and flower development of the 'Hass' avocado during "on" and "off" crop years. *J Amer Soc Hort Sci* 123:537-544.

- .9 Lovatt CJ (2005) Eliminating alternate bearing of the 'Hass' avocado. *Proceedings of the California Avocado Research Symposium*, (University of California), pp 75-86.
- .10 Lovatt CJ (2006) Eliminating alternate bearing of the 'Hass' avocado. *Proceedings of the California Avocado Research Symposium*, (University of California), pp 127-142.
- .11 Imaizumi T & Kay SA (2006) Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence. *Trends in plant science* 11(11):550-558.
- .12 Turnbull C (2011) Long-distance regulation of flowering time. *Journal of experimental botany* 62(13):4399–4413.
- .14 Hsu CY, et al. (2011) FLOWERING LOCUS T duplication coordinates reproductive and vegetative growth in perennial poplar. *PNAS* 108(26):10756-10761.
- .15 King RW (2012) Mobile signals in day length regulated flowering: Gibberellins, Flowering Locus T, and sucrose. *Russian Journal of Plant Physiology* 59(4):479–490.
- .16 Wahl V, et al. (2013) Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 339(6120):704-707.
- .17 Werner T, et al. (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant cell* 15(11):2532-2550.
- .18 D'Aloia M, et al. (2011) Cytokinin promotes flowering of *Arabidopsis* via transcriptional activation of the FT paralogue TSF. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 65(6):972-979.
- .19 Nishikawa F, et al. (2007) Increased CiFT abundance in the stem correlates with floral induction by low temperature in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Journal of experimental botany* 58(14):3915-3927.
- .20 Trankner C, et al. (2011) Over-expression of an FT-homologous gene of apple induces early flowering in annual and perennial plants. *Planta* 232(6):1309-1324.
- .21 Nakagawaa M ,Honsho C, Kanzakia S, Shimizuc K, & Utsunomiyaa N (2012) Isolation and expression analysis of FLOWERING LOCUS T-like and gibberellin metabolism genes in biennial-bearing mango trees. *Sci Hortic* 139:108-117.
- .22 MBAהברמן א (2012) ואפיון השפעת עומס פרי על המעבר לפריחה לימוד המערכת האנדוגנית לבקרת הפריחה בזית. (האוניברסיטה העברית בירושלים, רחובות).
- .23 Endo T, et al. (2005) Ectopic expression of an FT homolog from Citrus confers an early flowering phenotype on trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.). *Transgenic Res* 14(5):703-712.
- .24 Freiman A, et al. (2012) Development of a transgenic early flowering pear (*Pyrus communis* L.) genotype by RNAi silencing of PcTFL1-1 and PcTFL1-2. *Planta* 235(6):1239-1251.
- .25 Munˆoz-Fambuena N, et al. (2011) Fruit regulates seasonal expression of flowering genes in alternate-bearing 'Moncada' mandarin. *Ann Bot* 108(3):511-519.
- .26 Munˆoz-Fambuena N, et al. (2012) Fruit load modulates flowering-related gene expression in buds of alternate-bearing 'Moncada' mandarin. *Ann Bot* 110:1109–1118.
- .27 Shalom L, et al. (2012) Alternate bearing in *Citrus*: Changes in the expression of flowering control genes and in global gene expression in ON- versus OFF-crop trees. *PLoS One* 7. DOI: 10.1371/journal.pone.0046930.
- .28 Ziv, D., Zviran, T., Zezak, O., Samach, A and Irihimovitch, V (2014). Expression profiling of *FLOWERING LOCUS T*-like gene in alternate bearing 'Hass' avocado trees suggests a role for *PaFT* in avocado flower induction. *PLoS One* 9(10): e110613. doi:10.1371/journal.pone.0110613.
- .29 Sakakibara H (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual review of plant biology* 57:431-449.
- .30 Bernier, G (2011) My favorite flowering image. *J. Exp. Bot.* doi:10.
- .31 Bernier G, Kinet JM, Jacqmard A, Havelange A, Bodson M (1977) Cytokinin as a possible component of the floral stimulus in *Sinapis alba*. *Plant Physiol.* 60:282-285
- .32 Pan BZ, Chen MS, Ni J, Xu ZF (2014) Transcriptome of the inflorescence meristems of the biofuel plant *Jatropha curcas* treated with cytokinin. *Bmc Genomics* 15. doi:10.1186/1471-2164-15-974
- .33 Chen MS, Pan BZ, Wang GJ, Ni J, Niu LJ, Xu ZF (2014) Analysis of the transcriptional responses in inflorescence buds of *Jatropha curcas* exposed to cytokinin treatment. *Bmc Plant Biology* 14. doi:10.1186/s12870-014-0318-z

- .34 Wen ZZ, Guo WZ, Li JC, Lin HS, He CM, Liu YQ, Zhang QY, Liu W (2017) Comparative Transcriptomic Analysis of Vernalization- and Cytokinin-Induced Floral Transition in *Dendrobium nobile*. *Scientific Reports* 7. doi:10.1038/srep45748
- .35 Ferreira WD, Kerbauy GB, Kraus JE, Pescador R, Suzuki RM (2006) Thidiazuron influences the endogenous levels of cytokinins and IAA during the flowering of isolated shoots of *Dendrobium*. *Journal of Plant Physiology* 163 (11):1126-1134. doi:10.1016/j.jplph.2005.07.012
- .36 Pin PA, Nilsson O (2012) The multifaceted roles of FLOWERING LOCUS T in plant development. *Plant Cell Environ* 35 (10):1742-1755. doi:10.1111/j.1365-3040.2012.02558.x
- .37 Pin PA, Benlloch R, Bonnet D, Wremmerth-Weich E, Kraft T, Gielen JJL, Nilsson O (2010) An Antagonistic Pair of FT Homologs Mediates the Control of Flowering Time in Sugar Beet. *Science* 330 (6009):1397-1400. doi:10.1126/science.1197004
- .38 Hsu CY, Adams JP, Kim H, No K, Ma C, Strauss SH, Drnevich J, Vandervelde L, Ellis JD, Rice BM, Wickett N, Gunter LE, Tuskan GA, Brunner AM, Page GP, Barakat A, Carlson JE, DePamphilis CW, Luthe DS, Yuceer C (2011) FLOWERING LOCUS T duplication coordinates reproductive and vegetative growth in perennial poplar. *PNAS* 108: 10756-10761

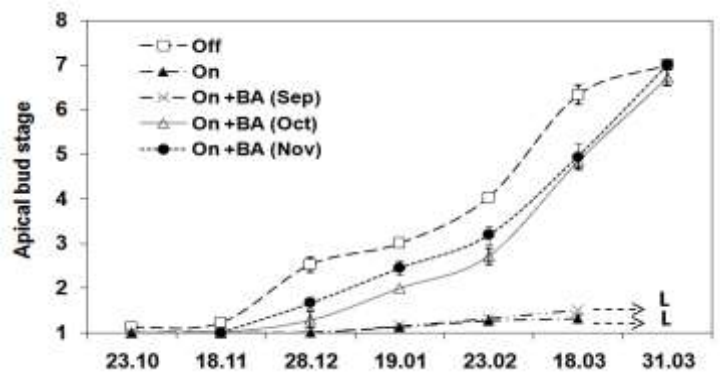
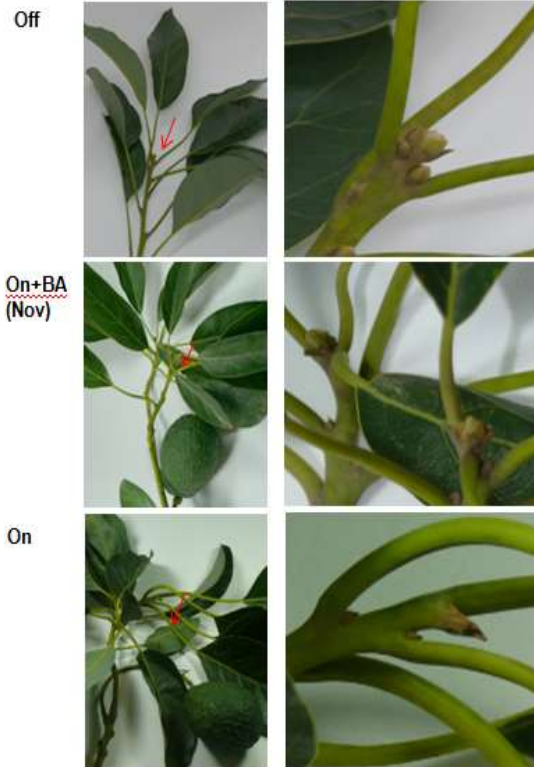
נספחים:

נספח א - ניסויי חיגור ענפים. הניסוי בוצע בעונת 2012/2013 בחלקת 'האס' בקיבוץ אייל. בחירת העצים נעשתה בסוף חודש אפריל לאחר סקר חנטה. במסגרת זו נבחרו שמונה עצים במצב שפע (On) וארבעה עצים במצב שפל (Off). בכל עץ סומנו כ 20-25 ענפי צימוח קייצי נושאי פרי (בעצים במצב שפע), או ענפי צימוח קייצי שאינם נושאים פרי (בעצים במצב שפל). בכדי לשמור על מעקב אחיד, סומנו בכל עץ אך ורק ענפים מצידם הדרומי של העצים. בארבעה עצים במצב שפע בוצעו טיפולי חיגור בענפים המסומנים (On+Girdling). טיפולי החיגור בוצעו בתחילת חודש ספטמבר 2012 וכללו הסרת טבעת שיפה ברוחב 1 ס"מ באזור המחובר בין הפרי לבין התחלת הצימוח האביבי. ארבעת עצי השפע וארבעת עצי השפל הנותרים שימשו כביקורת. חומר צמחי נדגם ונאסף אחת למספר שבועות. איסוף החומר הצמחי התבצע בשעות הבוקר המוקדמות, בין השעות 6:00 ל-7:00 ולא יאוחר משעה לאחר הזריחה, במתכונת דומה בה בוצע איסוף החומר בעבודה קודמת (Ziv et al., 2008). ענפי צימוח קייצי נושאי פרי (מעצים במצב שפע), או ענפי צימוח קייצי שאינם נושאים פרי (בעצים מצב שפל), נגזמו באזור בו מתחיל הצימוח האביבי, הושמו בכלים עם מים והובאו למעבדה לצורך דיגום הרקמות. בכדי לשמור על אחידות נקבע כי דיגום העלים יתבצע מאזור הגידול הקייצי. כנקודת ייחוס נעשה שימוש באזור המעבר בין הגידול האביבי והגידול הקייצי. עלים אחידות בגודלם נגדמו החל מהעלה הרביעי-חמישי יחסית לנקודת הדיגום. מכל ענף נדגם גם כן הפקע הקודקודי ומספר פקעים מתחתיו. העלים והפקעים הוקפאו תחילה בחנקן נוזלי, ולאחר מכן נשמרו ב -80°C לשם המשך עבודה והפקת RNA.

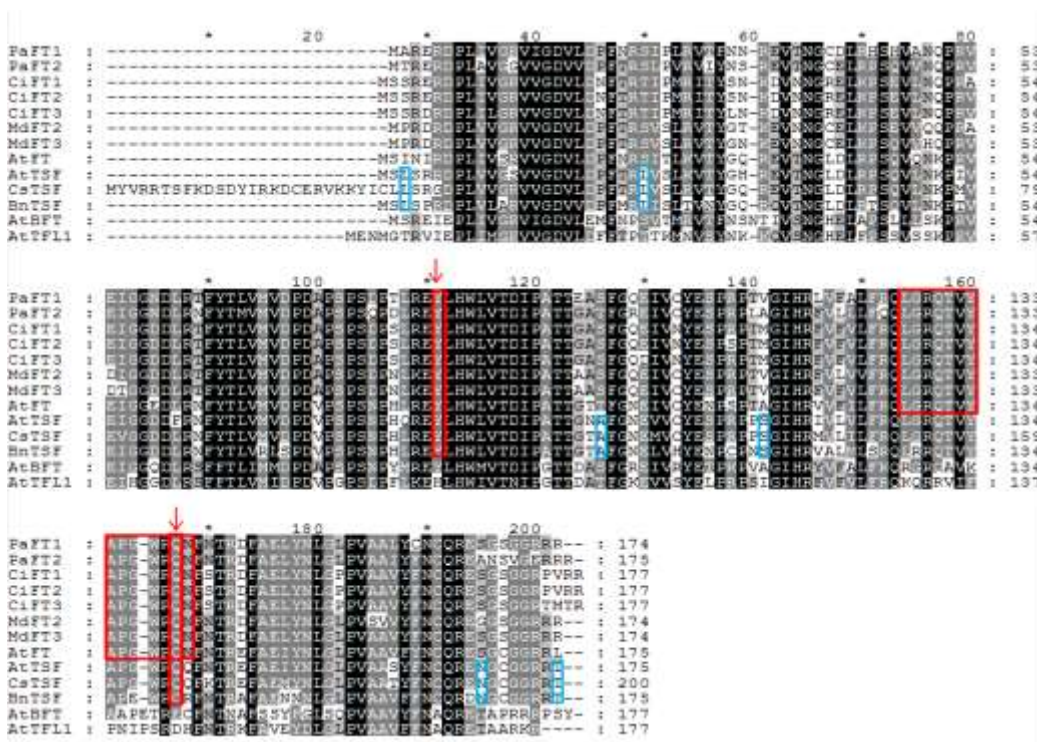


נספח א': מסלולי ביוסינטזה של ציטוקינין.
מסומנים בצהוב אנזימים מרכזים הפועלים במסלולים השונים.

נספח ב'- גרף תחתון: מעקב אחר שלבי ההתפתחות הפקע הקודקודי בעצים אשר טופלו בציטוקינין בחודשים ספטמבר ואוקטובר ונובמבר ובעצי הביקורת (On and Off trees). השלבים בהתפתחות הפקעים הקודקודיים, בנקודת זמן השוואת, הוגדרו על פי סקלה התפתחותית כאשר הערך 1 מסמל פקע במצב וגטיבי ואילו ערך 7 מסמל תפרחת עם פרחים פתוחים. כל ערך מייצג ממוצע $\pm$ שגיאת תקן של כ-40 תצפיות. משמאל – תמונות ענפים מצימוח קיצי ותמונות פקעים קודקודיים באותם ענפים מעצים במצב שפע אשר טופלו בציטוקינין בנובמבר ובעצי הביקורת (On and Off trees). מסומנים בחץ אדום הפקעים ע"ג הענפים שצולמו בהגדלה



הסבר נספח ג'- כדי לבחון כיצד משפיעים טיפולי הציטוקינין על קצב המעבר לפריחה, החל מחודש אוגוסט עד חודש אפריל, עקבנו אחר השינויים היוזואלים המתרחשים בפקע הקודקודי, ע"י שימוש בסקלה בה ניתן ערך מספרי לכל מצב נתון במעבר מרקמה וגטיבית לרקמה רפרודוקטיבית. תוצאות מעקב זה הראו כי הפקעים של עצי הביקורת (On trees) וכן הפקעים מעצי הטיפול המוקדם (אמצע ספטמבר) נותרו בשלב 1 (פקע דמוי קונוס) לאורך כל העונה ולבסוף התפתחו מפקעים אלו עלים ולא תפרחות. לעומת זאת, כבר בסוף דצמבר בפקעי עצי הביקורת (Off trees) נצפה גידול בממד" הפקע שלוהו בפתחת הקשקשים בבסיסו (מצב שהוגדר כפקע במצב 2-3). התפתחות פקעים אלו לוותה במעבר ליצירת רקמות רפרודוקטיביות ולמעבר לשלב ההתפתחות 7, בו הפרחים בתפרחת עברו התמיינות מלאה. בפקעים הקודקודיים מעצי שפע שרוססו בציטוקינין באמצע חודש אוקטובר ונובמבר, ניתן לראות דגם התפתחות דומה, אולם במקרה זה עוכב במעט קצב המעבר לשלב 7, בהשוואה לפקעי הביקורת מעצי השפל



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