

חקר שינויים מולקולריים והורמונאליים החלים בעת יצירת רקמת ניתוק במנגו, לשיפור עתיד
של היבול על ידי הפחתת נשירת חנטים.

**Molecular and hormonal analyses of abscission zone in developing mango fruitlet,
for future optimization of crop yield**

מוגש לקרן המדע הראשי במשרד החקלאות

ע"י

ורד יריחמוביץ: המחלקה למטעים מינהל המחקר החקלאי בית דגן
יובל כהן: המחלקה למטעים מינהל המחקר החקלאי בית דגן.
טלי צבירן: המחלקה למטעים מינהל המחקר החקלאי בית דגן.
מזל איש שלום: המחלקה למטעים מינהל המחקר החקלאי בית דגן
אדולפו לוין: מו"פ צפון.

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

Yuval Cohen: Horticulture Department. The Institute of Plant Sciences –ARO
Bet Dagan 50250 E-mail: vhyuvalc@volcani.agri.gov.il

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

Mazal Ish Shalom: Horticulture Department. The Institute of Plant Sciences –ARO
Bet Dagan 50250 E-mail: mazali@volcani.agri.gov.il

Adolfo Levin: Migal – Galilee Technology Center, P.O. Box 831, Kiryat Shemona 11016,
Israel. adolfolevin@gmail.com

פברואר 2017

אדר א' תשע"ז

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים כן/לא

חתימת החוקר

הצגת הבעיה: נשירת חנטים במנגו מלווה בירידה בטרנספורט פולרי של אוקסין מהחנט אל עבר רקמת הניתוק (ר"נ). ירידה זו מגבירה את רגישות הרקמה לאתילן ובכך משפיעה על תהליך הנשירה. צמצום נשירת חנטים עשוי להוות גישה יעילה לשיפור הפוריות. **מטרת המחקר:** במחקר זה הצענו **א.** לבצע אפיון מקיף של שינויים מולקולריים והורמונאליים החלים בעת נשירת חנטים במנגו, תוך התמקדות בבחינת דגם הביטוי של גנים הקשורים בסינטזת חישת והעברת סיגנל האוקסין ו/או המבוקרים ע"י אוקסין. **ב.** לאפיין את השפעת אוקסין על שינויים אלו. **ג.** לבחון יישום טיפול טריפטופאן (ו/או אוקסינים סינטטים) במטע, לשיפור היבול במנגו. **שיטות עבודה ותוצאות.** **מחקר בסיסי:** השתמשנו בפלטרמת Fluidigm™ dynamic array לבחינת ביטוי 38 גנים הקשורים למסלולי העברת חישת ויצירת אוקסין ברקמת הציפה ורקמת ניתוק (ר"נ) של חנטים שטופלו באתרל, בהשוואה לתנאי ביקורת. הרחבנו את הבדיקות ע"י שימוש באנליזות RT-PCR. הנתונים שהתקבלו מצביעים על תפקידים האפשרי של מספר גנים נבחנים בהורדת רמת האוקסין החופשי בר"נ והעלאת יחס IAA: IAA-Asp, בעת יצירת ר"נ במנגו. נראה כי ירידה ברמת האוקסין החופשי, בציפה ובאזור רקמת הניתוק, גוררת אפקטים נלווים המשרים ירידה כללית בביטוי גנים שבד"כ מגיבים באופן חיובי לאוקסין. בשנת המחקר השלישית ביצענו ניסויים במערכת ענפונים נושאי חנטים בהם בוצעו טיפולים מקדימים בטרפטופאן ובאוקסין סינטטי (2,4,D), לפני השראת תהליכי ניתוק. טיפול מקדים ב 2,4,D צמצם בצורה מובהקת את נשירת החנטים וגרר שינוי בתבנית ביטויים של גנים הקשורים לאוקסין. משמעות התוצאות הללו נידונה בדו"ח. **מחקר יישומי** בוצעו ניסויים לבחינת השפעות טיפולי טריפטופן ואוקסין סינטטי (Alco citrus fix) על רמת נשירת חנטים בעצים המצויים במצב שפע ושפל. טיפולי האוקסין הפחיתו באופן מובהק את עוצמת נשירת חנטים, בעוד שלטיפול הטרפטופן לא הייתה השפעה מובהקת על מניעת תהליכי נשירה. מדדי היבול הראו בהתאם כי בטיפול האוקסין התקבלו יותר פירות לעץ, בהשוואה לביקורת, אך הפירות היו קטנים יותר בממוצע. כיול מועדי הריסוס, וריכוזי האוקסין עדין נדרש למציאת פרוטוקול אפקטיבי שיוביל לצמצום נשירת חנטים ולהגדלת היבול הכללי.

1. מבוא ותיאור הבעיה (Mangifera indica) המנגו הוא פרי טרופי ממשפחת האלתיים ומוצאו מאזור הודו ודרום מזרח

אסיה. המנגו מוגבל בהתאמתו לאזורים חמים יחסית בהם אירועי קרה אינם נפוצים. בעבר גידול משמעותי של מנגו התרחש בערבה, בנגב המערבי ובשרון אולם בשנים האחרונות גידולו מרוכז באזור סובב כנרת ועמק בית שאן. היקף הענף כ-20,000 דונמים והייצור הממוצע של המנגו בישראל עומד על 40,000 טון בשנה, כמחצית מכמות זו מיועדת לייצוא (כהן, 2013). אחד הגורמים המשפיעים על כמות היבול במנגו היא נשירת חנטים. במנגו מתרחשים תהליכי נשירה במהלך כל תקופת התפתחות הפרי, אולם נשירת חנטים מרובה במיוחד המתרחשת בשלבים מוקדמים לאחר ההפריה, הינה גורם מרכזי המשפיע על הקטנת כמות היבול. בארץ תופעה זו מהווה בעיקר בעיה חקלאית במיוחד בזנים בעלי יבול ממוצע ונמוך כמו 'קנט' ('Kent') ו'מאיה' ('Maya'). אומדנים במנגו מורים כי 90% מכלל הפירות החונטים נושרים, לכן, צמצום נשירת חנטים באחוזים בודדים בלבד, עשוי להשפיע באופן משמעותי על כמות היבול (Nunez-Elisea and Davenport 1986; Singh and Agrez 2002; Singh et al. 2005).

במהלך תהליך נשירת חנטים נוצרת בין העוקץ לחנט רקמת ניתוק (ר"נ). ברקמה זו, עולה פעילות אנזימי פירוק דופן התא, הגורמים לריכוך למלת הביניים, להפרדת תאים ולהתנתקות החנט (Bonghi and Ramina 2000; Roberts et al. 2001; Taylor and Whitelaw 2002). תהליך הניתוק מבוקר ע"י הורמונים שונים, הפועלים לעיתים באופן אנטגוניסטי. לדוגמה, ידוע כי בעוד אתילן משרה את תהליך ההתנתקות, אוקסין מעכב תהליך זה. בהתאם לכך ניתן לבקר את תהליכי הנשירה על ידי יישום טכנולוגיות אגרוטכניות הכוללות שימוש בהורמונים צמחיים ו/או חומרים המורזים או מעכבים ביוסינטזה של הורמונים שונים. המודל הכללי, המקובל כיום, טוען כי כל עוד נמשך מעבר תקין של אוקסין מרקמות איברים מתפתחים, כגון עלים צעירים או זרעי פירות, אל עבר אזור ר"נ, נמנע תהליך הניתוק. ירידה בייצור האוקסין בחנט המתפתח או הסרת האיבר המייצר אוקסין, מובילים להגברת הרגישות לאתילן באזור ר"נ ולאתחול תהליכי ניתוק (Woodward and Bartel 2005). המנגנון המוביל להגברת רגישות אזור ר"נ לאתילן אינו ברור דיו, אולם, עבודת איפיון מולקולריות שנעשו בעיקר בעגבנייה ובתפוח מורות כי תהליך יצירת ר"נ מלווה, בין היתר בעליית ביטוי גנים הקשורים לסינטזת וחישת סיגנל האתילן מחד, ובשינוי מערך ביטוי הגנים המעורבים בחישת והעברת סיגנל האוקסין (ו/או מבוקרים ע"י ידו), מאידך (Botton et al. 2011; Meir et al. 2010).

בשנים האחרונות נערכו מספר ניסיונות במטרה לצמצם את תופעת נשירת החנטים במנגו על ידי ריסוס באוקסינים, במעכבי אתילן שונים ובפולימינים, אולם למיטב ידיעתנו עדין לא נמצא פתרון יעיל במידה מספקת לבעיה חקלאית זו. מאידך, הידע הקיים במנגו לגבי התהליכים המולקולריים המתרחשים במהלך הנשירה בר"נ ובחנט, אשר עשוי לתרום להבנת הבעיה, מצומצם ביותר. זאת, לעומת מידע רב הקיים לגבי התהליכים הללו בעצי פרי אחרים. במחקר קודם שערכנו התמקדנו בלימוד השינויים המתרחשים בעת נשירת חנטים במנגו, הקשורים במסלול החישה והיצירה של אתילן, והדגמנו את חשיבותם בהשראת תהליכי ניתוק (Ish-Shalom et al., 2011). בנוסף, מצאנו שטיפול בטריפטופאן (חומצת

אמינו המשמשת כפרקורסור במסלול סינטזת אוקסין), מנע במידה מסוימת נשירת חנטים אשר הושרתה ע"י אתרל. תוצאותינו הצביעו על אפשרות ליישום טיפולי טריפטופאן ו/או אוקסינים סינטטים להורדת הנשירה ולהגברת היבול במטעים. העבודה שביצענו בעבר שפכה אמנם אור על חלק מהמנגנונים המולקולריים המבקרים נשירת חנטים במנגו, אולם היא היוותה רק נדבך ראשון במחקר.

1.1 מסלולי יצירת והעברת סיגנל האוקסין: אוקסין משחק תפקיד מרכזי בבקרת חלוקות תאים והתארכותם וכמו כן מעורב בבקרת תהליכי נשירה (Bangerth, 2000). שני נתיבים עיקריים מוצעים כיום ליצירת אוקסין בתאי הצמח, מסלולים המנצלים טריפטופאן ומסלולים שאינם מנצלים טריפטופאן. בשנים האחרונות דווח שמבין המסלולים המוצעים ליצירת אוקסין מטרפטופאן, מסלול Indole-3-Pyruvic Acid (IPA) הינו המסלול המשחק את התפקיד המרכזי בצמחים. במסלול זה פועלים אנזימים ממשפחות ה-Tryptophan Aminotransferase of *Arabidopsis* 1/Tryptophan Aminotransferase Related (TAA1/TARs) ואנזימים ממשפחת ה-Flavin monooxygenases (המכונים YUCCAs). בארבידופסיס, מקודדים אנזימים אלו ע"י שתי משפחות גנים קטנות המונות חמישה ואחד-עשר גנים, בהתאמה (Mashiguchi et al., 2011; Stepanova et al., 2011; Wang et al., 2015). ככלל סינטזת אוקסין במסלול תלוי, או בלתי תלוי, טריפטופאן מלווה ביצירה תצמידי אוקסין עם חומצות אמינו, סוכרים ומתיל אסטרים (IAA conjugates). האנזמים הפעילים ביצירת תצמידים אלו מקודדים ע"י גנים ממשפחת GH3. בעיקרון כאשר פעילותם עולה, יורד ריכוז האוקסין החופשי, הפעיל. עד כה זוהו מספר תצמידי אוקסינים שונים. בפרט, תצמיד IAA-Ala, IAA-Leu, IAA-Phe זהו כתצמיד "שימור ומיחזור אוקסין", מהם ניתן ל"מחזור" בחזרה אוקסין לאחר פירוק הידרוליטי. בעוד, תצמיד IAA-Asp ו-IAA-Glu זהו כתצמידים קטבולים שמטרת יצירתם הינה סילוק אוקסין מהמערכת, שכן הם אינם עוברים פירוק הידרוליטי (Ludwig-Muller et al., 2011).

שחרור האוקסין מתצמידיו מאפשר את העברתו לרקמות מטרה שונות. מעבר זה תלוי בין היתר בפעילות חלבונים נשאי אוקסין, המכונים Aux/LAXs (AUXIN1/LIKE-AUX1 influx carriers) ו-PINs (Auxin efflux carriers). מרבית הנציגים ממשפחת חלבונים אלו הינם חלבונים ממברנלים הממוקמים בממברנת הפלסמה בכיוונית מסוימת ולכן הם מסוגלים לבקר מעבר אוקסין חד כיווני אל עבר רקמת המטרה (Krecek et al. 2009). לאחר הגעת האוקסין החופשי לרקמת מטרה מסוימת, חישת והעברת סיגנל האוקסין תלויים בשני סוגים רצפטורים: (Auxin binding protein) ABP1 ו-TIR1/AFB (Transport Inhibitor 1/Auxin signaling F-Box). בעוד הידע אודות מנגנון הפעילות של רצפטור ABP1 מוגבל, קיים ידע רחב לגבי אופן פעילות חלבוני TIR1/AFB (Abel and Theologis 2010; Shishova and). Lindberg. 2010). באופן תמציתי, גנים המגיבים לאוקסין נחלקים לשתי קבוצות: גנים המגיבים מוקדם ואלו המגיבים מאוחר. בין קבוצות הגנים המגיבים מוקדם נמנים גנים השייכים למשפחות GH3, SAUR ו-Aux/IAA המכילים באיזור

הפרומוטור שלהם אתר קישור לבקרי שעתוק הקרויים ARFs (Auxin Response Factors). בריכוז אוקסין נמוך, חלבוני Aux/IAA יוצרים תצמיד עם ARF ומונעים את שעתוקם של הגנים המגיבים לאוקסין. לעומת זאת, עלייה ברמת האוקסין, מובילה לקישור האוקסין לרצפטור TIR1/AFB, להפעלת שרשרת אירועים המובילה להרס חלבוני Aux/IAA, לשחרור חלבון ה-ARF ולעלייה בביטוי גנים המבוקרים ע"י אוקסין (Chapman and Estelle 2009).

2. מטרת המחקר הצורך בהעלאת היבול, הינו אחד מהיעדים המרכזיים בענף המגו. צמצום נשירת חנטים יכולה להוות גישה יעילה לשיפור הפוריות. מספר מחקרים נערכו עד כה, בארץ ובעולם, כדי לנסות לפתור בעיה חקלאית זו, אולם עד כה לא פותחו פרוטוקולים יעילים במידה מספקת. מאידך, הידע אודות התהליכים המולקולריים המבקרים את תהליך הניתוק ונשירת החנטים במגו, אשר עשוי לתרום להבנת הבעיה, הינו מועט. בהתאם, מחקר זה הציע א. איפיון מקיף של שינויים מולקולריים והורמונאליים החלים בעת נשירת חנטים במגו, תוך התמקדות בבחינת דגם הביטוי של גנים הקשורים בחישה ובהעברת סיגנל האוקסין ו/או המבוקרים ע"י אוקסין. ב. אפיון השפעת טיפולי טריפטופאן (ו/או אוקסין) על שינויים אלו. ג. בחינת יישום טיפול טריפטופאן להפחתת נשירת החנטים ולשיפור היבול במגו במטע

3.1. תוצאות מחקר בסיסי ודיון חלק זה של המחקר בוצע ורוכז בשנתיים הראשונות של המחקר ע"י דר' יוליה דניסוב ובשנה השלישית של המחקר ע"י שני גליק-סטודנטית למסטר בהנחיית ד"ר יובל כהן וד"ר ורד יריחימוביץ. בשנת המחקר הראשונה, ביצענו ניסויים במערכת ענפונים נושאי חנטים מנותקים בהם בוצעו טיפולים משרי נשירה ע"י שימוש באתרל. במהלך שנת המחקר הראשונה והשנייה השתמשנו בחומר הצמחי שנדגם מניסויים אלו לבדיקת דגם ביטויים של גנים הקשורים לאוקסין, ולכימות רמות האוקסין ותצמידיו. בשנת המחקר השלישית ביצענו ניסויים נוספים במערכת ענפונים נושאי חנטים מנותקים בהם בוצעו טיפולים מקדימים באוקסין סינטטי (2,4,D), ובטריפטופאן לפני השראת תהליכי ניתוק ע"י אתרל והשתמשנו בחומר צמחי שנדגם מניסויים אל לבחינת דגם ביטויים של גנים הקשורים לאוקסין. בשל המגבלות המצוינות בדרישות לכתיבת דו"ח זה ע"י לשכת המדען, מוצגות בדו"ח תוצאות מייצגות בלבד. שאר התוצאות מוצגות בדו"חות קודמים וחלקן לא מוצגות

3.1.1 אנליזת ביטוי תוך שימוש בפלספורמת Fluidigm כמצויין לעיל, בשנה המחקר הראשונה ביצענו ניסוי במערכת ענפונים מנותקים נושאי חנטים והשריית תהליכי ניתוק בוצעה ע"י ריסוס באתרל (Ethephon). בניסוי זה טיפול האתרל החל להשרות תהליכי ניתוק לאחר כ-24 ש', ולאחר 72 שעות נצפו 94% אחוזי נשירה. במקביל, בתנאי הביקורת, נשירת החנטים עד 72 ש' לאחר הטיפול הייתה נמוכה ($>10\%$), אולם כעבור פרק זמן ארוך יותר נצפתה נשירה של כ-40% מסך החנטים. (ראה נספח א'). רני"א שהופק מהרקמות שנדגמו בניסוי זה, שימש לאנליזות ביטוי. דגם ביטויים של 38 גנים המקודדים לחלבונים הקשורים בחישה והעברת סיגנל האוקסין, ושל 3 Ethylene-related genes, ניבדק במעבדת שירות במכון וויצמן במכשיר Fluidigm. התוצאות שהתקבלו מאנליזת ה-Fluidigm, עובדו תוך כדי התמקדות בשינויים החלים ברני"א (AZ) וברקמת הפרי (Pericarp) (ראה תמונה 1). עיבוד הנתונים הורה כי בהתבסס על דפוסי קינטיקת ביטוי

דומים שהתקבלו ברקמת הפרי ובר"נ, בתנאי ביקורת וטיפול, ניתן היה לחלק את הגנים הנבדקים לחמש עד שש קבוצות שונות (A-F). בהתאם, גנים שרמת ביטויים ירדה באופן זמני או רציף, בעקבות הטיפול בהשוואה לביקורת, שויכו לקבוצות A, B או C. לעומת זאת, קבוצות D ו-E הועשרו בעיקר בגנים שרמת ביטויים הוגברה באופן זמני או רציף, לאחר טיפול בהשוואה לקבוצת ביקורת. לבסוף, קבוצת F-AZ הכילה שני גנים אשר הראו דפוסי ביטוי כמעט זהים בתנאי ביקורת וטיפול. מערך התוצאות שהתקבל הדגים אם כן כי לאחר 4-18 ש' טיפול, התרחשו שינויים משמעותיים ברמות הצטברותם של גנים מסוימים הן בר"נ וברקמת החנט. לעומת זאת, קבוצות A, B או C. לעומת זאת, קבוצות D ו-E הועשרו בעיקר בגנים שרמת ביטויים הוגברה באופן זמני או רציף, לאחר טיפול בהשוואה לקבוצת ביקורת. לבסוף, קבוצת F-AZ הכילה שני גנים אשר הראו דפוסי ביטוי כמעט זהים בתנאי ביקורת וטיפול. מערך התוצאות שהתקבל הדגים אם כן כי לאחר 4-18 ש' טיפול, התרחשו שינויים משמעותיים ברמות הצטברותם של גנים מסוימים הן בר"נ וברקמת החנט.

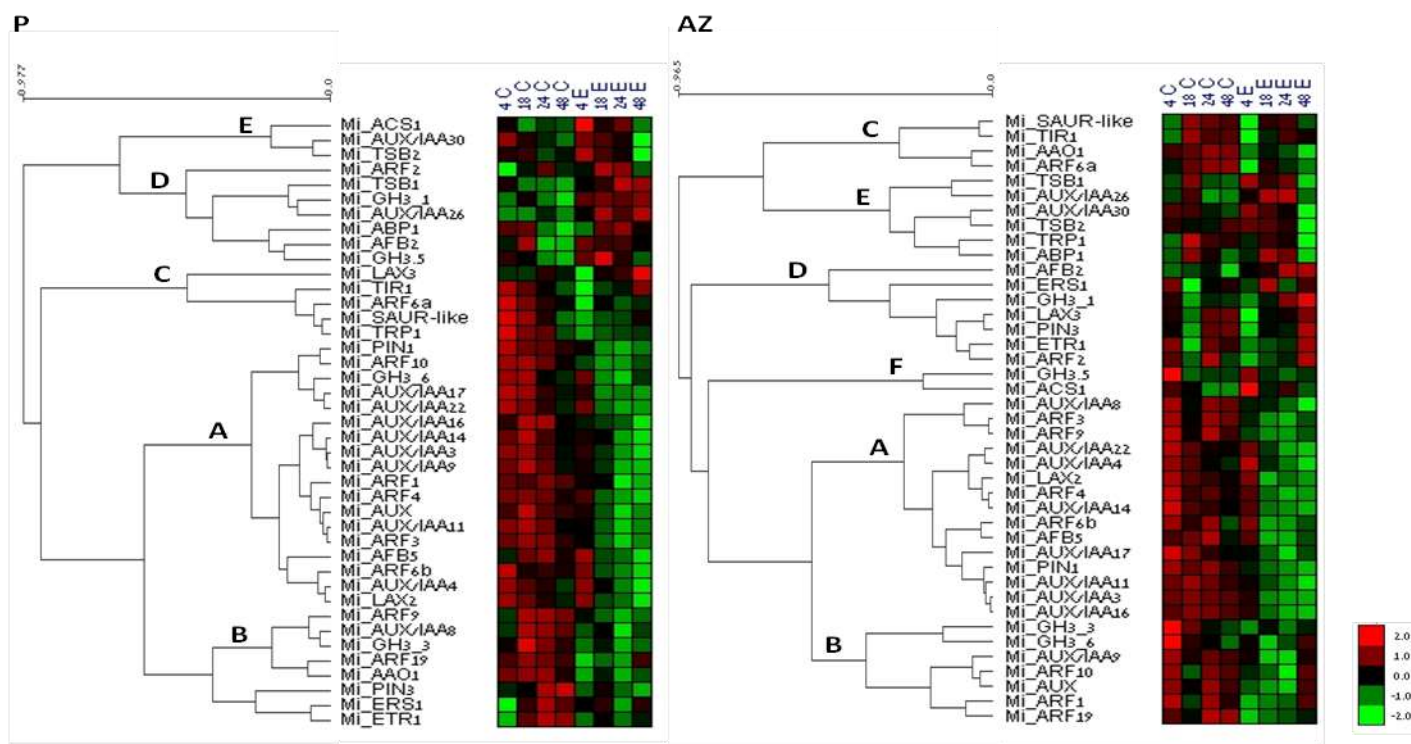


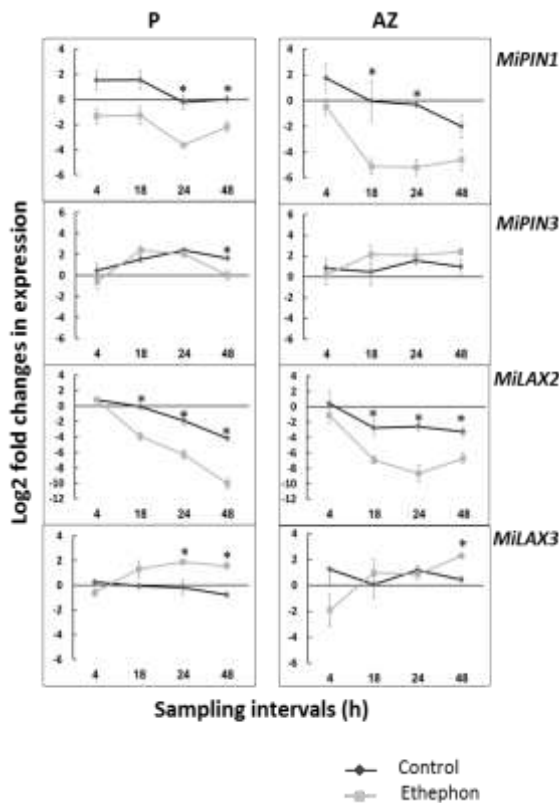
Fig. 1. Expression analysis of auxin- and ethylene-related genes in control and ethephon-treated mango fruitlet tissues. Fruitlet tissues collected from control and ethephon-treated explants at 0, 4, 18, 24 and 48 h were pooled. cDNA from two biological replicates with two technical replicates, for each tissue, group and time point, were subjected to expression analysis. Relative gene expression was calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method, with averaged crossing points normalized to the endogenous reference gene *MiEF1a* (detector normalization), and to gene-expression level at time 0 (sample normalization). Data were log transformed and mean values of 41 genes were calculated. Hierarchical clustering and heat map of gene expression were performed using Expander 7.1 software (<http://acgt.cs.tau.ac.il/expander/>). Rows relate to genes, and columns represent sampling time points for control (C) and ethephon-treated (E), pericarp (P, left) and abscission zone (AZ, right) tissues. Clusters of genes with similar expression patterns are indicated by letters. Color bar: red indicates enhanced expression, green indicates decreased expression.

3.1.2 ולידצית והרחבת תוצאות אנליזת ה-Fluidigm ע"י qRT-PCR מכיוון שאנליזות ה-Fluidigm כללה שימוש ב-2

חזרות ביולוגיות, ביצענו בהמשך אנליזות qRT-PCR פרטניות עבור גנים מסוימים המשויכים למשפחות שונות, תוך

שימוש בחומר צמחי מ-3 חזרות ביולוגיות בניסוי שבוצע באביב 2014. באופן כללי מצאנו כי תוצאות הביטוי שהתקבלו

באנליזת הפלואידיגם תאמו לתוצאות שהתקבלו בבדיקות qRT-PCR



(לא מוצג).

Fig. 2. Expression analysis of IAA-carrier genes. qRT-PCR was performed with cDNA prepared from total RNA extracted from control and ethephon-treated tissues collected at different time points. Gene expression was calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method, with averaged crossing points normalized to the endogenous reference gene *MEF1a* (detector normalization), and to gene-expression level at time 0 (sample normalization). Log2-transformed data for a given gene are expressed as fold change in expression relative to its expression at time 0. Data are means $\pm$ SE of three independent biological replicates. Asterisks denote a significant difference between ethephon-treated and control tissue samples at each sampling point ($P < 0.05$). P – pericarp tissue, AZ – abscission zone. Sampling intervals are presented as hours from initial setting.

תוצאות qRT-PCR לבחינת דגם ביטויים של מספר גנים המקודים

לנשאי אוקסין מוצגת באיור 2. התוצאות הדגימו כי בציפה (P), רמת

הצטברות תעתיקי *MiPIN1* ו-*MiLAX2* ירדה בפרק הזמן הנבחן הן

בתנאי ביקורת והן לאחר טיפול האתרל, למרות זאת טיפול האתרל גרר ירידה מובהקת ברמת תעתיקים אלו כבר לאחר 18-24 ש'. באופן דומה רמת ביטוי *MiPIN3* אשר עלתה במקצת בתחילת פרק הזמן הנבחן הן בתנאי ביקורת וטיפול, ירדה במקצת לאחר 48 ש' טיפול בהשוואה לביקורת. דגם ביטוי שונה לעומת זאת נצפה עבור *MiLAX3*, במקרה זה, נצפתה עלייה מסוימת ברמתו בעקבות הטיפול. במקביל, בחינת הצטברות הגנים המקודדים לנשאי אוקסין בר"נ (AZ), הראתה דגם ביטוי דומה לזה שנצפה בציפה עבור *MiPIN1* ו-*MiLAX2*, יחד עם זאת, רמת ביטוי *MiPIN3* לא הראתה שונות מהותית בין תנאי ביקורת לטיפול.

ירידה ברמת ביטוי גנים המקודדים לנשאי אוקסין עשויה להעיד כי חלה פגיעה בתהליך תקין של העברת אוקסין מרקמת החנט אל עבר אזור ר"נ ו/או בר"נ עצמה. מאחר וידוע כי מצב זה עשוי לגרור לירידה ברמת האוקסין החופשי ולהשפיע על רמת ביטויים של גנים המגיבים לאוקסין (Chapman and Estelle, 2009), בחרנו להמשיך ולבדוק כיצד טיפול האתרל משפיע על דגם ביטויים של 3 גני *AUX/IAA* ו-3 גני *GH3*. התוצאות המוצגות באיור 3, מדגימות כי בתנאי ביקורת הן בציפה והן בר"נ רמת גני *AUX/IAA* נותרה יחסית יציבה בפרק הזמן הנבדק ו/או ירדה במידה מתונה לאחר 48 ש'. בניגוד לכך, טיפול האתרל גרר ירידה מוקדמת ומובהקת בביטוי תעתיקים אלו כבר לאחר 18-24 ש'. בהמשך, בהקשר לביטוי גני *GH3*, איור 3, מדגים כי בציפה רמת הצטברות 2 מהגנים הנבחנים נותרה יחסית קבוע בתנאי ביקורת, אך ירדה באופן משמעותי לאחר טיפול. לעומת זאת, נצפתה באותה רקמה עלייה ברמת הצטברות *MiGH3.1* החל מ 4 ש' לאחר ריסוס. במקביל, בר"נ לא

נצפה שינוי מהותי ברמת הצטברות *MiGH3.3* ו-*MiGH3.6* בין ביקורת וטיפול, אך מצד שני רמת הצטברות תעתיק *MiGH3.1* עלתה באופן חד החל מ 18 ש' לאחר טיפול, בעוד בתנאי ביקורת ירד במקצת ביטוי הגן לאחר 18 ש' ועלה שוב כעבור 48 ש'.

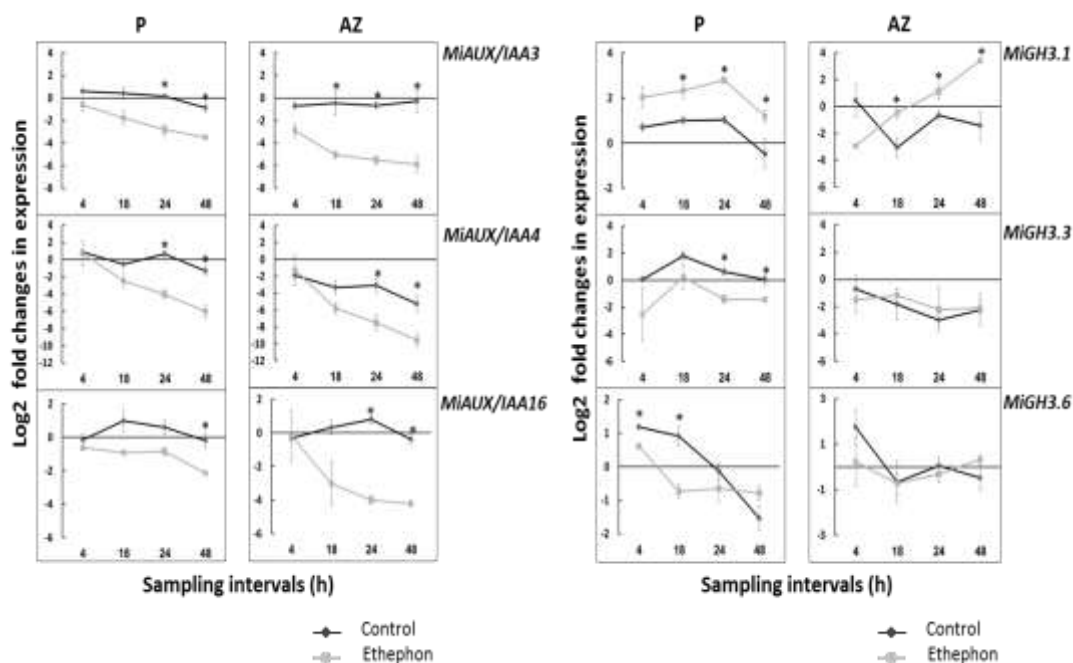


Fig. 3. Expression analysis of AUX/IAA and GH3 genes. qRT-PCR was performed with cDNA prepared from total RNA extracted from control and ethephon-treated tissues collected at different time points. Gene expression was calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method as described in the legend to Fig. 2. Data are means $\pm$ SE of three independent biological replicates. Asterisks denote a significant difference between ethephon-treated and control tissue samples at each sampling point ($P < 0.05$). P – pericarp tissue, AZ – abscission zone. Sampling intervals are presented as hours from initial setting.

כפי שצויין במבוא, שינוי במאזן האוקסין בצמח עשוי להיות קשור למספר שינויים, ביניהם ירידה ביצירה מחודשת של אוקסין. מכיוון שבאנליזה ה שביצענו בשנת המחקר הראשונה לא נכללו גנים המשתתפים במסלול Indole-3-Pyruvic Acid (IPA), שהינו המסלול העיקרי הפעיל ביצירת אוקסין, בכדי להשלים את התמונה השתמשנו שוב במאגר הטרנסקריפטום שבידינו (Sherman et al., 2015), וביצענו אנליזות BLAST לבחירת גנים הקשורים למסלול זה. לאחר זיהויים של רצפי מספר גנים המקודדים לחלבוני TAA1/TARs ולחלבוני YUCCA, בוצעו אנליזות qRT-PCR לבחינת רמת ביטויים בדוגמאות החנט ורקמת הניתוק שנדגמו בניסוי המתואר מעלה. איור 4, מסכם את תוצאות בחינה זו ומדגים כי לאחר 24 ש' גרם טיפול האתרל לירידה משמעותית ברמת ביטוי *MiTAR2*, *MiYUCCA4* ו-*MiYUCCA10* ברקמת הציפה של החנט, בהשוואה לתנאי ביקורת. תוצאה זו עשויה לרמוז כי נשירת חנטים מלווה בירידה בסינטזה *de-novo* של אוקסין. לבסוף, יש לציין כי רמת ביטוי *MiYUCCA2* ו-*MiYUCCA4* היו מתחת לסף הזיהוי בר"נ, ולכן לא נכללה אנליזה של ביטויים במקרה זה.

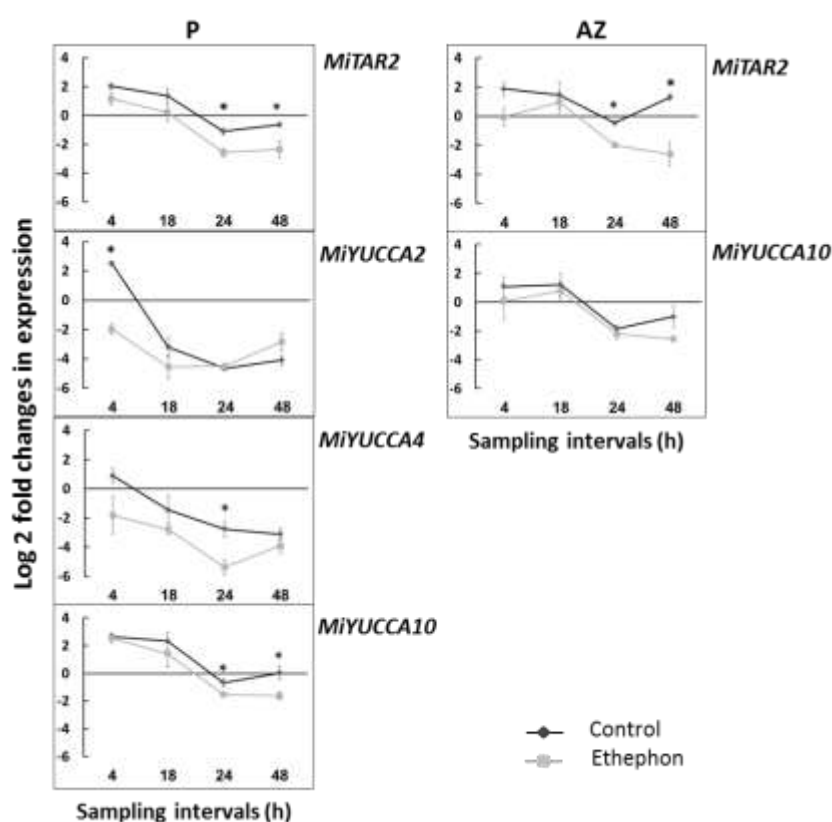


Fig. 4. Expression analysis of TAA1/TARs and YUCCA-related genes. qRT-PCR was performed with cDNA prepared from total RNA extracted from control and ethephon-treated tissues collected at different time points. Gene expression was calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method as described in the legend to Fig. 2. Data are means $\pm$ SE of three independent biological replicates. P – pericarp tissue, AZ – abscission zone

3.1.3 בדיקות רמות אוקסין חופשי ותצמידי אוקסין שונים. בהתבסס על הנתונים שהתקבלו מאנליזות הביטוי ניתן לשער כי אתילן המשתחרר לאחר טיפול אתרל, מונע ככל הנראה סינטזה ומעבר תקין של אוקסין מהחנט אל עבר ר"נ על ידי פגיעה בביטוי גנים המקודדים לחלבונים הפעילים בסינטזת אוקסין ובהובלת אוקסין. בנוסף, מכיוון שטיפול האתרל גררו לעלייה בביטוי *MiGH3.1*, ניתן לשער כי אתרל גורר גם כן לאינאקטיבציה של מגנונים התלויים ב IAA, ע"י יצירת תצמידי אוקסין שאינם ניתנים למחזור. בכדי לנסות ולאשש את ההשערות הללו זה נשלחו דוגמאות מאזור ר"נ והציפה, שנאספו בניסוי של שנה א', לבדיקת פרופיל הורמונאלי שכלל כימות אוקסין חופשי ותצמידי אוקסין שונים. התוצאות שהתקבלו מוצגות באיור 5.

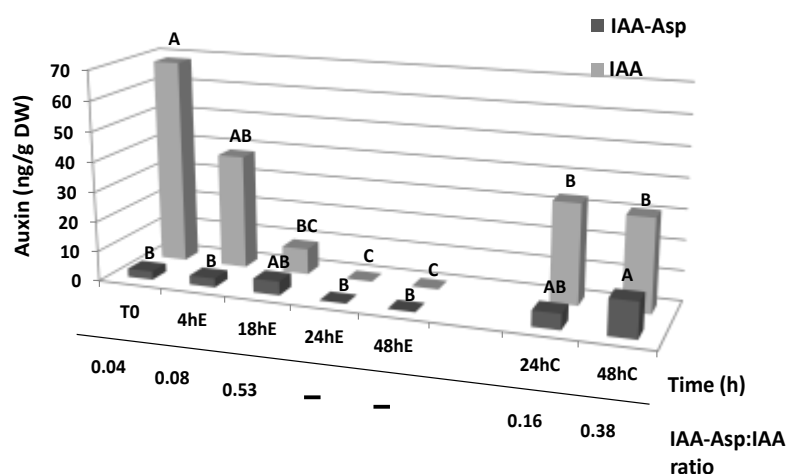


Fig. 5. Changes in IAA and IAA-Asp content in ethephon-treated and control mango abscission zone (AZ) tissues. Levels of IAA and IAA-Asp were determined at the indicated time points in control (C) and ethephon-treated (E) AZ. IAA and IAA-Asp levels are expressed as nanogram per gram dry weight. The means $\pm$ SE of three independent biological replicates, at each time point, are presented. For IAA and IAA-Asp, means followed by different letters are significantly different ($P \leq 0.05$), according to Tukey-Kramer multiple comparison tests. IAA-Asp:IAA ratio was calculated by dividing mean IAA-Asp content by mean of IAA content at each time point.

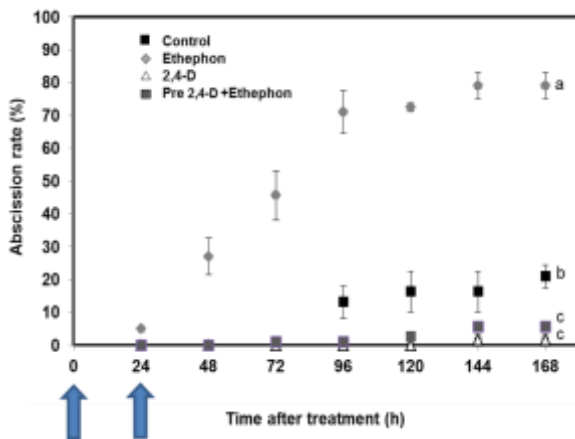
תוצאות אלו הדגימו כי לאחר הטיפול באתרל, במקביל לירידה החדה בביטוי *MiPIN1* ו-*MiLAX2*, חלה ירידה תלולה ברמת האוקסין החופשי בר"נ ולמעשה לאחר 24 ש' ירדה רמתו לאפס. התוצאות שהתקבלו הדגימו בנוסף, כי בתנאי ביקורת (בהם נצפו 40% נשירה בפרק הזמן הנבחן), הירידה המתונה ברמת ביטוי נשאי האוקסין, לוותה אף היא בירידה מתונה ברמת האוקסין החופשי בר"נ. חשוב לציין כי תוצאות אלו עומדות בקנה אחד עם תוצאות עבודה שפורסמו במהלך השנה החולפת, בס הודגם, ע"י שימוש במדידות של $[^3\text{H}]\text{-IAA}$, כי נשירת חנטים במנגו מלווה בירידה בטרנספורט פולרי של אוקסין מרקמת החנט אל עבר רקמת הניתוק (Hagemann et al., 2015). יתר על כן, כפי שניתן לראות באיור 5, תצמידי האוקסין בר"נ הנבדקות היו מיוצגים אך ורק ע"י התצמיד הקטבולי IAA-Asp, שכן הסיגנל שהתקבל לגבי יתר התצמידים שנכוחתם נבחנה וביניהם: IAA-Ala, IAA-Glu, IAA-Leu, היה מתחת לסף דטקציה (לא מוצג). באופן מפתיע, בעוד שבתנאי ביקורת בד בבד עם הירידה המתונה ברמות האוקסין החופשי, רמת IAA-Asp עלתה באופן מובהק, באזור ר"נ מטיפול האתרל, הירידה החדה ברמת האוקסין שנצפתה 18 ש' לאחר העמדת הניסוי, לוותה בעלייה מזערית ולא מובהקת ברמת IAA-Asp. מנקודת זמן זו, במקביל לירידה מוחלטת ברמת האוקסין החופשי לא ניתן היה לזהות נוכחות IAA-Asp, אך מנגד יחס IAA: IAA-Asp בר"נ מטיפול האתרל היה הגבוה ביותר בנקודת זמן זו. בהנחה שתצמידי IAA-Asp נוצרים ומפורקים באופן מהיר, תוצאות אילו עשויות להעיד כי יצירת תצמיד קטבולי IAA-Asp מלווה את תהליך הניתוק ככל הנראה במטרה לסלק אוקסין חופשי מהמערכת. בנוגע למעורבות אפשרית של *MiGH3.1* ביצירת תצמיד זה – סוגיה זו נותרת כתרחיש אפשרי שיהיה צורך לבססו בעתיד.

סיכום חלק זה: בהתבסס על מחקרים שבוצעו במינים עצים פרי שונים, ישנה התקדמות ניכרת בהבנת הגורמים המבקרים תהליכי נשירת חנטים. הנתונים החדשים שהתקבלו בחלק זה של העבודה מצביעים בפעם הראשונה על תפקידים האפשרי של מספר גנים נבחנים בהורדת רמת האוקסין החופשי בר"נ והעלאת יחס IAA: IAA-Asp, בעת יצירת ר"נ במנגו. ככל הנראה, ירידה ברמת האוקסין החופשי, בעיקר בציפה ובאזור רקמת הניתוק, גוררת אפקטים נלווים המשרים ירידה כללית בביטוי גנים שבד"כ מגיבים באופן חיובי לאוקסין.

3.1.4 אפיון השפעת טיפולי אוקסין וטריפטופן מקדימים על תהליך ניתוק חנטים במערכת *In vitro*. כפי שצוין במבוא

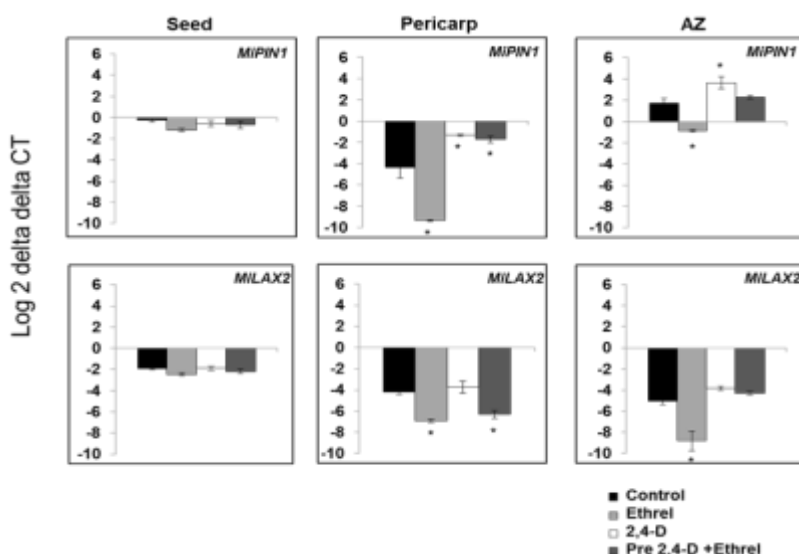
בניסוי מקדימים שערכנו במנגו מהזן 'קנט', מצאנו כי טיפול מקדים בטריפטופן, מנע במידה מסוימת נשירת חנטים אשר הושרתה ע"י אתרל. במהלך שנת המחקר השנייה ביצענו ניסויים במתכונת דומה תחילה בקנה מידה קטן ואחר-כך בקנה מידה גדול יותר. בניסויים אלו ניתנו טיפולים מקדימים באוקסין סינטטי (2,4,D), ובטריפטופן. הניסויים שבוצעו במערכת ענפונים נושאי חנטים מנותקים מהזן 'קנט' נערכו באופן הבא: בחלק מהענפונים בוצע ריסוס מקדים בטריפטופן (100 ppm) ו/או 2,4,D (100 ppm) בשילוב עם Triton-X (0.05%). לאחר כשעתיים רוססו הענפונים באתרל (0.4%) בכדי להשרות תהליכי ניתוק. ענפונים נושאי חנטים אשר רוססו באתרל ו/או שלא רוססו כלל, שימשו

כ"מערכת ביקורת פנימית". בכדי לקבוע את מדד הצמדות החנטים, נספרו החנטים הנותרים על הענפונים. באיור 6 מוצגות תוצאות הניסוי המדגימות טיפול ה-2,4-D המקדים מנע בצורה מובהקת נשירת חנטים אשר הושרתה ע"י אתרל (תוצאות טיפול טריפטופאן לא מוצגות). במקביל, בטיפול ה"ביקורת" וגם בטיפולים בהם רוססו הענפונים ב-2,4-D נשירת החנטים הייתה נמוכה יחסית.



איור 6. בחינת השפעת טיפול אתרל, טיפול 2,4-D וטיפול משולב (2,4-D ואתרל) על מידת נשירת חנטים במערכת *in vitro*. הניסוי נערך במערכת ענפונים מנותקים נושאי חנטים כמצוין בסעיף 3.1. מדדי הנשירה חושבו כהפרש בין מספר החנטים ההתחלתי ובין מספר החנטים הנותרים בכל קבוצת טיפול בכל נק' זמן. התוצאות חושבו כאחוזי נשירה מתוך כלל החנטים. כל נקודה מייצגת ממוצע $\pm$ שגיאת תקן של שלוש חזרות ביולוגיות. האותיות מייצגות את מובהקות השוואות בין הטיפולים השונים ברמה של $p < 0.05$. החיצים מייצגים את נקודות הזמן שמהם נדגם חומר צמחי אשר שימש לאנליזות ביטוי ראשוניות.

הניסוי לוה בדגימת רקמות מאזור ר"נ (AZ), ומרקמת הציפה (P) והזרע (S) של החנטים. רקמות החנט השונות שנדגמו בזמן אפס ו-24 ש' לאחר הטיפולים, שימשו תחילה להפקת RNA ו-cDNA ולבחינת רמת ביטויים של הגנים *MiPIN1* ו-*MiLAX2* באנליזת qRT-PCR. התוצאות המוצגות באיור 7א', הראו כי בדומה לתוצאות קודמות טיפול האתרל גרם לירידה מובהקת בביטויים של שני הגנים הנבדקים בר"נ ובציפה, בהשוואה לתנאי ביקורת. בנוסף, נמצא כי ברקמות אלו טיפול ה-2,4-D והטיפול המשולב (2,4-D ואתרל) לא השפיעו באופן משמעותי על ביטוי *MiLAX2*, שכן רמתו ירדה במקצת לאחר 24 ש', בדומה לביקורת. בניגוד לכך, בחינת דגם ביטוי *MiPIN1* הראתה כי במקרה זה ריסוס באוקסין סינטטי גרם לעלייה ברמת התעתיק בר"נ, ו/או למניעת הירידה ברמת התעתיק בציפה. בהתאם, גם בטיפול המשולב נצפתה מגמה דומה. לבסוף, בחינת ביטוי *MiPIN1* ו-*MiLAX2* ברקמת הזרע הראתה כי ברקמה זו רמת הצטברות שני



התעתיקים ירדה במקצת הן בתנאי ביקורת והן בתנאי הטיפול השונים.

איור מספר 7א'. בחינת השפעת טיפול אתרל, טיפול 2,4-D וטיפול משולב (2,4-D ואתרל) על ביטוי הגנים *MiPIN1* ו-*MiLAX2* בעת נשירת חנטים. התוצאות חושבו בשיטת $\Delta\Delta CT$ כאשר הגן *MiEFa* משמש כגן מנרמל (detector normalization) וערכי הביטוי לאחר 24 ש' חושבו יחסית לביטויים בזמן אפס (sample normalization). באיור מוצגים ערכי $\Delta\Delta CT$. כל עמודה מייצגת ממוצע $\pm$ שגיאת תקן של שלוש חזרות ביולוגיות. הכוכביות מייצגות תוצאות מובהקות בין טיפול הביקורת לטיפולים השונים ברמה של $p < 0.05$. לאחר בחינת דגם ביטוי גנים המקודדים

לרצפטורים לאוקסין בדקנו גם את דגם

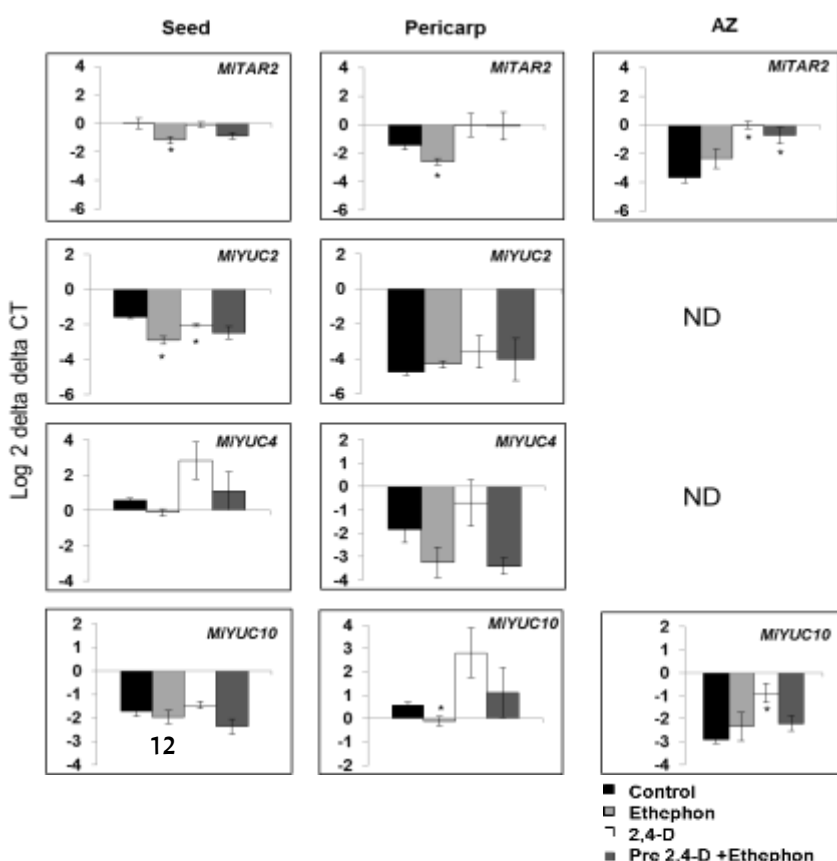
ביטויים של ארבעה רצפים שתרגומם הראה הומולוגיה גבוהה לחלבוני *AtYUCCA4*, *AtYUCCA2*, *AtTAR2* ו-*AtYUCCA10*. בדיקת ביטויים של התעתיקים הנבחרים ברקמות החנט ור"נ הראו מגמות ביטוי מעורבת (איור 24). ש' לאחר טיפול האתרל נצפתה ברקמת הזרע ירידה מובהקת בביטוי הגנים *MiTAR2* ו-*MiYUC2*, בהשוואה לביקורת. מגמה דומה, אם כי לא מובהקת, הודגמה באותה רקמה בהקשר לביטויים של הגנים *MiYUC4* ו-*MiYUC10*. מנגד, טיפולי האוקסין והטיפול המשולב לא השפיעו בצורה כלשהי, חיובית או שלילית, על ביטוי הגנים *MiTAR2*, *MiYUC2* ו-*MiYUC10* ברקמה זו, ואילו טיפול ה-2,4-D גרם לירידה מסוימת ברמת הצטברות תעתיק ה-*MiYUC2* בהשוואה לביקורת.

בציפת הפרי, טיפול האתרל גרם גם כן לירידה משמעותית ברמת הצטברות תעתיק *MiTAR2* בהשוואה לביקורת, ירידה אשר נמנעה בטיפול 2,4-D ו/או בטיפול משולב. תוצאה דומה נצפתה ברקמת הציפה בהקשר לביטוי *MiYUC10*, אם כי במקרה זה גרם טיפול האוקסין לעלייה מסוימת בביטוי הגן. מנגד, לא נצפו הבדלים משמעותיים בפרק הזמן הנבחן (24 ש' מזמן אפס) ברמת ביטויים של הגנים *MiYUC2* ו-*MiYUC4* בין הטיפולים השונים בהשוואה לביקורת.

לבסוף, בחינת תוצאות הצטברות התעתיקים באזור ר"נ, הראו כי במקרה זה הן בתנאי ביקורת, והן לאחר טיפול אתרל, חלה ירידה מסוימת בהצטברות התעתיקים *MiTAR2* ו-*MiYUC10*, ירידה אשר נמנעה בעקבות טיפול האוקסין סינטטי. **סיכום חלק זה:** מכלול התוצאות שהתקבל עשוי להורות כי טיפול באוקסין סינטטי מבקר באופן חיובי את ביטוי הגן *MiPIN1*, אך כנראה אינו משפיע על ביטוי *MiLAX2*. עלייה ברמת תעתיק זה ברקמת הציפה ובר"נ עשויה לסייע בהעלאת זרימת האוקסין החופשי מהציפה אל עבר ר"נ, ו/או בר"נ עצמה וע"י כך למתן ו/או למנוע השראת תהליכי ניתוק. בנוסף, מכיוון שטיפול מקדים באוקסין סינטטי מנע במידה מסוימת את הירידה בביטויים של מספר גנים הקשורים בסינטזת

אוקסין ו/או גרם לעלייה בביטויים, ניתן לשער כי טיפול זה עשוי למנוע או למתן תהליכי נשירה, בין היתר, ע"י אינדוקציה של סינטזת אוקסין. בכדיי לאשש רעיון זה יהיה צורך לבדוק את רמת האוקסין ברקמות הנבדקות.

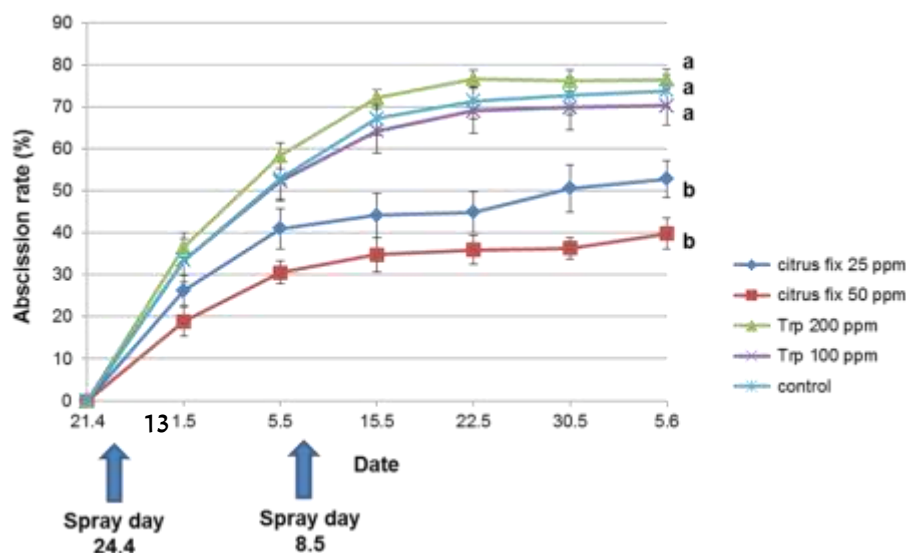
איור מספר 27: בחינת השפעת טיפול אתרל, טיפול 2,4-D וטיפול משולב (2,4-D ואתרל) על ביטוי הגנים *MiTAR2*, *MiYUCCA2*, *MiYUCCA4*, *MiYUCCA10*. אנליזת qRT-PCR בוצעה כפי שמתואר באיור לעיל. כל עמודה מייצגת ממוצע $\pm$ שגיאת תקן של שלוש חזרות ביולוגיות. הכוכביות מייצגות תוצאות מובהקות בין טיפול הביקורת לטיפולים השונים ברמה של $p < 0.05$. ND= Not Detected.



תוצאות ודיון מחקר יישומי (חלק זה של המחקר בוצע ורוכז בשנתיים הראשונות של המחקר ע"י דר' דורון שניידר

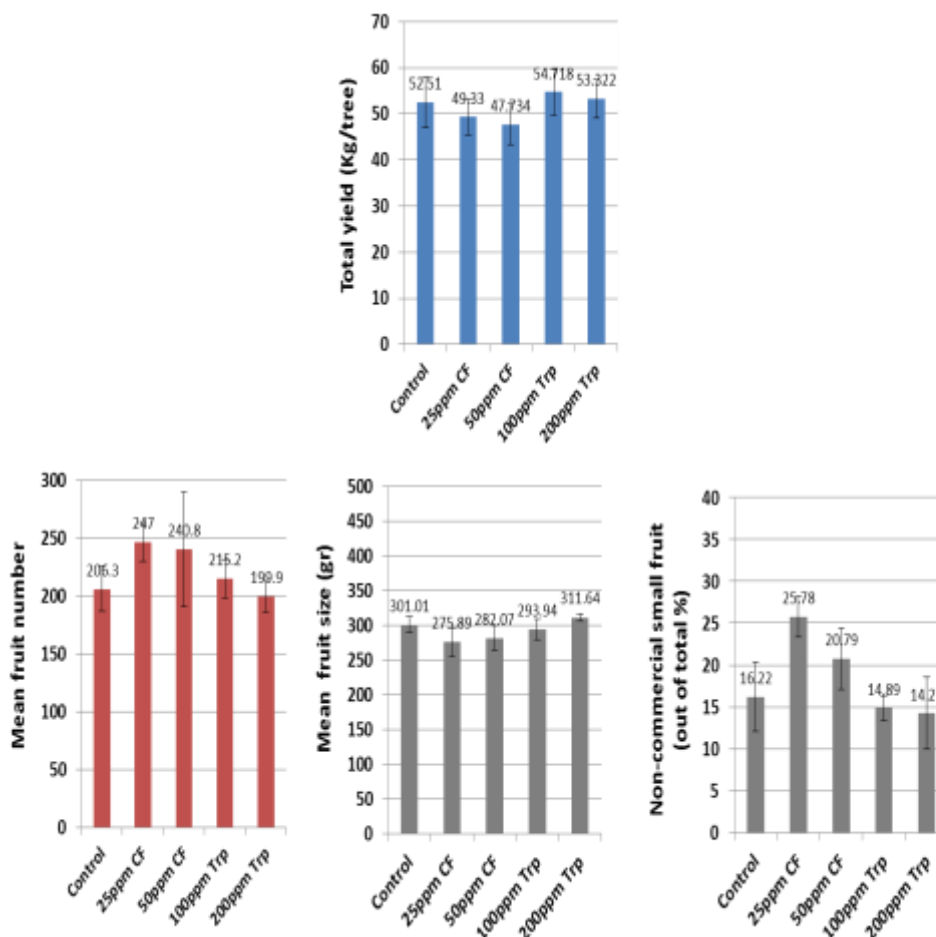
ובשנה השלישית של המחקר ע"י דר' אדולפו לוין). תוצאות המחקר היישומי שבוצעו במטע ב-2014 וב-2015 הורו על אפשרות לצמצום נשירת החנטים ע"י ריסוס בטריפטופאן בריכוז 100 או 200 ח"מ, 4 או 6 שבועות לאחר שיא הפריחה (ראה נספח ב). בשנת המחקר השלישית בוצעו בדיקות נוספות לבחינת השפעות טיפולי טריפטופאן ואוקסין סינטטי (Alco citrus fix) על רמת נשירת חנטים בעצים המצויים במצב שפע ושפל. הניסויים בוצעו במטעים מסחריים ברמת מגשימים וברמות בהם נטועים עצים מהזן 'קנט'. ברמות מגשימים בוצע ניסוי בעצים שהיו נתונים במצב שפע. לצורך הניסוי נבחרו באפריל 2016 חמישים עצים עמוסי חנטים הומוגניים למראה. העצים חולקו לחמש קבוצות (עשרה עצים בכל קבוצה). בקבוצת עצי הביקורת לא בוצע כל טיפול. בקבוצות טיפולי הטריפטופאן, רוססו העצים בסוף אפריל ובתחילת מאי (ריסוס כפול) ב-100 ו-200 ח"מ TRP (טיריניטי, 'תרסיס', ישראל) בתוספת 0.025% שטח (טריטון, 'עמיר', ישראל). בקבוצות הנותרות רוססו העצים באותם מועדים באוקסין סינטטי 2,4-D (AMVAC, Alco citrus fix, corporation, US) בריכוז 25 ו-50 ח"מ בתוספת 0.025% שטח. הטיפולים בוצעו לאחר נשירה מסיבית של חנטים קטנים, כאשר החנטים היו בגודל "זית". בכל עץ מקבוצות הניסוי סומנו עשרה ענפים נושאי חנטים ונערך מעקב חודשי לתיעוד מספר החנטים שנותרו על כל תפוחית. הנתונים שנאספו שימשו לקביעת מדדי נשירת חנטים. לבסוף, במועד הקטיף המסחרי (יולי 2016) נבדקה רמת היבול הכללי, מספר הפירות וגודל הפרי הממוצע בכל אחד מעשרת עצי הביקורת והטיפולים.

תוצאות המייצגות את מדד נשירת החנטים בניסוי שבוצע ברמת מגשימים מוצגות באיור 8. התוצאות שהתקבלו הראו כי בתנאי ביקורת (ללא טיפול), החל מסוף אפריל ועד לסוף מאי עוצמת נשירת החנטים הייתה גבוהה והגיעה לכ-70% מסך החנטים שנספרו בזמן אפס (תחילת אפריל). לאחר פרק זמן זה, ועד לסוף תקופת המעקב התמתנה נשירת החנטים. התוצאות המוצגות באיור 8 מורות בנוסף כי טיפולי האוקסין, הפחיתו באופן מובהק את עוצמת נשירת חנטים, בעוד שלטיפולי הטריפטופאן לא הייתה השפעה מובהקת על מניעת תהליכי נשירה. מדדי היבול הראו בהתאם כי בטיפולי האוקסין אומנם התקבלו יותר פירות לעץ (240-247 לעומת 205 פירות לעץ, בהתאמה), אך פרקצית הפירות הקטנים התקבלו הייתה גדולה יותר בממוצע, ולכן רמת היבול הכללי שהתקבל לא נבדלה באופן מובהק מטיפול הביקורת. (ראה איור 9 ותמונות 1-2 בנספח).



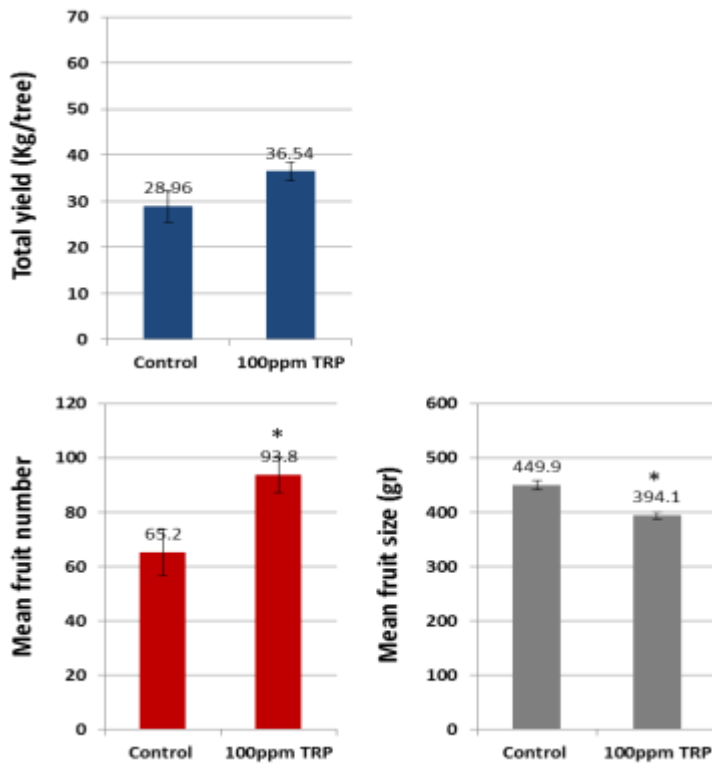
איור מספר 8: בחינת השפעת טיפולי אוקסין סינטטי (2,4-D) וטריפטופאן על רמת נשירת חנטים בניסוי שטח (במטע). הערכים בגרף מייצגים ממוצע $\pm$ שגיאת תקן של עשר חזרות ביולוגיות (עשרה עצים לטיפול X עשרה ענפים לעץ מהם נספרו החנטים). אותיות שונות מייצגות מובהקות בין הטיפולים השונים ברמה של $p < 0.05$.

איור מספר 9: בחינת השפעת טיפולי אוקסין סינטטי (2,4-D) וטריפטופאן על מדדי יבול - ניסוי רמת מגשימים. הערכים בגרפים מייצגים ממוצע $\pm$ שגיאת תקן של עשר חזרות ביולוגיות (עשרה עצים לטיפול).



ברמות בוצע ניסוי בעצים שהיו נתונים במצב שפל. לצורך הניסוי נבחרו באפריל 2016, 20 עצים הומוגניים למראה שהיו נתונים במצב שפל (עומס חנטים נמוך). באתר זה חולקו העצים לשתי קבוצות (עשרה עצים בכל קבוצה). בקבוצת עצי הטיפול בוצע בסוף אפריל ובתחילת מאי (ריסוס כפול) טיפול טריפטופאן (100 ח"מ TRP (טיריניטי, 'תרסיס', ישראל) בתוספת 0.025% שטח (טריטון, 'עמיר', ישראל). במועד הקטיפה המסחרי (יולי 2016) נבדקו מדדי יבול של עצי ביקורת וטיפול. התוצאות המוצגות באיור 10 מורות כי במקרה זה, טיפול הטריפטופאן שניתן לעצים במצב שפל (עומס פרי נמוך), העלה באופן מובהק את מספר הפירות לעץ, אך הפירות שהתקבלו היו גם כן קטנים מהפירות עצי הביקורת (כ 390 ג"ר לעומת 450 ג"ר לפרי), ולכן רמת היבול הכללי שהתקבלה לא נבדלה באופן מובהק מטיפול הביקורת.

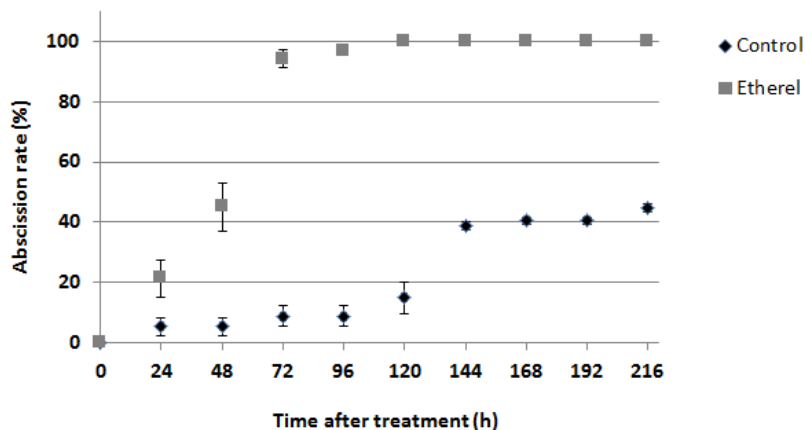
איור מספר 10: בחינת השפעת טיפולי טריפטופאן על מדדי יבול - ניסוי רמות. הערכים בגרפים מייצגים ממוצע $\pm$ שגיאת תקן של עשר חזרות ביולוגיות (עשרה עצים לטיפול).



סיכום מחקר יישומי: תוצאות המחקר היישומי מורות שניתן לצמצם באופן מובהק את מדדי נשירת החנטים ע"י ריסוס כפול באוקסין סיננטי. למרות הפוטנציאל הטמון בטיפול נראה כי כיול מועדי הריסוס, וריכוזי האוקסין, עדין נדרש לפיתוח פרוטוקול טיפול אפקטיבי שיוביל הן לצמצום נשירת חנטים והן להגדלת היבול הכללי. יש לבחון לעומק ביצוע טיפולים כאלו דווקא בעצים הנתונים במצב שפל, שכן נראה כי טיפולים במצב זה עשויים לתרום לעלייה מובהקת ביבול. לבסוף ראוי לציין כי הניסויים במחקר זה בוצעו בזן 'קנט'. בהתחשב בתוצאות ובעובדה שהזן 'קנט', מתאפיין בפירות גדולים (לעיתים גדולים מדי שלא תואמים את דרישות השוק), מומלץ לבחון השפעת טיפולים אילו על מדדי נשירה ויבול בזן זה.

- Bangerth, F (2000) Abscission and thinning of young fruit and their regulation by plant hormones and bioregulators. *Plant Growth Regul.* 31: 43-59.
- Bonghi C, Ramina A (2000) Biochemical and molecular aspects of fruitlet abscission. *Plant Growth Regulation* 31: 35-42
- Botton A, Eccher G, Forcato C, Ferrarini A, Begheldo M, Zermiani M, Moscatello S, Battistelli A, Velasco R, Ruperti B, Ramina A (2011) Signaling pathways mediating the induction of apple fruitlet abscission. *Plant Plant Physiol* 155: 185-208
- Chapman EJ, Estelle M (2009) Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annu Rev Genet* 43: 265-85
- Dal Cin V, Velasco R, Ramina A (2009) Dominance induction of fruitlet shedding in *Malus x domestica* (L. Borkh): molecular changes associated with polar auxin transport. *BMC Plant Biol* 9: 139
- Guan X, Xu T, Gao S, Qi M, Wang Y, Liu X and Li T (2014) Temporal and spatial distribution of auxin response factor genes during tomato flower abscission *J Plant Growth Regul* 33:317-27
- Hagemann MH, Winterhagen P, Hegele M, Wünsche JN (2015) Ethephon induced abscission in mango: physiological fruitlet responses. *Frontiers in Plant Science* 6, 1–11
- Ish-Shalom M, Dahan Y, Maayan I, Irihimovitch V (2011) Cloning and molecular characterization of an ethylene receptor gene, MiERS1, expressed during mango fruitlet abscission and fruit ripening. *Plant Physiol Biochem* 49: 931-6
- Krecek P, Skupa P, Libus J, Naramoto S, Tejos R, Friml J, Zazimalova E (2009) The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biol* 10: 249
- Kuang J, Wu J, Zhong H, Li C, Chen J, Lu W, Li J (2012) Carbohydrate Stress Affecting Fruitlet Abscission and Expression of Genes Related to Auxin Signal Transduction Pathway in Litchi. *Int J Mol Sci* 13:16084-103
- Lin Z, Zhong S, Grierson D (2009) Recent advances in ethylene research. *J Exp Bot* 60: 3311-36
- Ludwig- Muller, J (2011) Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *J Exp Bot* 62: 1757-73.
- Meir S, Hunter DA, Chen JC, Halaly V, Reid MS (2006) Molecular changes occurring during acquisition of abscission competence following auxin depletion in *Mirabilis jalapa*. *Plant Physiol* 141: 1604-16
- Meir S, Philosoph-Hadas S, Sundaresan S, Selvaraj KS, Burd S, Ophir R, Kochanek B, Reid MS, Jiang CZ, Lers A (2010) Microarray analysis of the abscission-related transcriptome in the tomato flower abscission zone in response to auxin depletion. *Plant Physiol* 154: 1929-56

- Miller AN, Krizek BA, Walsh CS (1988) Whole fruit ethylene evolution and ACC content. *J Amer Soc Hort Sci* 113: 119-124
- Nishio S, Moriguchi R, Ikeda H, Takahashi H, Takahashi H, Fujii N, Guilfoyle TJ, Kanahama K, Kanayama Y (2010) Expression analysis of the auxin efflux carrier family in tomato fruit development. *Planta* 232: 755-64
- Nunez-Elisea R, Davenport TL (1986) Abscission of Mango Fruitlets as Influenced by Enhanced Ethylene Biosynthesis. *Plant Physiol* 82: 991-994
- Pandita VK, Jindal KK (1991) Enzymatic and anatomical changes in abscission zone cells of apple fruit induced by etephon. *Biol. Plant* 33: 20-25
- Roberts JA, Elliott KA, Gonzalez-Carranza ZH (2002) Abscission, dehiscence, and other cell separation processes. *Annu Rev Plant Biol* 53: 131-58
- Singh Z, Agrez V (2002) Fruit set, retention and yield of mango in relation to ethylene. *Acta Hort* 575: 805-811
- Singh Z, Malik AU, Davenport TL (2005) Fruit drop in mango. *Horticultural Reviews* 31: 111-15
- Shishova M, Lindberg S (2010) A new perspective on auxin perception. *J Plant Physiol* 167: 417-22
- Taylor JE, Whitelaw CA (2001) Signals in abscission. *New Phytologist* 151: 323-33
- Tieman DM, Klee HJ (1999) Differential expression of two novel members of the tomato ethylene-receptor family. *Plant Physiol* 120: 165-72
- Woodward AW, Bartel B (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot* 95: 707-35
- Yuan H, Zhao K, Lei H, Shen X, Liu Y, Liao X, Li T (2013) Genome-wide analysis of the GH3 family in apple (*Malus x domestica*). *BMC Genomics* 14: 297

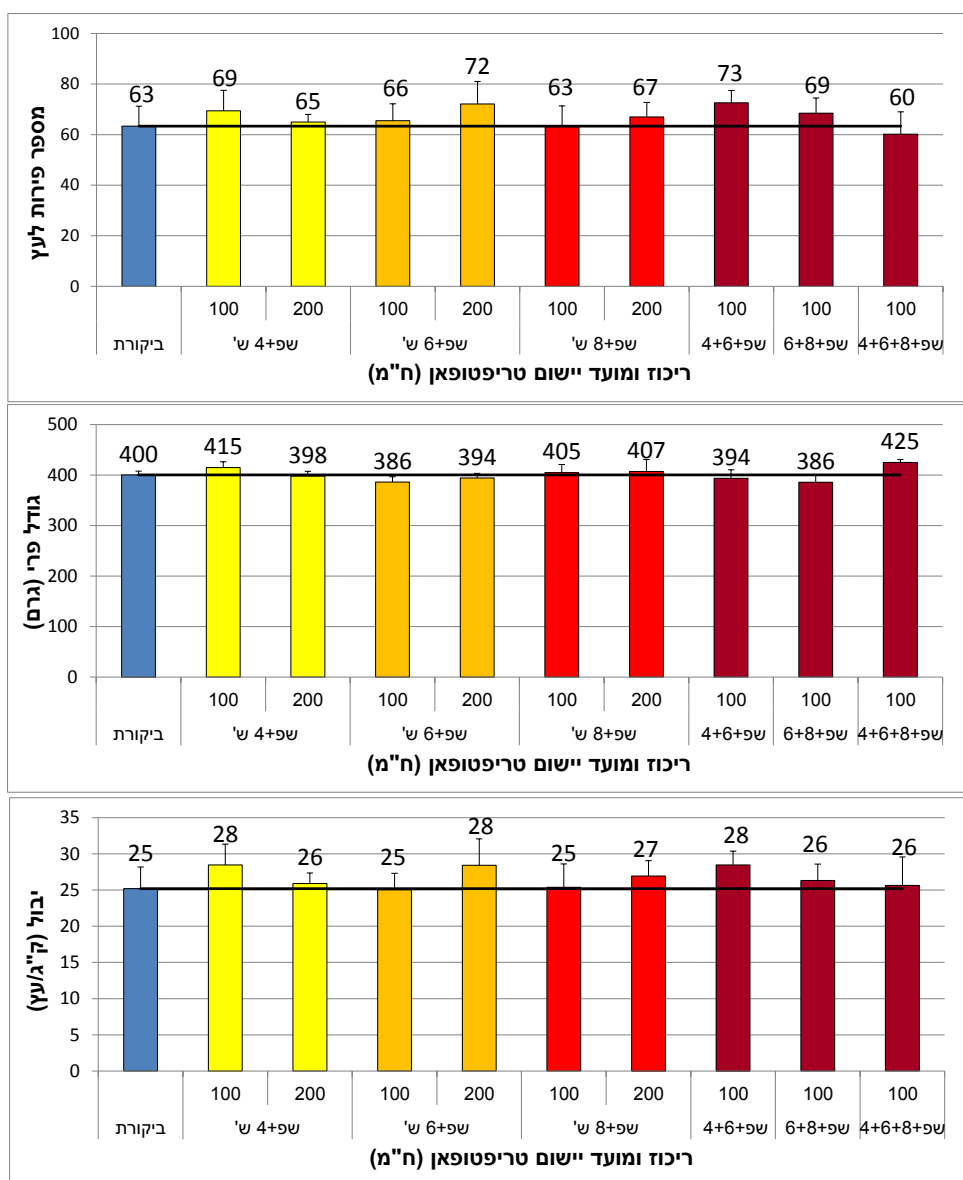


נספח א' השפעת טיפול אתרל על נשירת חנטים.

במערכת ענפונים מנותקים. הוצג בדו"ח מסכם

שנה א'

נספח ב'- בחינת השפעת טיפול טריפטופאן על מספר הפירות לעץ (פנל עליון), על גודל הפרי הממוצע (פנל אמצעי) ועל היבול לעץ (פנל תחתון). ניסוי רמות אביב 2015. חמ= ריכוז ppm; שפ=שיא פריחה; הקו השחור מראה את הערך שהתקבל בעצי הביקורת. בכל המדדים לא נמצאו הבדלים מובהקים בין הטיפולים השונים ($P>0.05$). תוצאות ניסוי 2015 - הוצג בדו"ח מסכם שנה ב'



נספח ג- תמונות 1-2. תמונות מייצגות של עצי ביקורת ועצים מטופלים באוקסין סיננטי - ניסוי רמת מגשימים אביב 2016.

ביקורת



50 ppm Citrus-Fix (2.4-D)



מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה. במנגו צמצום תופעת נשירת חנטים עשוי להוות גישה לשיפור הפוריות, הידע אודות התהליכים המבקרים את תהליך נשירת החנטים, אשר עשוי לתרום לפתרון הבעיה, הינו מועט. נשירת חנטים מבוקרת ע"י הורמונים שונים. בעוד אתילן משרה את תהליך ההתנתקות, אוקסין מעכב תהליך זה. במחקר זה הצענו א. לבצע אפיון מקיף של שינויים מולקולריים והורמונאליים החלים בעת נשירת חנטים במנגו, תוך התמקדות בבחינת דגם הביטוי של גנים הקשורים בחישה ובהעברת סיגנל האוקסין ו/או המבוקרים ע"י אוקסין. ב. אפיון השפעת אוקסין על שינויים אלו ג. בחינת יישום טיפול טריפטופאן (ו/או אוקסין) במטע, לשיפור הייבול במנגו.	אלו ממטרות המחקר הושגו בעבודת המחקר הנוכחית - עיקרי התוצאות לשנת המחקר ב במסגרת המחקר הבסיסי, בשנת המחקר הראשונה השתמשנו בפלטרמט Fluidigm™ dynamic array לבחינת ביטוי 38 גנים הקשורים למסלולי העברת חישה ויצירת אוקסין ברקמת הציפה ורקמת ניתוק (ר"נ) של חנטים שטופלו באתרל, בהשוואה לתנאי ביקורת. בשנה המחקר השנייה הרחבנו את הבדיקות מחומר צמחי זה ע"י שימוש באנליזות RT-PCR. מצאנו כי במהלך פרק הזמן הנבחן (48 ש'), חלה ברקמות הציפה ור"נ ירידה ברמת ביטויים של גנים המקודדים לנשאי אוקסין, הן לאחר טיפול והן בתנאי ביקורת. למרות זאת, רמת ביטוי תעתיקי גנים אלו הייתה נמוכה באופן מובהק, בתנאי טיפול לעומת ביקורת, כבר לאחר 18 ש'. רקמות החנט המטופלות התאפיינו בנוסף גם בירידה מוגברת בביטוי גנים המגיבים מוקדם לאוקסין ובירידה בהצטברות תעתיקי גנים המקודדים לחלבונים המשתתפים בסינתזת אוקסין. לעומת זאת, הודגם כי אחד הגנים ממשפחת GH3, <i>MiGH3.1</i> הראה מגמת עליה ברקמות חנטים שטופלו באתרל יחסית לביקורת. במקביל, בדיקות רמות אוקסין הראו כי ר"נ מטיפול הביקורת ומטיפול האתרל התאפיינו בירידה ברמת האוקסין החופשי ובעלייה ביחס IAA-Asp:IAA, ממצא המורה שיצירת ר"נ מלווה ביצירת תצמיד אוקסין קטבולי זה. למרות זאת, ר"נ מטיפול האתרל התאפיינה בירידה מובהקת ברמת האוקסין ובעלייה גבוהה יותר ביחס IAA-Asp:IAA, בהשוואה לביקורת, כבר לאחר 18 ש'. בשנת המחקר השלישית ביצענו ניסויים נוספים במערכת ענפונים נושאי חנטים בהם בוצעו טיפולים מקדימים בטרפטופאן ובאוקסין סינטטי (2,4,D), לפני השראת תהליכי ניתוק. טיפול מקדים ב 2,4,D צמצם בצורה משמעותית את נשירת החנטים וגרר שינוי בתבנית ביטויים של גנים הקשורים לאוקסין. משמעות התוצאות הללו נידונה בדו"ח. במסגרת המחקר היישומי בשנות המחקר הראשונה והשנייה נמצא כי ריסוס חוזר ב-100 ח"מ טריפטופאן ב-4 וב-6 שבועות אחרי שיא פריחה הוביל למגמת עלייה לא מובהקת במספר הפירות לעץ וביבול הכללי, בהשוואה לביקורת. התוצאות הצביעו על האפשרות שפוטנציאל נשיאת הפרי בעצי המטע גדול ממה שמתקבל, ויש מקום למצוא דרכים לשפר אותו ע"י טיפולים באוקסינים סינטיים. בשנת המחקר השלישית בוצעו בדיקות נוספות לבחינת השפעות טיפולי טריפטופאן ואוקסין סינטטי (Alco) citrus fix על רמת נשירת חנטים בעצים המצויים במצב שפע ושפל. טיפולי האוקסין, הפחיתו באופן מובהק את עוצמת נשירת חנטים, בעוד שלטיפולי הטרפטופאן לא הייתה השפעה מובהקת על מניעת תהליכי נשירה. מדדי היבול הראו כי בטיפולי האוקסין התקבלו יותר פירות לעץ, אך הפירות היו קטנים יותר בממוצע
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח? מטרות המחקר הבסיסי הושגו. במסגרת המחקר היישומי כיוול מועדי הריסוס, וריכוזי האוקסין עדין נדרש למציאת פרוטוקול טיפול אפקטיבי שיוביל הן לצמצום נשירת חנטים והן להגדלת היבול הכללי	בעיות שונות לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנוותרה לביצוע תוכנית המחקר?
מוצע לבחון לעומק ביצוע טיפולים כאלו דווקא בעצים הנתונים במצב שפל, שכן נראה כי טיפולים במצב זה עשויים לתרום לעלייה מובהקת ביבול	הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פטנטים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי. Denisov, Y., Glick, S., Zviran, T., Ish-Shalom, M., Levin., A., Faigenboim, A., Cohen, Y. and Irihimovitch., V. Gene-expression study reveals distinct spatial and temporal expression profiles of auxin-related genes during mango fruitlet drop (under review PPB Jan 2017)
פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)	
ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)	חסוי - לא לפרסם
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר? כן- לא. כן אני מתכוונת להגיש תוכנית המשך	2018ב