

דו"ח מסכם לתכנית מחקר מספר 203-0806

השפעתו של סיגנל האתילן על מטבוליזם של ABA ו-GA בפקע במהלך שבירת התרדמה

The effect of the ethylene signal on ABA and GA metabolism during bud dormancy release

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

צוות המחקר: אתי אור*, שמעון לביא, עליזה אוגרודוביץ, תמר בשה, המכון למטעים, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן, ת.ד. 50250. דואר אלקטרוני: vhattior@agri.gov.il

Authors: Etti Or*, Shimon Lavee, Aliza Ogredovitch ARO, Beit Dagan, P.O.B. 50250.

*Corresponding author

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

חתימת החוקר:

תקציר

תכנית המחקר התמקדה בברור ההשערה כי ABA הוא בקר שלילי של התעוררות פקעי גפן. טיפול ב-ABA אקסוגני דחה התעוררות פקעים בדגם תלוי ריכוז ותלוי משך טיפול. הוראה גם כי ABA הפחית את השפעתו הממריצה של HC והממצאים הציעו כי דרגת ההשפעה תלויה בסטטוס התרדמה של הפקעים. יחד עם זאת, טיפול HC מאפשר לפקעים להתגבר על האפקט המעכב של ABA ומועד ההתאוששות נדחה עם המעבר מתרדמה קלה לעמוקה. אינטראקציה דומה נמצאה בין ABA לשוברי תרדמה נוספים. ממצאים אלו הובילו להנחה כי HC משפיע על מטבוליזם של ABA. בהתאמה, HC הוביל לירידה בביטויים של בקרי סינתזת ABA ולעלייה בביטויים של בקרי פירוק, ותמונה דומה נמצאה במעקב אחר פקעים שנדגמו בכרם במהלך מעגל התרדמה הטבעי. טיפול ב-HC הוביל לירידה מובהקת ברמת ABA בפקעים ולעלייה מובהקת ברמת תוצרי הפרוק. גם כאן נמצאה תמונה דומה במהלך מעגל התרדמה הטבעי. בהתאמה להנחות המודל, מעכב סיגנל אתילן עיכב פרוק ABA על ידי HC. להפתעתנו, טיפול ב-GA בריכוזים שונים פעל באופן הפוך למצופה על פי הנחת המודל, והוביל לעיכוב חמור בהתעוררות פקעים. באופן מעניין מצאנו כי טיפול GA לוה בעיכוב פרוק ABA. באופן לא צפוי, נמצאה עלייה מובהקת ברמות ציטוקינינים פעילים בפקעי גפן, בתגובה ל-HC וגם עם תחילת תהליכי ההתעוררות הטבעיים, בצד עלייה ברמת הפרוק של ABA בפקעי גפן, ונסיון ראשוני הראה שציטוקינינים סינטטיים מעודדים התעוררות גפנים בתנאי כרם.

התוצאות שהוצגו תומכות בהנחת המודל לפיה ABA מעורב בשימור מצב התרדמה ובעיכוב התעוררות. נראה כי התקדמות לאורך מעגל התרדמה ויישום שוברי תרדמה מעודדים שינויים במטבוליזם של ABA, שעיקרם עיכוב סינתזת ABA ועידוד פרוק, באופן המוביל להסרת עיכוב ולעידוד התפתחות המריסטמה. דגם הביטוי של בקרי סינתזה ופירוק עשוי להצביע על רגולציה משותפת שמהותה עקרונית להבנת תהליך התרדמה. הממצאים תומכים בהנחה לגבי בקרה של רמת ABA על ידי סיגנל אתילן ושוללים את ההנחה שטיפול GA אקסוגני מייתר את מסלול הארועים המסיר את העיכוב. על בסיס התוצאות נראה שכדאי למקד את רב המאמץ המחקרי בעת הנוכחית בברור אתרי המטרה של ABA בפקע כדי להבין את משמעות העיכוב.

על בסיס התוצאות ראוי לאשש את הממצא לגבי השתנות רמת בקרי הסינתזה והפרוק ברמת החלבון באמצעות נוגדנים כנגד חלבון מנוקה. רצוי לבצע אנליזה ביואינפורמטית של רצפי הפרומוטורים של הגנים המקודדים כדי לנסות לשפוך אור על מהות הרגולציה. יש לבחון בכלים טרנסגניים את השפעת המודולציה של ביטוי הגנים הללו על התנהגות הפקעים ונסיונות בכיוון זה התחילו. כדאי להשתמש בכלים גנומיים להשוואת פקעים מטופלי ABA לפקעי בקורת כדי לאתר גורמים במורד הזרם המעוכבים על ידי ABA.

מבוא מקוצר (סקירה רחבה יותר הובאה בתכנית המחקר)

כצמח שמקורו באזור הממוזג, הגפן זקוקה לקור על מנת לסיים את שלב תרדמת הפקעים החורפית. למרות שדרישות הקור של הגפן הן מתונות, הן אינן מתמלאות לרב באזורי גידול גפן בעלי חורף חם, שדווקא בהם גלום יתרון של הבכרה והכנסה גבוהה למגדל באזורים כאלו, סוגיית השחרור מתרדמה היא מכשלה מהותית בגידול כלכלי של גפן ונדרש פתרון יזום ו"מלאכותי" למתן שבירת תרדמה אחידה ומוקדמת. האמצעי הפרקטי היחיד הזמין כיום לשימוש יעיל לשבירת תרדמה בגפן בעולם כולו הוא ציאנמיד חומצי (HC), והוא מאפשר שבירת תרדמה אחידה ומוקדמת ומשפר את אחוזי ההתעוררות. לרוע המזל, יכולתו של החומר להשרות עקה נשימתית, המפעילה שרשרת תהליכים שמסתיימת בשחרור המריסטמה מעיכוב תהליכי צמיחה, אחראית גם לטוקסיות של החומר, לגפנים ולסביבתם. השפעתו הפיטוטוקסית של החומר על הפקעים מוכרת, תלויה מאוד בסטטוס התרדמה של אוכלוסיית הפקעים ומובילה לנקרוזה של פקעים, התעוררות לא אחידה והפסד יבול. יתרה מזאת, פוטנציאל הסיכון של החומר, הפועל כנתק נשימה, הוביל למהלך אירופי של איסור השימוש בחומר שהוביל להנחיה של השרותים להגנת הצומח להפסיק את השימוש ב-HC החל מ-2014 בנשירים, ולהעריך לקראת הפסקת שימוש בו תוך שנים בודדות גם בגפן. הסיטואציה המתוארת מחייבת איתור אלטרנטיבות לשבירת תרדמה יזומה. למרות האפקטיביות הגבוהה של נתקי נשימה, חיפוש אחר נתק נשימה אלטרנטיבי הוא בבחינת חלמאות משום ששימור תפקודי המיטוכונדריה מכתוב שהוא יהיה בעל פוטנציאל טוקסי לסביבה, וככזה יש סבירות גבוהה שיפסל לשימוש תוך זמן לא ארוך כמו קודמיו DNOC ו-HC. אסטרטגיה נבונה בהרבה תהיה לאתר מטרות במורד הזרם המושפעות מהעקה הנשימתית וממלאות תפקידי מפתח בהסרת הרפרסיה ובחידוש צמיחת פרימורדית הנצר שבפקע.

מחקר מקיף בפקעי גפן חשף שינויים בביטויים של גנים בעלי תפקידים שונים בעקבות שבירת תרדמה מבוקרת ע"י שוברי תרדמה שונים. 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 רצף התהליכים 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 לשפעול המערכת האנטיאוקסידנטית, לפגיעה בתפקוד תקין של מעגל קרבס ולהקטנת ייצור ATP. בתגובה למשבר 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) שגורמים לירידה ברמתה הכוללת. הסרת רפרסיה תלויית-ABA מעודדת בתורה שינויים במטבוליזם/חישה של בקרי צמיחה נוספים המעודדים תהליכי התארכות וחלוקת תאים שפירושם חידוש צמיחה. המודל המתואר נסמך על רמת דמיון גבוהה לרצף תהליכים שהוכחו באיברי צמח שונים ובמספר צמחים בתגובה למצבי עקה חמצונית והיפוקסיה המובילים להתארכות תאים, והוכחו לאחרונה כמעורבים גם בשחרור זרעים מתרדמה (Or, 2009; Ophir et al., 2009 and ref within).

הקשר האפשרי בין פגיעה בנשימה והפעלה של מערכת נשימה אנארובית, המושרים ע"י עקה סבלטאלית, לבין שינוי במאזן בין הורמונים המבקר שימור מצב תרדמה מחד וחידוש צמיחת תאים בפקע מאידך, הוא חידוש משמעותי בשדה המחקר של שחרור פקעי עציץ מתרדמה. אפיון ואיתור השפעות הורמונליות, איתור אינטראקציות ביניהן וזיהוי הגורמים המושפעים מהן במורד הזרם יהוו פריצת דרך מדעית. הנוסף הם יהוו בסיס הכרחי לפיתוח מושכל של חלופות לשבירת תרדמה בגפן ובנשירים אחרים שלא תהיינה כרוכות בהפעלת עקה סבלטאלית על הצמח, שהיא הבסיס לפעולתם של החומרים הנוכחיים וטומנת בחובה פוטנציאל נזק לצמח וסביבתו.

כושר הניבוי של המודל שתואר הוכח במספר נסיונות. בין היתר נמצא כי שוברי תרדמה גורמים לפגיעה בפעילות המיטוכונדריה (Perez et al., 2009), לעלייה ברמת מי חמצן (Perez et al., 2008), להגברת ייצור אצטאלדהיד ואתנול ולעלייה ברמת אתילן אנדוגנית המבוקרת ברמת הביטוי. בהתאמה, אתילן אקסוגני הוביל לשבירת תרדמה ומעכבי סינתזת

אתילן ומעכבי סיגנל אתילן השביתו שבירת תרדמה בפקעים, וביטלו השפעתו של HC. תוצאות מחקר לברור הקשר בין מטבוליזם וסיגנלינג של אתילן דווחו בדו"ח מסכם 203-0673 וחלקם כבר דווחו במאמר בספרות (Ophir et al., 2009). המחקר המדווח בזאת התרכז בעיקר בבחינת ההיפותזה לפיה ABA מעכב שחרור פקעים מתרדמה, ושוברי תרדמה וסיגנל האתילן מתמודדים עם השפעה מעכבת זו באמצעות השפעה על מטבוליזם/ חישה של ABA באופן המוביל להסרת עיכוב ולעידוד התפתחות המריסטמה.

תוצאות ודיון

השפעת ABA אקסוגני על שחרור מתרדמה של פקעי גפן

על מנת לבחון את ההנחה ש-ABA מעכב שחרור פקעים מתרדמה טופלו פקעים חד פרקיים בתמיסת ABA בריכוזים של 10 ו-100 מיקרומולר למשך 48 ו-1 שעות ונערך מעקב אחר התעוררות הפקעים המטופלים, בהשוואה לפקעי בקורת ופקעים שטופלו בציאנמיד. בהמשך נבחנה השפעת משך הטיפול בתמיסת ABA בריכוז של 100 מיקרומולר. מנסיונות אלו הוסק כי בהשוואה לבקורת, טיפול ב-ABA דוחה התעוררות בדגם תלוי ריכוז ותלוי משך טיפול (תמונה 1). משלב זה ואילך פקעים טופלו ב-100 מיקרומולר ABA למשך 48 שעות.

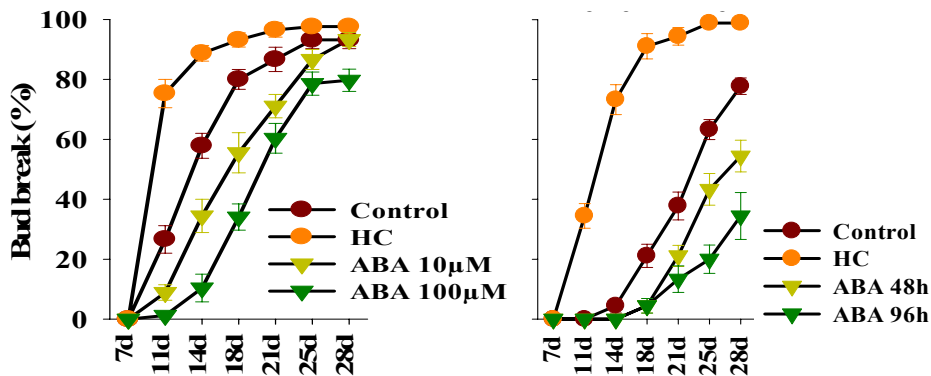


Fig. 1: ABA delays bud break in a time and concentration-dependent mode. (A) Single-node cuttings of cv. Early Sweet (9 groups of 10) were incubated with 10 μM or 100 μM ABA, under 22°C and 12/12 h light/dark. After 48h, cuttings were transferred to tap water for bud break monitoring for 28d as detailed in Ophir et al., 2009. (B) Cuttings were treated with 100 μM ABA for 24h and 48h and then transferred to tap water. Data in each point represent 9 groups of 10 cuttings.

השפעת ABA אקסוגני על ההשפעה הממריצה של HC על קצב ההתעוררות של פקעי גפן

על מנת לבחון את ההיפותזה שירידה תלויית HC ברמת ABA מהווה חלק מהמנגנון שמאפשר לשוב תרדמה זה להקדים שחרור פקעים מתרדמה נבחנה השפעת ABA אקסוגני על התעוררות פקעים מטופלי HC. מאחר שהשפעתו של HC היא תלויית סטטוס תרדמה של הפקע, המשתנה במהלך עונת התרדמה, הנסיון נעשה בשנת הנסיונות הראשונה בארבעה מועדים בלתי תלויים ממחצית נובמבר ועד מחצית דצמבר שסטטוס התרדמה שלהם אופייני ומייצג מעבר מתרדמה קלה לתרדמה עמוקה. הממצאים הציעו כי ABA הפחית את השפעתו הממריצה של HC. בנוסף נראה כי דרגת ההשפעה תלויה בסטטוס התרדמה של הפקעים (התוצאות הובאו בדו"ח שנה ראשונה). על מנת לבסס את ההנחה האמורה נבחנה בהמשך התנהגות הפקעים מדי שבוע לאורך מעגל התרדמה וההתעוררות.

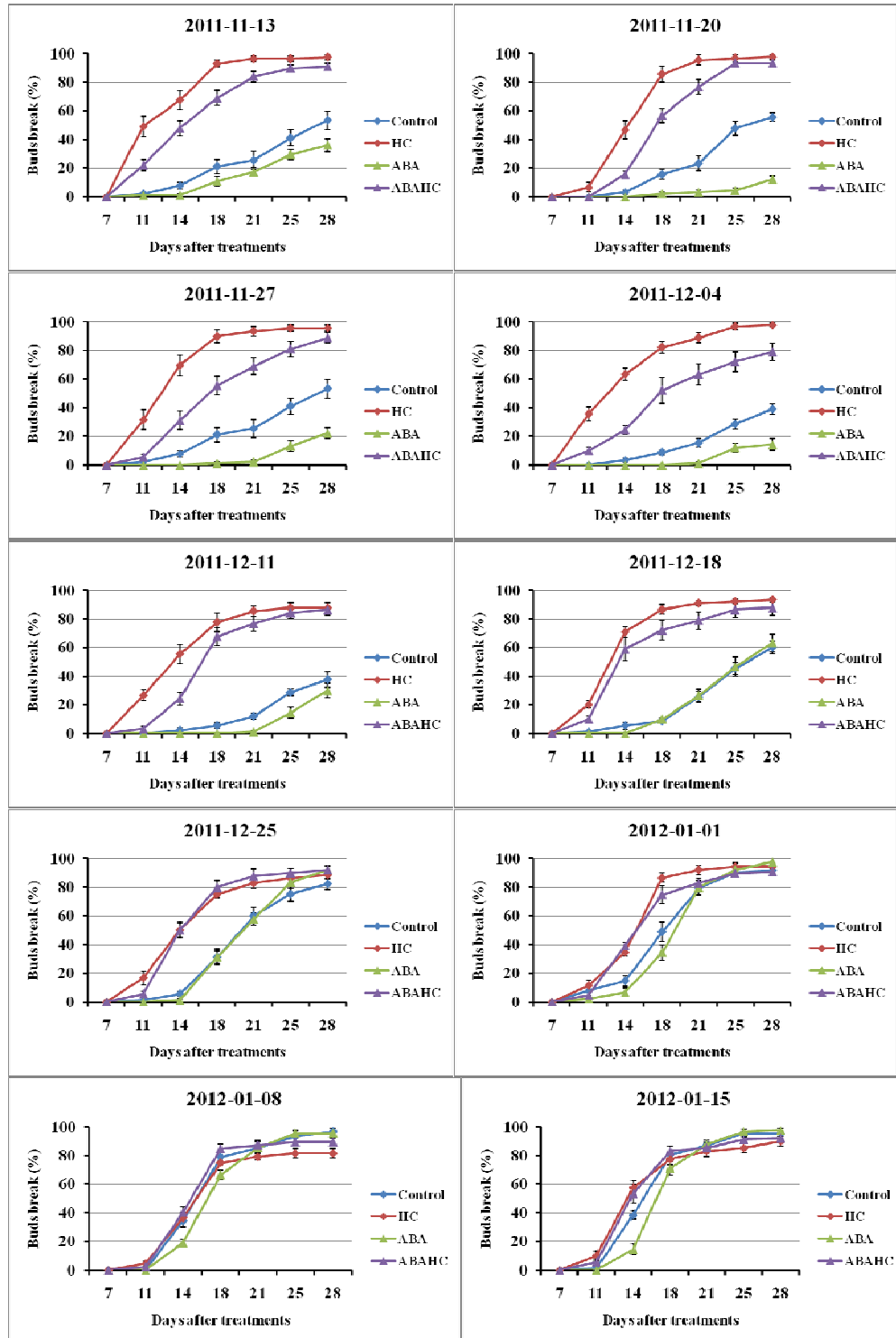


Fig. 2: ABA attenuates the enhancing effect of HC. (A-H) Canes were sampled weekly and four groups of cuttings (each comprising 9 subgroups of 10) were prepared - two were used for 100 μ M ABA treatments (see Fig. 1A) and two as controls. After 48h, during transfer from ABA to tap water, HC was applied (3%) to one ABA-treated and one control group, while the other two groups were treated with 0.02% Triton.

שתי קבוצות פקעים שהו בתמיסת ABA (100uM), או מים, למשך 48 שעות. לאחר מכן חולקו הפקעים מטופלי ABA לשתי תת קבוצות, האחת טופלה בטריטון וסומנה כקבוצת ABA והשניה טופלה ב-HC וסומנה כ-ABAHC. הפקעים שטופלו במים ב-48 השעות הראשונות חולקו וטופלו באופן דומה ליצירת קבוצות בקורת ו-HC. בתמונה 2 מובאת התנהגות הפקעים בכל אחד ממועדי הדגימה במשך 28 ימים ממועד הטיפול. בתמונה 3A מובאת עקומת התרדמה העונתית על בסיס אחוזי ההתעוררות של פקעי הבקורת כפי שנמדדה לאחר 21 ימים ממועד הטיפול. בחפיפה מוצג גם ההפרש באחוזי ההתעוררות בין (1) פקעים שטופלו ב-HC ופקעי בקורת, (2) פקעים שטופלו ב-ABA ופקעי הבקורת (3) פקעים שטופלו ב-HC ופקעים מטיפול ABAHC. בפנל הימני בתמונה 3 מוצג מידע דומה לזה שהוצג בתמונה 3A אך מייצג את ההפרש הממוצע באחוזי התעוררות על פני כל נקודות הזמן הנמדדות עד 28 יום ולא רק ב-21 יום כפי שמוצג בפנל השמאלי.

מן הנתונים עולה כי (1) בשליש הראשון של דצמבר הגיעה תרדמת הפקעים לשיא עומקה, (2) HC ממריץ שבירת תרדמה והשפעתו גוברת עם העלייה בעומק התרדמה ופוחתת החל מהשליש השני של דצמבר עם העלייה בכושר ההתעוררות הטבעי של הפקעים. התמונה אף מתחדדת כאשר מחשבים את ההפרש הממוצע בנקודות המדידה השונות לאורך 28 ימים מטיפול עבור כל דגימת פקעים כמוראה בפנל הימני בתמונה 3 ונראה כי שיא השפעתו היחסית של HC הוא ב-11 לדצמבר, מועד התרדמה המקסימלית, (3) השפעתו המעכבת של ABA בולטת עד למועד שבו עומק התרדמה מקסימלי ומתבטלת עם העלייה בכושר ההתעוררות הטבעי של הפקעים, (4) ההשפעה המעכבת של ABA על ההשפעה הממריצה של HC לאורך מעגל התרדמה דומה בדגם ובדרגת העיכוב להשפעה המעכבת של ABA על הבקורת. יחד עם זאת ניתן לראות כי טיפול HC מאפשר לפקעים להתגבר על האפקט המעכב של ABA ומועד ההתאוששות נדחה עם המעבר מתרדמה קלה לעמוקה, ממצא שחזר על עצמו בשתי עונות הבחינה.

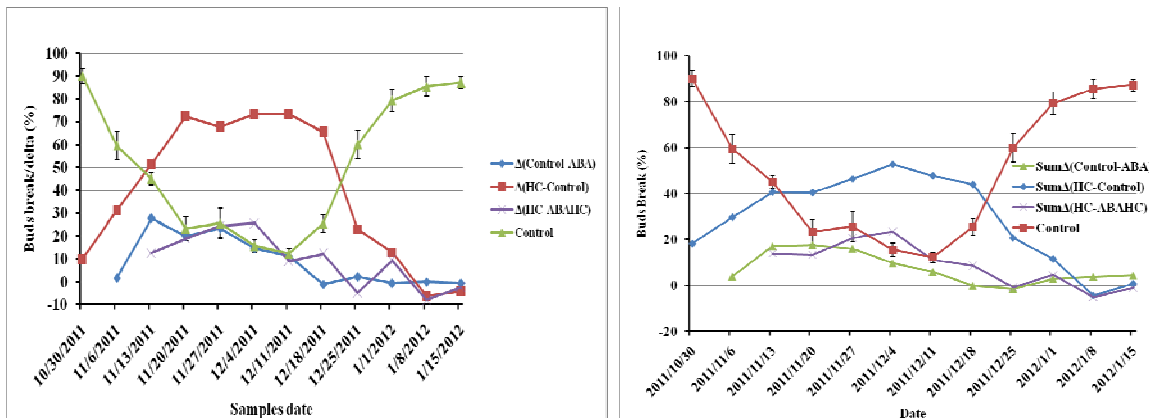


Fig. 3 Changes in net effect of ABA along the dormancy cycle. To create a dormancy curve (here indicated as control) plant material was sampled weekly. Nine groups of 10 single-node cuttings were placed in tap water and bud break was monitored. Other details are described in Fig. 2. The bud break percentages after 21d were used to present the dormancy status at the vineyard at time of bud sampling. The net effect of HC was calculated by subtracting averaged values of % bud break at Control treatment from that calculated for HC treatment; The net effect of ABA on buds was calculated as described above using data of Control and ABA treatments; The net effect ABA on HC treated buds of the effect of ABAHC was calculated as described using data of ABAHC and HC treatments. In the left panel averaged bud break was calculated using measurements at 21d only. In the right panel averaged bud break was calculated using the averages of all time point monitored.

את הירידה בהשפעתו המעכבת של ABA ניתן אולי לייחס לרוויה ברמת ABA אנדוגני בשיא התרדמה ו/או עלייה ביכולת הפרוק של ABA בפקע. על פי הגיון זה, בשלבים מוקדמים של מעגל התרדמה, כאשר רמת ABA נמוכה מתחת לסף מסויים שגורם לעיכוב התעוררות, תוספת ABA עשויה להיות בעלת משמעות גדולה יותר. מאוחר יותר, כאשר רמת ABA אנדוגני עולה, אולי אל מעל לסף הנדרש לעיכוב, תוספת ABA חיצונית היא לא בעלת אפקט תוספתי משמעותי על רמת התרדמה. לחלופין או במשולב, עלייה ביכולת פרוק ABA בתגובה לטיפול HC או עם התחלת

ההתעוררות הטבעית יכולה להגביל ו/או לבטל את השפעת ה-ABA האקסוגני ולהתניע תהליכי התעוררות שקודם לכן נחסמו על ידי ABA.

השפעת ABA אקסוגני על ההשפעה הממריצה של שוברי תרדמה נוספים על קצב ההתעוררות של פקעי גפן
 באופן דומה למתואר עבור HC נבחנה השפעת ABA אקסוגני על ההשפעה הממריצה של שוברי התרדמה נוספים על קצב ההתעוררות של פקעי גפן. נמצא כי דגם ההתנהגות של פקעים בטיפול משולב של ABA עם אזיד (AZ), שוק חום (HS) ותנאי היפוקסיה דומה מאוד לזה שתואר מעל עבור HC.

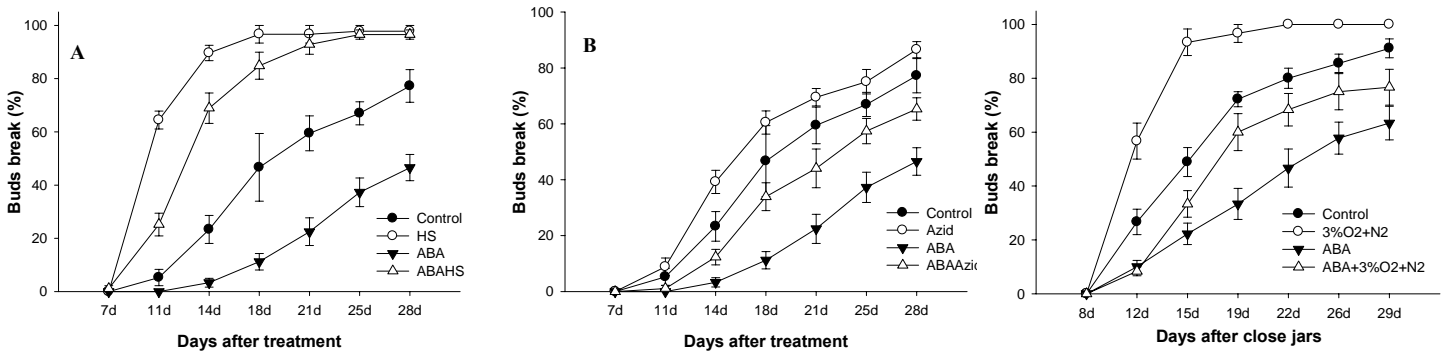


Fig. 4: The effect of ABA on the enhancing effect of various dormancy release stimuli.

(A) The effect of ABA on the enhancing effect of HS on dormancy release. ABA and Control treatments were conducted as described in Fig 2. HS treatment was conducted with buds that were first incubated in 0.02% Trion solution for 48h. Cuttings were immersed in 50°C water for 1 h as described in Halaly et al., 2008 and then transferred to tap water. ABAHS treatment was carried similarly using cuttings that were incubated in ABA solution for 48h prior to HS treatment.

(B) The effect of ABA on the enhancing effect of AZ on dormancy release. ABA and Control treatments were conducted as described in Fig.1. Azid and ABAAzid treatments were conducted as HC and ABAHC treatment, using 2% sodium azid instead of HC.

(C) The effect of ABA on the enhancing effect of hypoxia on dormancy release. Control and 3%O₂ treatments were treated as described above for the first 48h, then transferred to closed jars (0.75 liter) for 48h (for each treatment 3 jars with 30 cuttings). In 3%O₂ treatment, O₂ was reduced to 3% by nitrogen flow through the jar prior to sealing. O₂ level was monitored by oxygen & carbon dioxide analyzer. ABA and ABA+3%O₂ treatments were conducted similarly with cuttings that were incubated in ABA solution 48h prior to transfer to the jars.

השפעת טיפול ב-HC על רמת ABA ותוצרי פירוקו בפקע

השפעת הטיפול ב-HC על רמת ABA ותוצרי דגרדציה של ABA נבחנה בשיתוף פעולה עם מעבדתו של פרופ' קמיה ביוקוהמה, יפן. פקעים נדגמו לאחר 12, 24, 48, 96 ימים ממועד מתן HC ומבקורת מקבילה. נאספו שלוש קבוצות פקעים בכל אחד מהשלבם כשלוש חזרות ביולוגיות. פקעים מחזרה אחת מוצו במתנול-חומצה אצטית ונשלחו ליפן על מנת להתאים את הסטנדרטים הפנימיים לטווח הריכוזים. על פי תוצאות האנליזה הראשונית הורכבה תערובת סטנדרטים פנימיים שהוכנסה בשלב המיצוי של שלושת החזרות הביולוגיות. בהתאם להנחת המוצא נמצא כי רמת ABA יורדת לאחר טיפול HC ואילו רמת תוצרי הפרוק של ABA עולה. שינוי מובהק נמצא בפקעים שנדגמו לאחר 48

שעות (תמונה 5) ו- 96 שעות. על בסיס התוצאות מועלית ההשערה כי מסלול הפרוק דרך Neo Phaseic acid (NeoPA) הוא בעל משקל רב יותר מהמסלול המקביל שבו נוצרת Dehydro Phaseic acid (DPA) דרך שלב ביניים מהיר שבו מיוצר PA.

על מנת לבחון את ההשערה כי עלייה ביכולת פרוק עם התחלת ההתעוררות הטבעית יכולה להגביל ו/או לבטל את השפעת ה-ABA האקסוגני ולהתניע תהליכי התעוררות שקודם לכן נחסמו על ידי ABA נמדדה רמת תוצרי דגרדציה

שלו ABA לאורך מעגל התרדמה הטבעי ונראתה עליה בולטת ברמתם תחילת דצמבר (תמונה 6), נקודת מעבר בין שיא התרדמה להתחלת שלבי ההתעוררות (ראה עקומת תרדמה בתמונה 3).

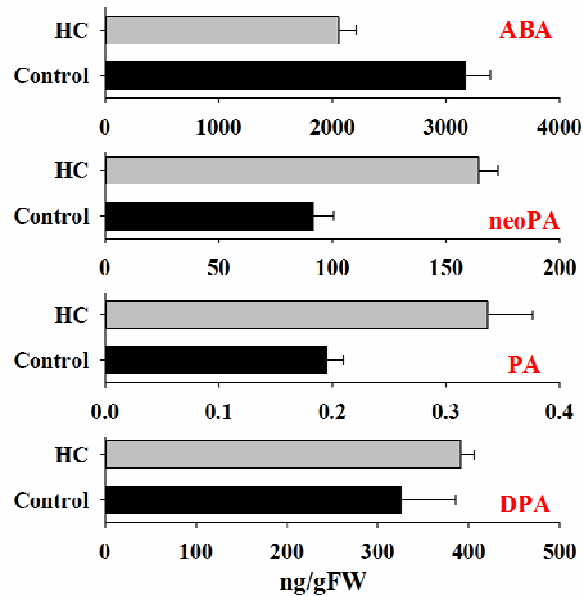


Fig 5: Effect of HC on levels of ABA and its degradation products. HC-treated and Control buds of cv. Early Sweet were sampled at 12, 24, 48 and 96h after treatment and used for analysis of endogenous ABA and its catabolites. The analysis was carried out in Prof. Yuji Kamiya lab in Riken, Yokohama, Japan. ABA was extracted from 0.5 g bud tissue. Frozen samples were ground in liquid nitrogen and extracted overnight with 10 ml methanol:acetic acid solution. Reverse-phase and ion-exchange chromatography were used for sample purification. High Performance Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry (HPLC-MS) analysis was then performed. Levels at 48h are shown.

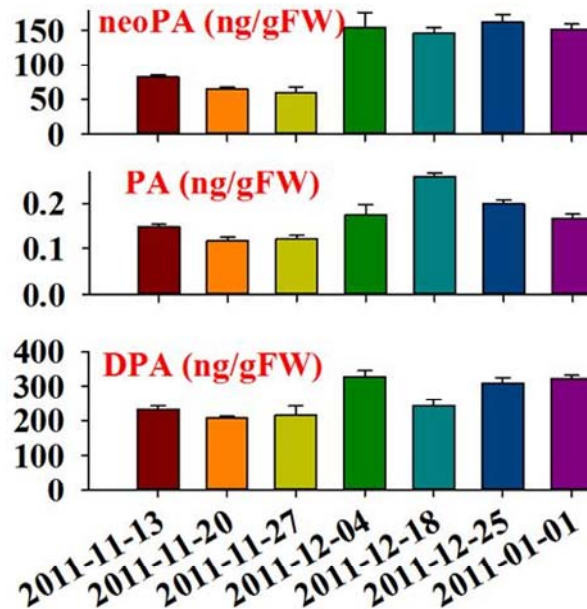


Fig. 6: Levels of ABA degradation products throughout the dormancy cycle. Buds were sampled weekly from field grown grapevines and used for analysis of PA, DPA and neoPA levels as detailed above.

השפעה של טיפולים שוברי תרדמה על ביטויים של גנים מרכזיים בבקרת המטבוליזם של ABA

משפחות הגנים המקדדות ל-NCED ו-ABA8ox נבחרו לייצג מגמות שינוי בתהליך הביוסינתזה ותהליך הפרוק של ABA בהשפעת טיפולים שוברי תרדמה, והגן היחיד המקדד ל XERICO בגנום הגפן נבחר על מנת לבחון אינטראקציה של מטבוליזם ABA עם מטבוליזם של GA. מדובר בבקרים ראשוניים של תהליכי סינתזה ופירוק במערכות מודל מאופיינות והרחבה בנושא הכוללת הנמקה של הבחירה המתוארת הובאה בתכנית המחקר.

משפחות הגנים של NCED ו-ABA8ox אופיינו תוך שימוש במאגר הנתונים של גנום הגפן. אנליזה מקיפה ויסודית העלתה כי קיימים חמישה גנים המקדדים ל-ABA8ox ושלושה גנים המקדדים ל-NCED. תוכנו פריימרים ייחודיים לכל גן במשפחה על מנת להבדיל בין הגנים ונבחן ביטויים של כל בני המשפחה בפקעים באמצעות qRT-PCR. אנליזות אלו הראו כי שניים מתוך שלושת בני משפחת NCED ו-2 מבני משפחת ABA8ox מתבטאים בפקע גפן בוגרים.

מזמורות שהובאו מכרם מהזן early sweet בתחנת הנסיונות בגלגל הוכנו ייחורים חד פרקיים שטופלו ב-3% ציאנמיד, ומים כמפורט בתמונה 2 ומדגמי פקעים הוקפאו לאחר 12, 24, 48, 96 שעות מהטיפול. השפעת הטיפול על רמת הביטוי של בני כל משפחה המתבטאים בפקע נבחנה בהשוואה לטיפול בקורת, ונמצא כי טיפול ב-HC הוביל לירידה מובהקת ברמת התעתיקים של VvNCED3 ו-VvXerico (תמונה 7).

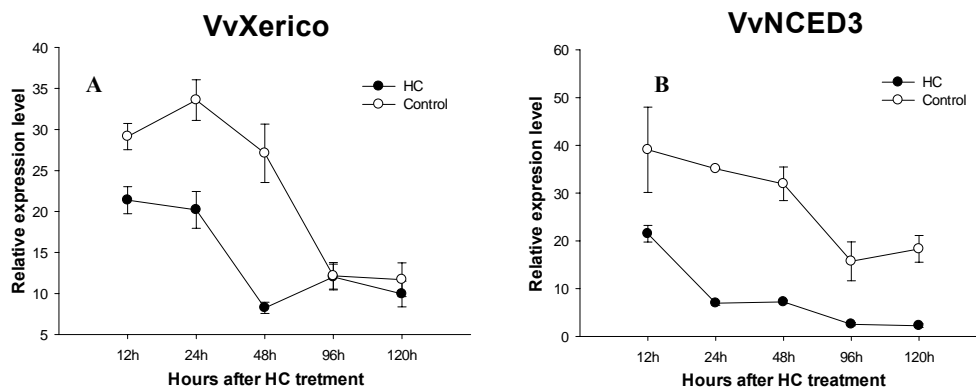


Fig. 7: The effect of HC on the transcript levels of VvXerico and VvNCED3. Total RNA was extracted from HC-treated buds. The relative expression levels of each gene were determined by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and normalized against *VvActin*. The values represent the mean \pm s.e. of two biological repeats with two technical repeats each. *VvXerico* and *VvNCED3* relative expression profiles at 12 to 120h after HC treatment are presented and compared with Control.

עוד נמצא כי הטיפול ב-HC גורם לעליה מובהקת ברמת התעתיקים של שני בני משפחת VvABA8OX, בהשוואה לבקורת (תמונה 8).

בפקעים שנדגמו בכרם במועדים שונים, ושימשו לשני נסיונות בלתי תלויים, רמת התעתיק של VvABA8OX1 בפקעים שטופלו ב-HC גבוהה מזו שבפקעי הבקורת ביממה הראשונה שלאחר הטיפול ובהמשך היא דומה לזו של פקעי הבקורת. מעניין לציין כי המגמה הכללית של ירידה בביטוי הגן לאורך התקופה הנבחנת קיימת גם בבקורת. מאחר שגם פקעי הבקורת מתעוררים בסופו של דבר וההבדל הוא באחידות ובקצב יכול להיות כי לגן יש תפקיד זהה גם בפקעי הבקורת וכי עצם פעולת הזמירה מפעילה את מפל הארועים המוביל לשינוי. במקרה כזה, הטיפול ב-HC מייצר גירוי חזק יותר שגורם להגברה יחסית של הסיגנל המוביל לעלייה בביטוי מהגן.

רמת התעתיק של VvABA8OX3, הומולוג נוסף מהמשפחה, עלתה באופן מאוד בולט בזמני בהשפעת טיפול HC וזאת בניגוד מוחלט להתנהגות הגן בפקעי הבקורת שלא השתנתה כלל בתקופה הנבחנת. על בסיס תוצאות אלו מועלית ההשערה כי לגן זה תפקיד משמעותי בפרוק ABA תלוי-HC בפקע. העובדה שרמתו עלתה גם בתגובה לטיפול בשוברי תרדמה אחרים-אזיד וחום- עשויה לחזק את ההנחה בדבר תפקיד במסלול הארועים המוביל לשחרור מתרדמה.

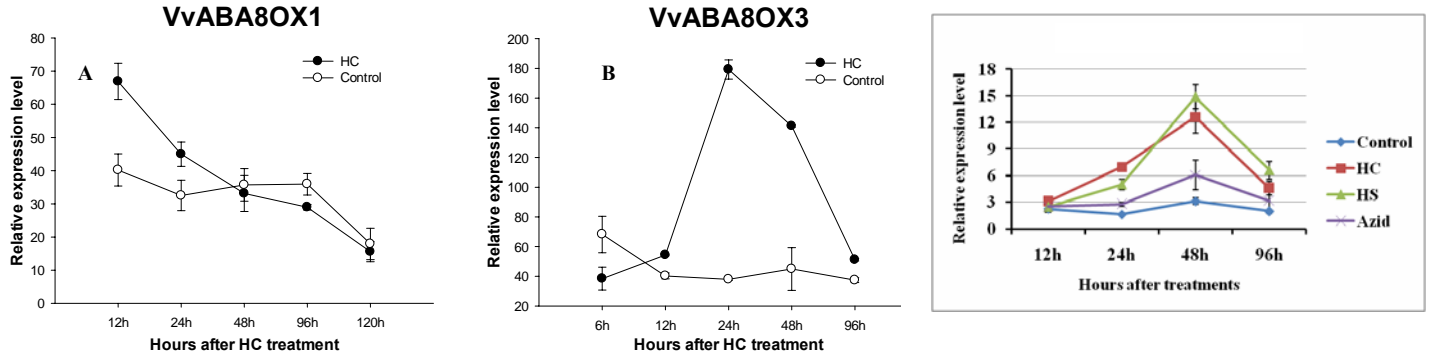


Fig.8: The effect of HC on the transcript levels of VvABA8OX1 and VvABA8OX3. Analyses were conducted as described in Fig. 7. VvABA8OX1 (A) and VvABA8OX3 (B) relative expression profiles at 12 h after HC treatment are presented and compared with Control. (C) comparative analysis of the effect of HC, Azid and heat shock on the transcript levels of VvABA8OX3 was conducted. HS treatment was conducted with buds that were first incubated in 0.02% Trion solution for 48h. Cuttings were immersed in 50°C water for 1 h as described in Halaly et al., 2008. Azid treatment was conducted as HC treatment, using 2% sodium azid instead of HC. The relative expression levels of each gene were determined as detailed in fig. 7.

התוצאות המתוארות חזרו על עצמן באנליזות עם פקעים שנדגמו בכרם במועדים שונים ושנים שונות ושימשו לנסיונות בלתי תלויים (נתונים לא מובאים). ככלל, הירידה ברמת הביטוי של VvNCED3 תומכת בהנחה כי הטיפול מדכא ביוסינתזה של ABA ונמצאת בהתאמה עם הירידה ברמת ABA בתגובה לטיפול HC. העלייה המובהקת ברמת התעתיק של VvABA8OX3 תומכת בהנחה כי לון זה תפקיד משמעותי באינאקטיבציה תלויית HC של ABA בפקע שנתמכת על ידי העלייה ברמת תוצרי דגרדציה של ABA בתגובה ל-HC.

שינויים בביטויים של גנים מרכזיים בבקרת המטבוליזם של ABA במשך מעגל התרדמה

כדי לבחון את ההשערה כי שינוי מבוקר שעתוק במטבוליזם של ABA עשוי להיות מעורב גם בתהליכי תרדמה והתעוררות טבעיים נבחנה רמת תעתיקי הגנים המקדדים לבקרי סינתזה ופרוק של ABA **במשך מעגל התרדמה**. מאחר שטיפול ב-HC הוביל לירידה מובהקת ברמת התעתיקים של VvNCED3 ולעלייה מובהקת ברמתו של VvABA8OX3 הם נבחרו מתוך כלל בני המשפחה להמשך עבודה.

בתמונה 9 ניתן לראות כי בתחילת מעגל התרדמה יש עלייה בביטוי NCED והרמה יורדת משיא התרדמה ואילך. באופן הופכי, ובהתאמה להנחה, רמת הביטוי של VvABA8OX3 עד לנקודת התרדמה המקסימלית נמוכה והיא עולה מנקודה זו ולקראת ההתעוררות הטבעית של הפקעים.

מסגרות הקריאה של VvNCED3 ו-VvABA8OX3 בודדו בריאקציות PCR ושובטו ל- GATEWAY based entry vectors. על מנת לבחון השפעה אפשרית של שינויים במטבוליזם של ABA על מעגל התרדמה הועברו מסגרות הקריאה ל- destination vector שמאפשר ביטוי מוגבר תחת פרומוטור S35. נערכה טרנספורמציה לתרביות גפן אמבריוגניות, התקבלו צמחונים והם נמצאים בשלבי גדילה. על מנת לבחון את רמת שני האנזימים נבנו קונסטרוקטים לביטוי חלבון, יוצרו חלבונים סינטטיים והם ישלחו לייצור נוגדנים ייחודיים.

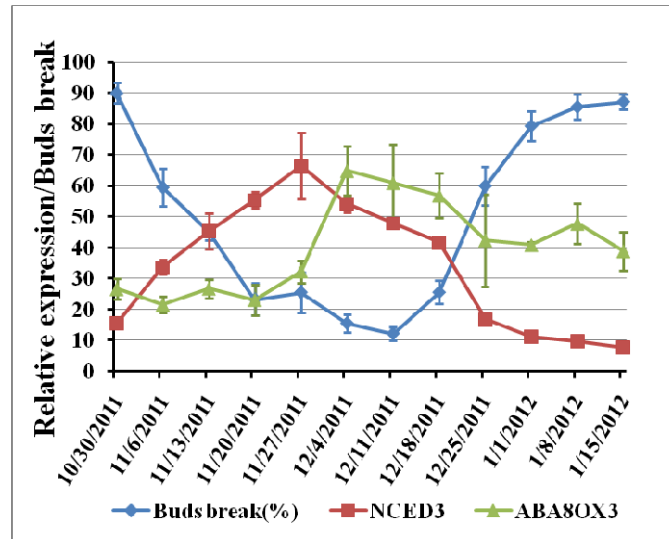


Fig 9: Expression profile of VvNCED3 and VvABA8ox3 throughout the dormancy cycle. Details are as described in Fig 4. Total RNA was extracted from frozen buds sampled weekly as described above. The relative expression levels of each gene were determined by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and normalized against *VvActin*. The values represent the mean \pm s.e. of two biological repeats with two technical repeats each.

שינויים בביטויים של מרכיבים מרכזיים במערכת העברת סיגנל ה-ABA בעקבות גרוי לשבירת תרדמה

העדויות שהובאו עד כה מהוות תמיכה במעורבות ABA בתהליך התרדמה וההתעוררות ומעורבות של רגולציה של מטבוליזם של ABA ב"ניהול" מעגל התרדמה. בהמשך עלתה השאלה אם מתקיימים שינויים בביטויים של מרכיבים מרכזיים במערכת העברת סיגנל ה-ABA בעקבות גרוי לשבירת תרדמה. לשם כך אופיינו משפחות הרצפטורים ל-ABA ופוספטאזות מסוג PP2C המעורבות בהעברת סיגנל בגפן. בהמשך זוהו בני המשפחה המתבטאים בפקעים בוגרים ונבחנה השפעת טיפול בציאנמיד חומצי על ביטויים. אפיון המשפחות בגפן והוכחת הפונקציה הביולוגית שלהם פורסמה לאחרונה בשני מאמרים ממעבדתו של גיורא בן ארי במחלקה לעצ"פ במכון וולקני (שהראשון שבהם בשת"פ עם מעבדתנו) ולא יובאו כאן נתונים נוספים. בתמונה 10 מובא פרופיל הביטוי של הרצפטורים שנבחן בפקעים שנדגמו בשתי עונות שונות. בתמונה 11 מובא דגם ביטויים של שני גנים המקדדים לפוספטאזות מסוג PP2C שהוכחו כבעלות פונקציה בהעברת סיגנל ABA ומתבטאות בפקעי גפן.

ככלל ניתן לקבוע כי חל שינוי מובהק בביטוי החלק הארי של הגנים המוצגים בעקבות הטיפול ב-HC. ביטוי רב הרצפטורים מוגבר בתגובה ל-HC ויכול להעיד אולי על היזון חוזר שלילי בעקבות ירידה ברמת ABA, בדומה לרגולציה של הרצפטורים לגיברלין. ממצא זה תומך בהנחה כי HC מעודד ירידה ברמת ABA, המגובה בממצאים נוספים שהוצגו. ראוייה לתשומת לב העובדה כי *VvPYL6* מתנהג באופן הופכי ורמת ביטוי יורדת בעקבות הטיפול ב-HC. מהותו של ההבדל תחייב התייחסות ולא תידון כאן. ביטוי הגנים לשתי הפוספטאזות ירד בתגובה לטיפול ב-HC. במערכות אחרות נמצא כי עליה ברמת ABA מובילה לעליה ברמת הפוספטאזות ומיחס ישר זה ניתן לגזור כי ירידה ברמת ABA תהיה כרוכה בירידה ברמת הפוספטאזות. מכאן ניתן להניח כי HC הוביל לירידה ברמת הביטוי של הפוספטאזות באמצעות הורדת רמת ABA. בהמשך נבחן את דגם הביטוי של גנים מייצגים מקבוצות אלו במהלך עקומת התרדמה הטבעית.

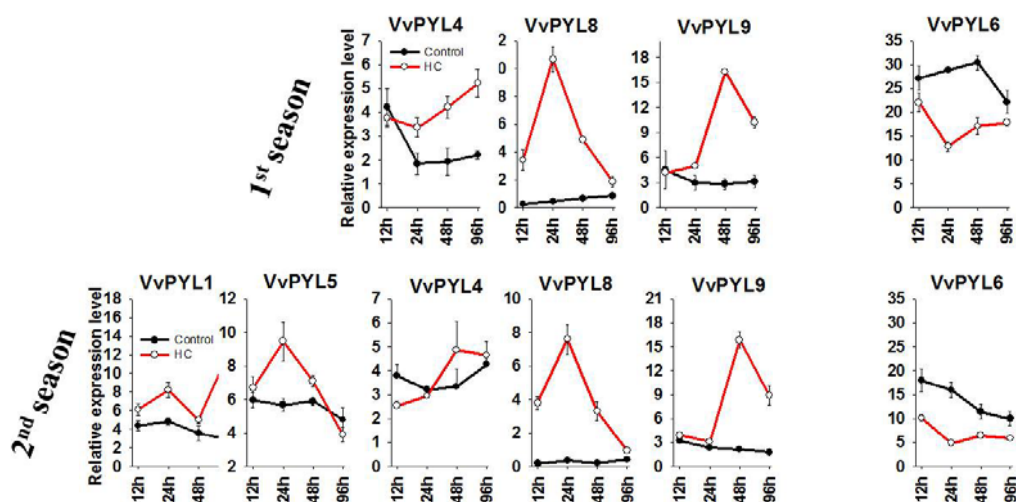


Fig. 10: The effect of HC on the transcript levels of the bud-expressed ABA receptors. Analyses were conducted as described in Fig. 7.

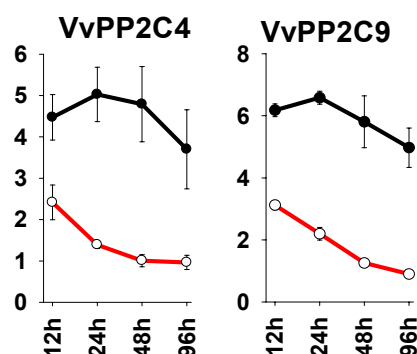


Fig. 11: The effect of HC on the transcript levels of bud-expressed PP2C phosphatases that are involved in ABA signaling. Analyses were conducted as described in Fig. 7.

עיכוב סיגנל אתילן מוביל לעיכוב פירוק ABA

על מנת לבחון את ההנחה כי סיגנל האתילן מעורב בשפעול פרוק ABA נערך כימות של ABA בפקעים מטופלי HC בנוכחות ובהעדר NBD שהוא מעכב מעבר סיגנל אתילן שהוכחנו בעבר כי הוא מעכב שבירת תרדמה תלויית C. האנליזה נערכה בפקעים שנדגמו יומיים לאחר הטיפול (תמונה 12). מן התוצאות התברר כי רמת ABA בנוכחות NBD גבוהה יותר ורמת neoPA נמוכה יותר באופן מובהק. ממצא זה מחזק את השערת המודל לפיה חסימת העברת סיגנל אתילן משבשת אינדוקציה של פרוק ABA.

טיפול ב-GA גרם לעיכוב מוחלט של התעוררות פקעים בניגוד להנחת המודל

על פי הנחת המודל, בתחתית מפל הארועים מתאפשרת עליה ברמת GA הנדרשת לעידוד התארכות תאים וחלוקה. כדי לבחון אם התרדמה היא תוצאה של מחסור ב-GA ומתן GA אקסוגני מיתר את כל מסלול הארועים טופלו ייחורים חד פרקיים ב-GA אקסוגני בדומה לטיפולים ב-HC. באופן מפתיע נמצא כי טיפול ב-GA3 גרם לעיכוב מוחלט של התעוררות פקעים והתוצאה היתה דומה בקשת של ריכוזים כולל טיפול בריכוז נמוך של 1 ח"מ. באופן מעניין נמצא לאחרונה כי GA3 מעכב התעוררות ומעודד נקרוזה בפקעי צפצפה ואילו GA4 מעודד התעוררות (Rinne et al., 2011, Plant Cell). כדי לסתור הנחה כי GA3 מייצג מצב לא טבעי של חומר שאינו עובר מטבוליזם נורמלי נבחנה גם

השפעת GA4+7 והתוצאה היתה דומה כמוצג בתמונה 13, פאנל שמאלי. ככלל, פקעים שטופלו ב-GA לא התעוררו ובסופו של דבר עברו נקרזה כמוראה בתמונה 13, פנל אמצעי.

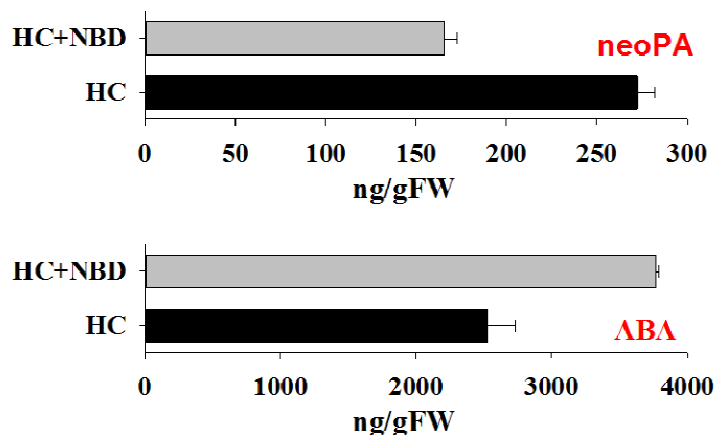


Fig. 12 : Inhibition of ethylene signaling limit the effect of HC on endogenous ABA level. Cuttings were treated with HC and placed in glass jars, with and without NBD, as detailed by Ophir et al., 2009. After 48h, buds were collected and used for hormonal profiling as described in Fig. 4.

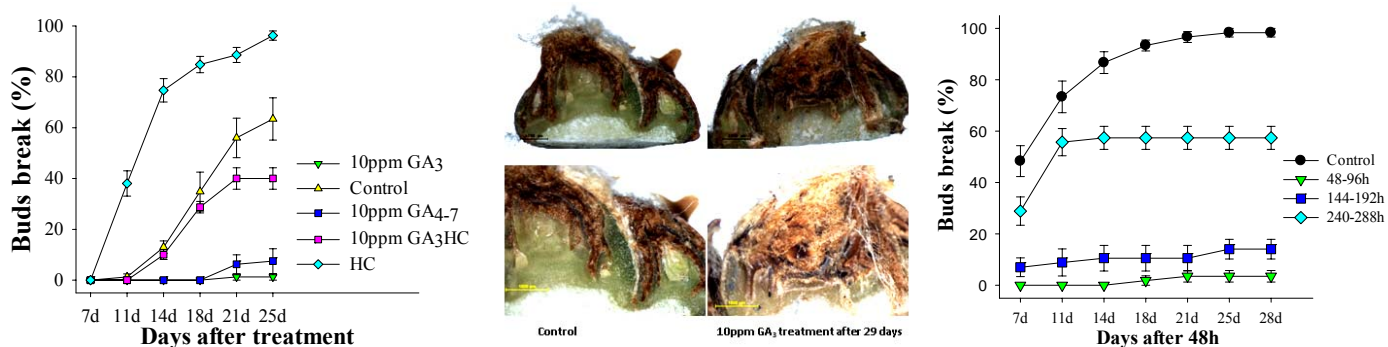


Fig. 13: The effect of GA on bud break. Left panel: Cuttings were shortly dipped in 10 ppm GA solutions with 0.02% Triton and then transferred to tap water. All other procedures are as described in Fig. 2. HC and GA₃HC treatments were applied similar to HC and ABAHC treatments, as described in Fig. 2, with 10 ppm GA instead of ABA solutions; central panel Stereoscope analysis of GA₃ treated buds; Right panel The procedures carried after GA₃ treatment are as described above but treatments were incubated in GA₃ at different time windows from cutting preparation.

מאחר ששילוב של GA₃ עם HC הקטין את מידת העיכוב הועלתה ההנחה שמתן GA לייחור רדום שרמת ABA בו עדיין גבוהה אינו מאפשר את פעולתו. יתרה מכך, מתן GA בשלב זה עשוי לגרום לתגובת היזון שתמנע ירידה ברמת ABA. הקטנת מידת העיכוב על ידי HC עשויה לשמש כתמיכה בהנחה זו.

כדי לבחון אפשרות שטיפול GA מעכב ירידה ברמת ABA והשוותה רמת ABA בפקעים מטופלי GA ופקעי בקורת ונמצא כי אכן פקעים שטופלו ב-GA הציגו רמה גבוהה יותר של ABA, בהשוואה לבקורת ולטיפול HC (תמונה 14). באופן מעניין תועד ממצא דומה בפקעי תפ"א רדומים (Suttle, 2008). השוואת רמות הביטוי של VvNCED3 ו-VvABA8OX3 הראתה כי בפקעים מטופלי GA רמת VvNCED3 גבוהה יותר ורמת VvABA8OX3 נמוכה יותר מהרמה שנמדדה בפקעי הבקורת ותומכת באפשרות של תגובת היזון שמעודדת סינתזת ABA.

הועלתה גם ההנחה שמתן GA בשלב מאוחר יותר, כאשר התקיים כבר פרוק של חלק מה-ABA (שמתקיים בסופו של דבר גם בייחורי בקורת) לא יעכב התעוררות ואולי אף ישפר אותה. בפועל ניתן לראות בפנל הימני בתמונה 13 כי ככל שהטיפול ב-GA מתאחר השפעתו המעכבת קטנה (מצויין חלון השעות שבו נערך הטיפול בהתייחס למועד הצבת הייחור בתנאים תומכי התעוררות).

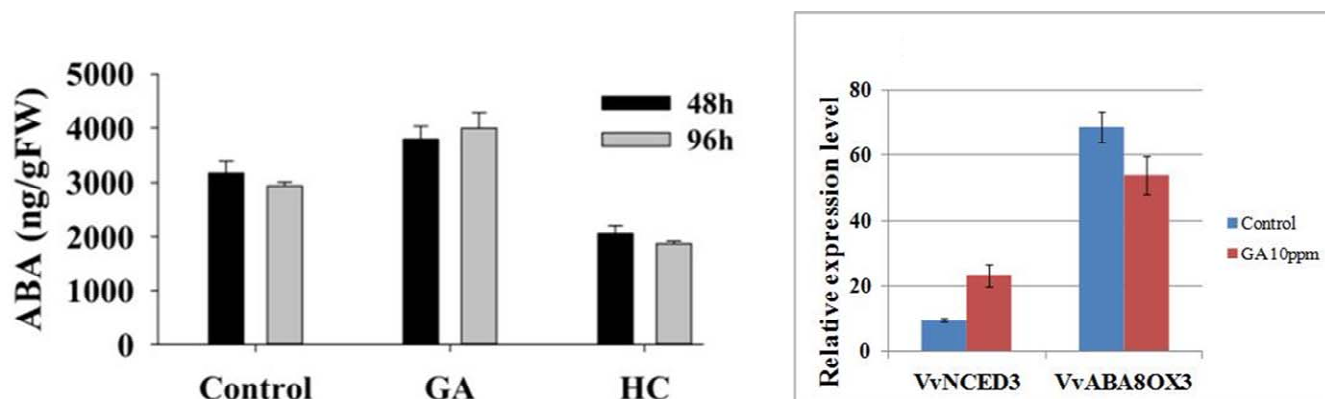


Fig 14: The effect of GA on ABA level and on the transcript levels of ABA metabolism regulators in grape buds. See Fig 4, 7 and 13 for experimental details.

בשיתוף פעולה עם עמיתים מאיטליה אופיינו משפחות של בקרי סינתזה ופרוק של GA ואומתה פעילותם אולם נוכח התוצאות עוכבה בשלב הנוכחי התכנית לבחינת השפעת טיפולים בשוברי תרדמה על מטבוליזם של GA עד לברור הסיבה לתוצאה שעומדת בסתירה להנחת המודל לאורה הוצעו הנסיונות.

רמת ציטוקינינים עולה בתגובה לטיפול בציאנמיד חומצי וציטוקינינים סינטטיים עודדו התעוררות

מתוך הנחה שהירידה ברמת ABA היא חלק משינוי נרחב יותר במערך ההורמונלי שגורם להסרת העיכוב מחד ולעידוד צמיחה מאידך, ועל בסיס התגובה המפתיעה ל-GA, הועלתה אפשרות שבשלב הראשוני (שבו מתרחש תהליך להסרת עיכוב המושרה ע"י ABA וחלה הנעה ראשונית של תהליכי צימוח), מעורב בקר צמיחה חיובי שאינו GA ביחסי גומלין הופכיים עם ABA, וזאת בשונה מהמוכר בזרעים שבהם מקובל לחשוב על GA בתפקיד זה. הנחה זו אינה סותרת קיום תפקיד ל-GA בשלבים מאוחרים יותר של עידוד צמיחה ובהתאמה יישום מאוחר של GA, כשבועיים לאחר הסרת העיכוב ע"י HC, לא גרם לעיכוב התעוררות.

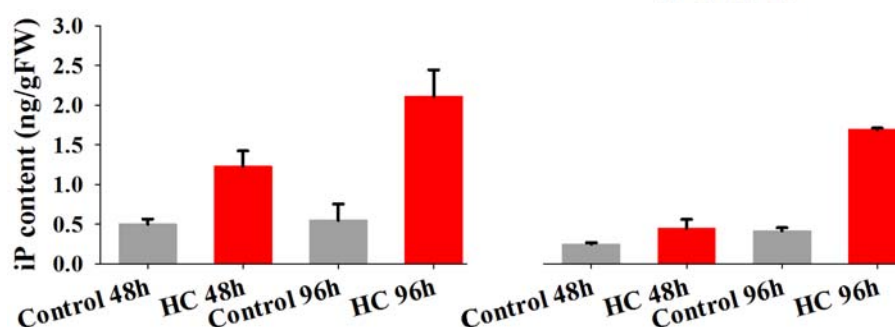


Fig. 15: Concentration of endogenous Iso pentenyl adenine (IP) in HC-treated and control buds. See details in Fig. 5. Data represent two independent experiments from 2 different seasons.

מדידה של רמתם של מספר הורמונים נוספים חשפה ממצא בולט לפיו בצד עלייה ברמת הפרוק של ABA בפקעי גפן (בתגובה ל-HC וגם עם תחילת תהליכי ההתעוררות הטבעיים) ישנה עלייה מובהקת ברמות ציטוקינינים פעילים (תמונה 15). הממצא המתואר לגבי פקעי גפן תואר גם בפקעי תפ"א שהשפעת ציטוקינין במהלך שחרור מתרדמה נלמדה בהם (Suttle, 1998, 2000,) (2001, 2008). באופן מעניין, נסיון ראשוני לבחינת השפעתם של CPPU ו-TDZ, ציטוקינינים סינטטיים, על התעוררותם של גפנים שלמות בכרם מסחרי הראה שיפור מובהק ובולט באחוזי ההתעוררות בהשוואה לבקורת (תמונה 16).

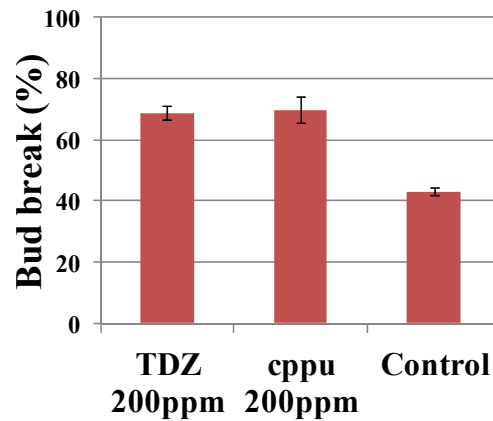


Fig. 16: Preliminary test of the potential of CPPU and TDZ, synthetic cytokinins, to enhance bud break in the vineyard. 200 ppm of CPPU and 200 ppm of TDZ were sprayed on dormant canes of cv. Early sweet in a commercial vineyard in Petachia, in parallel to 0.025% triton control. Vines were pruned prior to treatment. Nine vines were used for each treatment and each served as a repeat. Bars represent SD.

מטרות המחקר לתקופת הדו"ח

על מנת לבחון את תקפות המודל שהוצע לתאור מסלול הארועים המוביל להתעוררות מטרות המחקר העיקרית היתה לבחון בדרכים שונות את ההנחה כי ABA הוא בקר שלילי של התעוררות פקעים. בנוסף הוצע לברר אפשרות קיום קשר בין סיגנל אתילן למטבוליזם של ABA ולבחון את האפשרות ש- GA הוא בקר חיובי של התעוררות פקעים.

עיקרי ההתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח:

טיפול ב-ABA אקסוגני דחה התעוררות פקעים בדגם תלוי ריכוז ותלוי משך טיפול, בהשוואה לביקורת). הוראה גם כי ABA הפחית את השפעתו הממריצה של HC והממצאים הציעו כי דרגת ההשפעה תלויה בסטטוס התרדמה של הפקעים. יחד עם זאת, טיפול HC מאפשר לפקעים להתגבר על האפקט המעכב של ABA ומועד ההתאוששות נדחה עם המעבר מתרדמה קלה לעמוקה. אינטראקציה דומה נמצאה בין ABA לשוברי תרדמה נוספים. ממצאים אלו הובילו להנחה כי HC משפיע על מטבוליזם של ABA. בהתאמה, HC הוביל לירידה בביטויים של בקרי סינתזת ABA ולעלייה בביטויים של בקרי פירוק, ותמונה דומה נמצאה במעקב אחר פקעים שנדגמו בכרם במהלך מעגל התרדמה הטבעי). טיפול ב- HC הוביל לירידה מובהקת ברמת ABA בפקעים ולעלייה מובהקת ברמת תוצרי הפרוק. גם כאן נמצאה תמונה דומה במהלך מעגל התרדמה הטבעי. בהתאמה להנחות המודל, מעכב סיגנל אתילן עיכב פרוק ABA על ידי HC. להפתעתנו, טיפול במגוון מולקולות GA בריכוזים שונים פעל באופן הפוך למצופה על פי הנחת המודל, והוביל לעיכוב חמור בהתעוררות פקעים. באופן מעניין מצאנו כי טיפול GA לווה בעיכוב פרוק ABA. לעומת זאת, בצד עלייה ברמת הפרוק של ABA בפקעי גפן, בתגובה ל- HC וגם עם תחילת תהליכי ההתעוררות הטבעיים, נמצאה עלייה מובהקת ברמות ציטוקינינים פעילים ונסיון ראשוני הראה שציטוקינינים סינטטיים מעודדים התעוררות גפנים בתנאי כרם.

המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו:

התוצאות שהוצגו תומכות בהנחת המודל לפיה ABA מעורב בשימור מצב התרדמה ובעיכוב התעוררות. התקדמות לאורך מעגל התרדמה ויישום שוברי תרדמה אחרים מעודדים שינויים במטבוליזם של ABA שעיקרם עיכוב סינתזת ABA ועידוד פרוקו באופן המוביל להסרת עיכוב ולעידוד התפתחות המריסטמה. דגם הביטוי של בקרי סינתזה ופירוק עשוי להצביע על רגולציה משותפת שמהותה עקרונית להבנת תהליך התרדמה. הממצאים תומכים בהנחה לגבי בקרה של רמת ABA על ידי סיגנל אתילן ושוללים את ההנחה שטיפול GA אקסוגני ייתר את מסלול הארועים המסיר את העיכוב. על בסיס התוצאות נראה שכדאי למקד את רב המאמץ המחקרי בעת הנוכחית בברור אתרי המטרה של ABA בפקע כדי להבין את משמעות העיכוב. בנוסף ראוי לבחון לעומק את האינטראקציה הפוטנציאלית בין ABA לציטוקינין שעולה מתוצאות ראשוניות

הבעיות שנותרו לפתרון והתייחסות המשך המחקר לגביהן.

על בסיס התוצאות ראוי לאשש את הממצא לגבי השתנות רמת בקרי הסינתזה והפרוק ברמת החלבון באמצעות נוגדנים כנגד חלבון מנוקה. רצוי לבצע אנליזה ביואינפורמטית של רצפי הפרומוטורים של הגנים המקדדים כדי לנסות לשפוך אור על מהות הרגולציה. יש לבחון בכלים טרנסגניים את השפעת המודולציה של ביטוי הגנים הללו על התנהגות הפקעים ונסיונות בכיוון זה התחילו. כדאי להשתמש בכלים גנומיים להשוואת פקעים מטופלי ABA לפקעי בקורת כדי לאתר גורמים במורד הזרם המעוכבים על ידי ABA. לשמחתנו אושרה לנו תכנית קמ"ח שתאפשר את המשך המחקר כמוצע.

האם כבר הוחל בהפצת הידע?

לא.

פרסום הדו"ח: חסוי עד לפרסום.