

דו"ח מסכם לתכנית מחקר 203-0561

שיפור השליטה על איכות אשכול ורמת היבול בגפן באזורי גידול מבכירים באמצעות הבנת הגורמים המשפיעים על שלב השלמת התמיינות האשכול

שמות החוקרים: אתי אור, עליזה אוגרדוביץ, שמעון לביא, פני שריג.
המכון למטעים, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן, ת.ד. 50250. דואר אלקטרוני: vhattior@agri.gov.il

Analysis of environmental and endogenic factors involved in the control of cluster differentiation and fruitfulness of table grape

Etti Or, Aliza Ogredovitch, Shimon Lavee and Pini Sarig
Institute of Horticulture, Volcani Center, Bet Dagan, P.O.B. 50250. Email: vhattior@agri.gov.il

2. הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

חתימת החוקר:

3. תקציר הניסיונות שבוצעו בתקופת המחקר

מבנה התפרחות, כמות התפרחות ומיקום התפרחות בגפן הינם פרמטרים בעלי חשיבות עצומה לקביעת איכות היבול, רמת היבול, פרקטיקת הגידול וכלכליותו. פרויותו הבלתי יציבה של הזן סופיריור שהובילה בשנים מסוימות ליבול אפסי ולהכרזה על אסון טבע מדגימה את הצורך הקריטי בשליטה בכמות התפרחות המתמיינות ואיכותן. ההכרח בזמירה קיצית בגידול גפן בחממות, הנובע מבעיית התמיינות חריפה, והתופעה של התמיינות אשכולות קטנים ומעטים המלווה את הגידול המבכיר בחממות ובשדה הפתוח הן דוגמאות נוספות לצורך זה. גם למיקום התפרחת המתמיינת חשיבות עצומה הקובעת את אופי הזמירה (ארוכה או קצרה) ומשפיעה על הפיזיולוגיה והפרקטיקה של הגידול ועל תשומות הגידול הנדרשות.

כל הפרמטרים המוזכרים נקבעים על פי מידת התמיינות ואופי התמיינותן של פרימורדיות האשכול בפקעים הלטרליים והם תלויים באינטראקציה שבין גורמים גנטיים וגורמי סביבה במספר שלבים במחזור הגידול. למרות חשיבותו העצומה של הנושא, המחקר העוסק בהתמיינותה של המריסטמה הרפרודוקטיבית הוא מצומצם ביותר והידע שנצבר מועט, במיוחד לגבי השלב הקריטי של השלמת התמיינות פרימורדית האשכול והתפתחות פרימורדיות הפרחים על גבי השדרה במהלך התרדמה ולאחריה. דלות הידע בנושא אינה מאפשרת הבנה של תופעות מן הסוג שהוזכר ושליטה בהן.

מטרת המחקר הינה ברור מועד התפתחותם של איברי הפרח על גבי פרימורדיית התפרחת בפקע ובחינת השפעות גורמים סביבתיים והורטיקולטוריים על התהליך. לשם כך ננקטה אסטרטגיה עקיפה המתבססת על המידע הנרחב שהצטבר לגבי תהליך הפריחה במספר מערכות של צמחי מודל (ערבידופסיס, עגבניה, לוע ארי) בהם נמצא כי הגנים Agamous, Apatella-1, ו-Pistillata מופיעים במהלך התפתחות הפרח בלבד. על מנת לפתח סמנים ביוכימיים שובטו בשנה הראשונה והשניה הגנים VitAG, VitPI ו-VitAP1 שהם האורטולוגים לגן AGAMOUS (AG), PISTILLATA ו-Apatella1. דגם הביטוי של הגנים האמורים ברקמות גפן שונות נבדק באנליזות Northern, Real Time PCR, ו-אנליזת In situ. נמצא ביטוי מהגן VitAG בפרחים ובפירות, ביטוי של VitAP1 בקנוקנות, שדרות, פרחים וביטוי הגן VitPI באבקנים ועלי כותרת בלבד. בשלב הבא שימשו הגנים המתוארים כסמנים ביוכימיים לזיהוי התמיינות אברי הפרח בפקעים בשלבי תרדמה, תפיחה ופריצת ניצני צימוח בעזרת ריאקצית Real Time PCR. דגם הביטוי של הסמנים נלמד בפקעי פרלט וסולטנינה. על מנת

ללמוד השפעתו/מעורבותו של תהליך שבירת התרדמה הושווה דגם הביטוי בין פקעי פרלט מטופלים בציאנמיד חומצי לפקעי בקורת. ככלל, הנתונים שהובאו מצביעים על קורלציה בין פריצת הפקעים לעלייה בביטוי משלושת סמני התפתחות הפרח ומציעים כי תהליך התמיינות אברי הפרח מתחיל עם פריצת הפקע. ציאנמיד חומצי גרם להקדמת הביטוי בקורלציה עם הקדמת פריצת הפקעים אולם דגם השתנות הביטוי ומהלך התפתחות הפרחים על גבי התפרחת היה דומה ונראה כי ריסוס ב'דורמקס' במועדים מאוחרים אינו פוגע בהתפתחות אברי הפרח. **פרסומים:** עדיין אין.

תוצאות ודין

שיבוט ההומולוגים מגפן לגנים מערביופסיס המעורבים ביצירת פרימורדית הפרח על מנת שימשו כסמנים מולקולרים למעקב אחר התפתחות הפרחים.

הגנים Agamous, Apatella-1 ו-Pistillata נבחרו כסמנים פוטנציאליים להתמיינות פרחים. במספר מערכות של צמחי מודל (ערבידופסיס, עגבניה, לוע ארי) נמצא כי גנים אלו מופיעים במהלך התפתחות הפרח בלבד ואינם מופיעים ברקמות וגטטיביות. יחד עם זאת ידוע כי גנים אחרים מאותה משפחה של גנים המכילה אלמנט המכונה MADS BOX מופיעים גם ברקמות אחרות ואינם ספציפיים לרקמת הפרח. כדוגמה יובאו הגנים AGL27, AGL31 ו-Fruitfull מערביופסיס. על מנת לשבט מגפן את ההומולוגים לשלושת הגנים המצויינים מעל ולהשתמש בהם כסמנים לשלב התמיינות הפרחים על גבי מריסטמת האשכול, איתרנו במאגרי המידע הממוחשבים רצפים של הגנים מצמחי מודל לגביהם הוכחה הפונקציה של הגנים והספציפיות שלהם לרקמת הפרח. נערכה השוואה בין הרצפים השונים לאיתור אזורי רצף ייחודיים לגן הספציפי שהינם שונים ככל האפשר מרצף חומצות אמיניות של גנים אחרים ממשפחת ה-MADS BOX שאינם ספציפיים לרקמת הפרח. על בסיס השוואה זו תוכננו פריימרים מורכבים על בסיס אזורים ייחודיים לגן מערביופסיס (תמונות 1-3).

		MADS																																							
pistillata	M	G	R	G	K	I	E	I	K	R	I	E	N	A	N	N	R	V	V	T	F	S	K	R	R	N	G	L	V	K	K	A	K	E	I	T	V	L	C	D	40
globosa	M	G	R	G	K	I	E	I	K	R	I	E	N	S	S	N	R	Q	V	T	Y	S	K	R	R	N	G	I	M	K	K	A	K	E	I	S	V	L	C	D	40
FBP 1	M	G	R	G	K	I	E	I	K	R	I	E	N	S	S	N	R	Q	V	T	Y	S	K	R	R	N	G	I	L	K	K	A	K	E	I	S	V	L	C	D	40
		PI-B																																							
pistillata	A	K	V	A	L	I	I	F	A	S	N	G	K	M	I	D	Y	C	C	P	S	M	D	L	G	A	M	L	D	Q	Y	Q	K	L	S	G	K	K	L	W	80
globosa	A	H	V	S	V	I	I	F	A	S	S	G	K	M	H	E	F	C	S	P	S	T	T	L	V	D	M	L	D	H	Y	H	K	L	S	G	K	R	L	W	80
FBP 1	A	R	V	S	V	I	I	F	A	S	S	G	K	M	H	E	F	S	S	T	S	.	.	L	V	D	I	L	D	Q	Y	H	K	L	T	G	R	R	L	L	78
		SENSE											K domain																												
pistillata	D	A	K	H	E	N	L	S	N	E	I	D	R	I	K	K	E	N	D	S	L	Q	I	E	L	R	H	L	K	G	E	D	I	Q	S	L	N	L	K	N	120
globosa	D	P	K	H	E	H	L	D	N	E	I	N	R	V	K	K	E	N	D	S	M	Q	I	E	L	R	H	L	K	G	E	D	I	T	T	L	N	Y	K	E	120
FBP 1	D	A	K	H	E	N	L	D	N	E	I	N	K	V	K	K	D	N	D	N	M	Q	I	E	L	R	H	L	K	G	E	D	I	T	S	L	N	H	R	E	118
		PI-C-ANTI																																							
pistillata	L	M	A	V	E	H	A	I	E	H	G	L	D	K	V	R	D	H	Q	M	E	I	L	I	S	K	R	R	N	E	K	M	M	A	E	E	Q	R	Q	L	160
globosa	L	M	V	L	E	D	A	L	E	N	G	T	S	A	L	K	N	K	Q	M	E	F	V	R	M	M	R	K	H	N	E	M	V	E	E	E	N	Q	S	L	160
FBP 1	L	M	I	L	E	D	A	L	E	N	G	L	T	S	I	R	N	K	Q	N	E	V	L	R	M	M	R	K	K	T	Q	S	M	E	E	E	Q	D	Q	L	158
		PI-C-ANTI																																							
pistillata	T	F	Q	L	Q	Q	E	M	A	I	A	S	N	A	R	G	M	M	M	R	D	H	D	G	Q	F	G	Y	185	
globosa	Q	F	K	L	R	Q	M	H	L	D	P	M	N	D	N	V	M	E	S	C	A	V	Y	D	H	H	H	Q	N	I	A	D	Y	E	A	Q	M	P	F	200	
FBP 1	N	C	Q	L	R	Q	L	E	I	A	T	M	N	R	N	M	G	E	I	G	E	V	F	Q	Q	R	E	N	H	D	Y	Q	N	H	.	.	.	M	P	F	195
		PI-C-ANTI																																							
pistillata	.	.	R	V	Q	P	I	Q	P	N	L	Q	E	K	I	M	S	L	V	I	D	208
globosa	A	F	R	V	Q	P	M	Q	P	N	L	Q	E	R	F	215
FBP 1	A	F	R	V	Q	P	M	Q	P	N	L	Q	E	R	L	210

תמונה 1: השוואת רצפי חומצות אמינו בין אורטולוגים של הגן PISTILLATA משלושה מיני צמחים שונים למציאת אזורים שמורים המייחדים אתהגן מיתר חברי קבוצת ה-MADS box. רצפים של שלושת האורטולוגים הרצופים בזה הושוו תוך שימוש בתוכנה DNAMAN: הגן PI ששובט מארבידופסיס (P48007), הגן GLOBOSA ששובט מלוע הארי (CAA48725) והגן FBP1 ששובט מפטוניה (Q03488). רצף הקונצנזוס MADS box מסומן בחץ שחור ורצף הקונצנזוס K domain מסומן בחץ ירוק. פריימרים מורכבים תוכנו על סמך רצפים שמורים ב I domain ובקצה ה C טרמינלי. רצף חומצות האמינו מהם תוכנן הפריימר PI-B-SENSE מסומן באדום ורצף חומצות האמינו מהם תוכנן הפריימר PI-C-ANTI מסומן בכחול.

פריימרים אלו שימשו לאמפליפיקציה של מקטעים מתאימים תוך שימוש ב-cDNA מתפרחת בלבד ומקטעים אלו שובטו ורוצפו. על פי הרצף של של האמפליקונים שהתקבלו הוכח כי הגנים ששובטו הם VitPI שהוא האורטולוג לגן PISTILLATA(P1) מארבידופסיס והגן VitAG שנמצא כאורטולוגי לגן (AG) AGAMOUS. דגם הביטוי של הגנים האמורים ברקמות גפן שונות נבדק באמצעות אנליזות Northern על מנת לבחון אם אכן הוכיח כי מדובר במקטע ספציפי לתפרכת. בתמונה 4 ניתן לראות את תוצאות האנליזה עבור הגן VitAG, בתמונה 5 ניתן לראות את האנליזה עבור VitP1 ובתמונה 6 אפשר לראות את האנליזה עבור VitAP1.

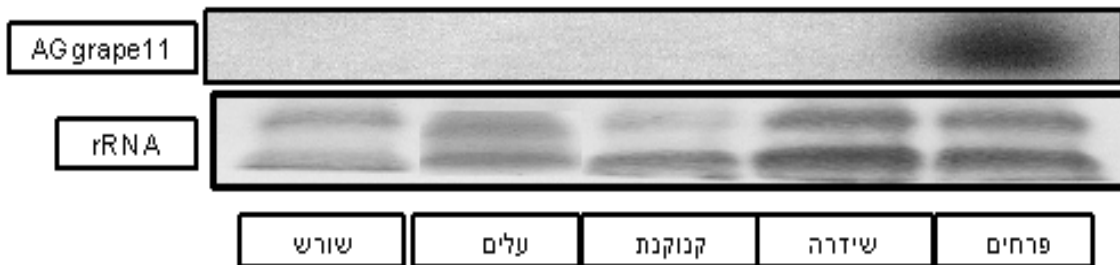
					MADS		
PLE	. . . M E F P N Q D S E S L R K N G R G K I E I K R I E N T T N R Q V T F C K R						37
AG	M A Y Q S E L G G D S S P L R K S G R G K I E I K R I E N T T N R Q V T F C K R						40
pMADS 3	M E F Q S D L T R E I S P Q R K L G R G K I E I K R I E N T T N R Q V T F C K R						40
PLE	R N G L L K K A Y E L S V L C D A E V A L V V F S S R G R L Y E Y A N N S V R A						77
AG	R N G L L K K A Y E L S V L C D A E V A L I V F S S R G R L Y E Y S N N S V K G						80
pMADS 3	R N G L L K K A Y E L S V L C D A E V A L T V F S S R G R L Y E Y A N N S V K A						80
					AG - A, SENSE	K domain	
PLE	T I E R Y K K A S A D S S N S V S T S E A N T Q E F Y Q Q E A N K L R R Q I R E I						117
AG	T I E R Y K K A I S D N S N T G S V A E I N A Q Y Y Q Q E S A K L R Q Q I I S I						120
pMADS 3	T I E R Y K K A C S D S S N T G S I A E A N A Q Y Y Q Q E A S K L R A Q I G N X						120
PLE	Q T S N R Q M L G E G V S N M A L K D L K S T E A K V E K A I S R I R S K K N E						157
AG	Q N S N R Q L M G E T I G S M S P K E L R N L E G R L E R S I T R I R S K K N E						160
pMADS 3	Q N Q N B N F L G E S L A A L N L R D L R N L E Q K I E K G I S K I R A K K N E						160
PLE	L L F A E I E H M Q K R E L E L H N A N M F L R A K I A E G E R A Q Q Q M N . L						196
AG	L L F S E I D Y M Q K R E V D L H N D N Q I L R A K I A E N E R N . N P S I S L						199
pMADS 3	L L F A E I E Y M Q K R E I D L H N N N Q Y L R A K I A E T E R S . Q Q M N . L						198
PLE	M P G S D Y Q P M T S . . . Q S . Y D V R N F L P M N L M E P N Q Q Y S R H						231
AG	M P G G S N Y E Q L M P P P Q T Q S Q F D S R N Y F Q V A A L Q P N N H H Y S						239
pMADS 3	M P G S S S Y D L V . . P P Q Q S . . F D A R N Y L Q V N G L Q T N N H Y P .						232
					AG - D, ANTI		
PLE D Q T A L Q L V						239
AG	S A G R Q D Q T A L Q L V						252
pMADS 3	. . . R Q D Q P P L Q L V						242

תמונה 2: השוואת רצפי חומצות אמינו בין אורטולוגים של הגן AGAMOUS משלושה מיני צמחים שונים למציאת אזורים שמורים המייחדים את הגן מיתר חברי קבוצת ה-MADS box. נעשתה השוואה בעזרת התוכנה DNAMAN בין האורטולוגים: הגן AG ששובט מארבידופסיס (1612343A), הגן PLE ששובט מלוע הארי (A44343) והגן pMADS3 ששובט מפטוניה (CAA51417). רצף הקונצנזוס MADS box מסומן בחץ שחור ורצף הקונצנזוס K domain מסומן בחץ אפור. פריימרים מורכבים תוכננו על סמך רצפים הומולוגים בין שלושת הגנים ב-K domain ובקצה ה-C טרמינלי. רצף חומצות האמינו מהם תוכנן הפריימר AG-A, SENSE. מסומן באדום ורצף חומצות האמינו מהם תוכנן הפריימר AG-D, ANTI מסומן בכחול.

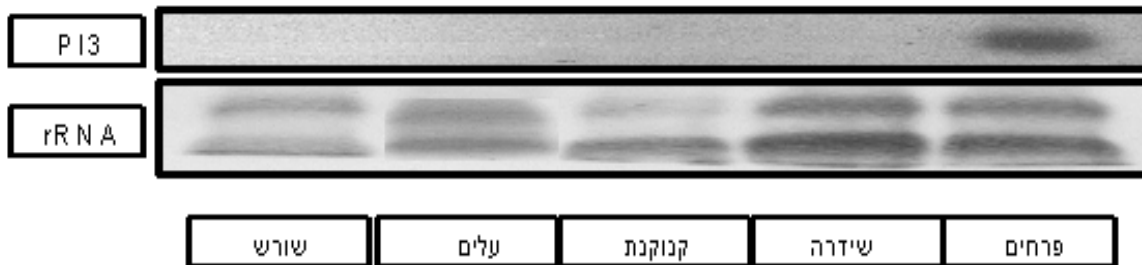
על פי דגם הביטוי של הגנים האמורים ברקמות גפן נמצא ביטוי מהגן VitAG בפרחים ובפירות, ביטוי של VitAP1 בקונקות, שדרות, פרחים וביטוי הגן VitPI ו-VitAG בפרחים בלבד. אנליזה נוספת תוך שימוש ב-Real Time PCR הראתה תמונה זיה לגבי VitP1, אולם עבור VitAG נמצא ביטוי גם בפרות ובמידה זניחה גם בעלים. בשורשים, בקונקות ובשידרות לא נראה ביטוי הגן כלל (תמונה 7). במהלך העבודה שובטו ופורסמו שלושת הגנים על ידי קבוצת מחקר אוסטרלית וספרדים וככלל תוצאותיהם חופפות לתוצאותינו. זוגות הפריימרים לגביהם הוכח כי הם ספציפיים לתפרכת נבחרו לשמש ככלי יעיל לבחינת מועד תחילת ההתמיינות של הפרחים במהלך התפתחות מריסטמת האשכול. כלי זה עשוי לאפשר לבחון את השפעת הטמפרטורה והטיפול בציאנמיד חומצי על התפתחות הפרחים בהשוואה לטיפול בקורת.

	MADS																																									
AP 1	M	G	R	G	R	V	Q	L	K	R	I	E	N	K	I	N	R	Q	V	T	F	S	K	R	R	A	G	L	L	K	K	A	H	E	I	S	V	L	C	D	40	
squamosa	M	G	R	G	K	V	Q	L	K	R	I	E	N	K	I	N	R	Q	V	T	F	S	K	R	R	G	G	L	L	K	K	A	H	E	I	S	V	L	C	D	40	
FBP 26	M	G	R	G	R	V	Q	L	K	R	I	E	N	K	I	N	R	Q	V	T	F	S	K	R	R	S	G	L	L	R	K	A	H	E	I	S	V	L	C	D	40	
AP 1	A	E	V	A	L	V	V	F	S	H	K	G	K	L	F	E	Y	S	T	D	S	C	M	E	K	I	L	E	R	Y	E	R	Y	S	Y	A	E	R	Q	L	80	
squamosa	A	E	V	A	L	I	V	F	S	N	K	G	K	L	F	E	Y	S	T	D	S	C	M	D	R	I	L	E	K	Y	E	R	Y	S	F	A	E	R	Q	L	80	
FBP 26	A	E	V	G	L	I	V	F	S	T	K	G	K	L	F	E	Y	S	T	D	S	C	M	E	R	I	L	E	R	Y	E	R	Y	S	Y	A	E	R	Q	L	80	
AP 1	I	A	P	E	S	D	V	N	T	N	W	S	M	E	Y	N	R	.	L	K	A	K	I	E	L	E	R	N	Q	R	H	Y	L	G	E	D	L	Q	A	119		
squamosa	V	S	N	E	P	Q	S	P	A	N	W	T	L	E	Y	S	K	.	L	K	A	R	I	E	L	L	Q	R	N	H	R	H	Y	M	G	E	D	L	D	S	119	
FBP 26	S	G	A	T	D	N	D	T	P	G	S	W	T	L	E	H	A	K	.	L	K	A	R	L	E	V	L	Q	R	N	Q	K	H	Y	A	G	E	D	L	D	S	120
AP 1	M	S	P	K	E	L	Q	N	L	E	Q	Q	L	D	T	A	L	K	H	I	R	T	R	K	N	Q	L	M	Y	E	S	I	N	E	L	Q	K	K	E	K	159	
squamosa	M	S	L	K	E	I	Q	S	L	E	Q	Q	L	D	T	A	L	K	N	I	R	T	R	K	N	Q	L	L	Y	D	S	I	S	E	L	Q	H	K	E	K	159	
FBP 26	L	S	M	K	E	L	Q	N	L	E	Q	Q	L	D	S	A	L	K	Q	I	R	S	R	K	N	Q	L	M	H	E	S	I	S	E	L	Q	K	K	D	K	160	
AP 1	A	I	Q	E	Q	N	S	M	L	S	K	Q	I	K	E	R	E	K	I	L	R	A	Q	Q	E	Q	W	D	Q	Q	N	Q	G	H	N	M	P	P	P	L	199	
squamosa	A	I	Q	E	Q	N	T	M	L	A	K	K	I	K	E	K	E	K	E	I	A	Q	Q	P	Q	W	E	H	H	R	H	H	T	H	A	S	I	M	P	P	199	
FBP 26	A	L	Q	E	Q	N	N	K	L	S	K	Q	V	K	E	R	E	K	E	L	A	Q	Q	S	Q	W	E	P	Q	S	H	D	L	N	S	S	F	V	L	200		
AP 1	P	P	Q	Q	H	Q	I	Q	H	P	Y	M	L	S	H	Q	P	S	P	F	L	N	M	G	G	L	Y	Q	E	D	D	P	M	A	M	R	R	N	D	L	239	
squamosa	P	P	Q	Y	S	M	A	P	Q	F	P	C	I	N	V	G	N	T	Y	E	G	E	G	A	N	E	R	R	N	E	L	231
FBP 26	S	Q	P	L	N	S	L	H	L	G	E	A	Y	P	S	A	G	D	N	G	E	V	E	G	S	S	R	Q	Q	P	P	N	T	V	M	P	P	W	M	L	240	
AP 1	E	L	T	L	E	P	V	Y	N	C	N	L	251	
squamosa	D	L	T	L	D	S	L	Y	S	C	H	L	G	C	F	A	A	248		
FBP 26	R	H	L	N	G	245		

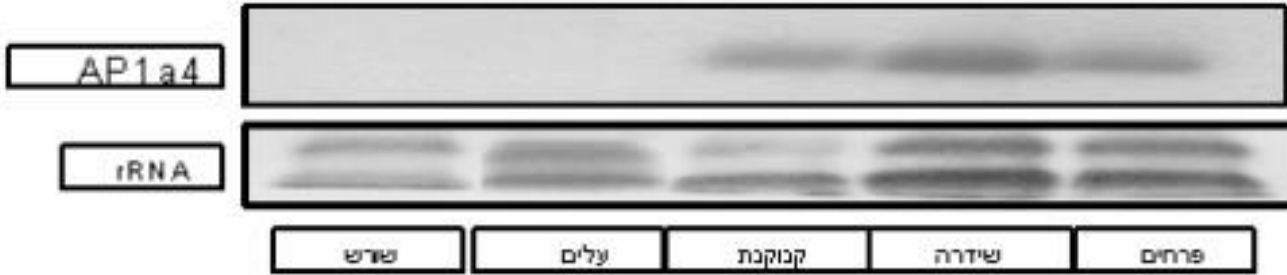
תמונה 3: השוואת רצפי חומצות אמינו בין אורטולוגים של הגן APETALA1 משלושה מיני צמחים שונים למציאת אזורים שמורים המייחדים את הגן מיתר חברי קבוצת ה-MADS box. רצפים של שלושת האורטולוגים הרצופים בזה השונו תוך שימוש בתוכנה DNAMAN: הגן AP1 מארבידופסיס (CAA78909), הגן SQUAMOSA מלוע הארי (CAA45228) והגן FBP26 מפטוניה (AAQ72503). רצף הקונצנזוס MADS box מסומן מעל לרצף הרלוונטי בחץ שחור ורצף הקונצנזוס K domain מסומן בחץ ירוק בהתאמה. פריימרים מורכבים תוכנו בתוכנת H.C. primers על סמך רצפים הומולוגים בין שלושת הגנים בקצה ה-C טרמינלי. רצף חומצות האמינו מהם תוכנן הפריימר AP1-SENSE מסומן באדום ורצף חומצות האמינו מהם תוכנן הפריימר AP1-ANTI מסומן בכחול.



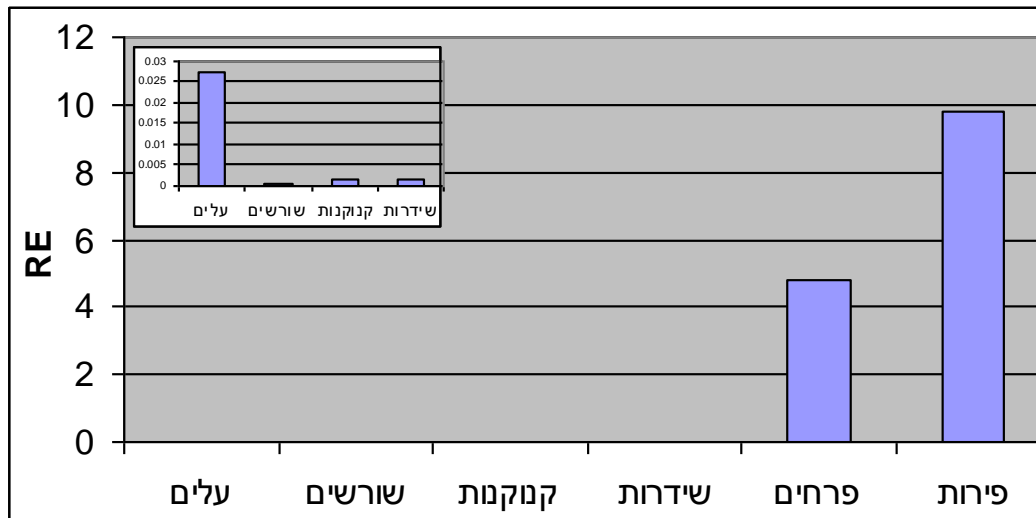
תמונה 4: אנליזת Northern לבדיקת רמת תעתיק VitAG ששובט מגפן בדגימות mRNA מרקמות שונות בגפן מזן 'פרלטי'.



תמונה 5: אנליזת Northern לבדיקת רמת תעתיק VitPI ששובט מגפן בדגימות mRNA מרקמות שונות בגפן מזן 'פרלטי'.

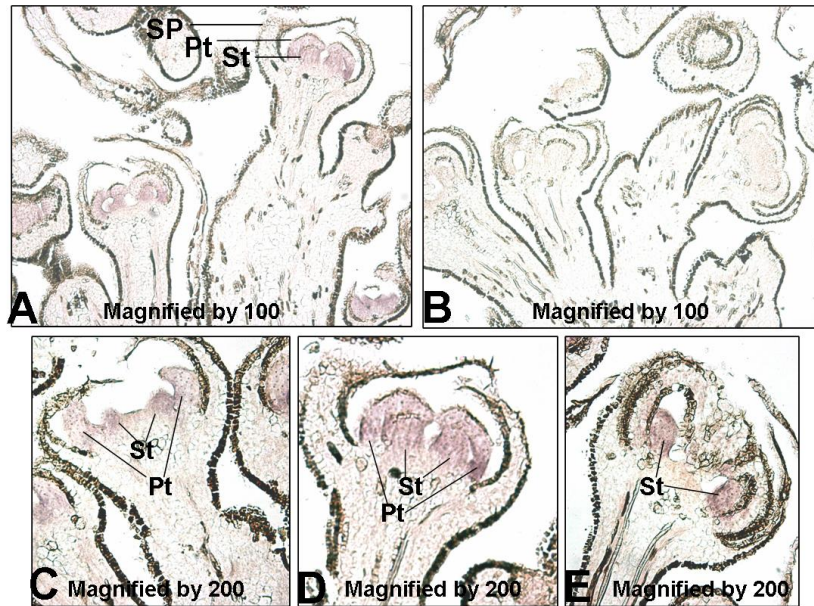


תמונה 6 : אנליזת Northern לבדיקת רמת תעתיק VitAP1 בדגימות mRNA מרקמות שונות בגפן מזן 'פרלט'.



תמונה 7 : אנליזת Real Time PCR לקביעת ביטוי יחסי של הגן VitAG ברקמות שונות בגפן מזן 'פרלט'. בתמונה הקטנה מוצג ביטוי הגן בעלים בהשוואה לביטוי בקנוקנות, שידרות ושורשים בלבד.

בשנה השנייה נערכה אנליזת In Situ תוך שימוש בחתכי פרח מתפרחות שלבי התפתחות שונים על מנת לזהות את אתר הביטוי בפרח של הגן המקדד ל VitPI. מן התוצאות ניתן לראות ביטוי ספציפי בעלי הכותרת והאבקנים בלבד בפרחים צעירים מאד בהם האבקנים בשלבי גדילה ראשוניים ובפרחים בשלב מאוחר יותר בו עלי הכותרת נפגשים ליצירת ה- Calyptera (תמונה 8). בפרחים בוגרים יותר נראה כי ביטוי הגן VitPI נעלם מעלי הכותרת המאוחים בקצותיהם וביטוי נראה באבקנים בלבד. בפרחים בוגרים שהשלימו את התמיינות האיברים לא ניתן היה להבחין בביטוי הגן בגלל צבעי רקע שמקורם בפרחים בשלבים אלו. לפיכך, למרות שביטוי הגן לא נראה בשחלה בשלבים מוקדמים לא ניתן לשלול ביטוי באיבר זה בשלבים מאוחרים יותר. על פי אנליזה זו נראה שביטוי הגן VitPI ספציפי לאברי הפרח כפי שדווח לגבי הומולוגים של גן זה בצמחים אחרים. במסגרת שותפות עם קבוצת מחקר איטלקית קבלנו שבט BAC הכולל את הגן VitPI ורצפנו את כל מסגרת הקריאה שלו וכ 1200 בסיסים מן הפרומוטור שלו. אנליזה של רצף זה כנגד רצפי הפרומוטורים של ההומולוגים מלוע ארי ומארבידופסיס העלתה את קיומם של אתרים שמורים (תמונה 10). אתרים שמורים אלו ידועים כאזורי קישור על גבי ה DNA לחלבוני שיעתוק. ישנן הוכחות בספרות כי חלבונים ממשפחת ה MADS box



תמונה 8: אנליזת *In situ* לבחינת אתר הביטוי VitP1 במהלך התפתחות הפרח. A ו-B: פרחים צעירים בשלב (1). A, היברידיזציה עם anti sense של שבת VitP1 (393 בסיסים) מסומן בדיוקסיגנין. עלי כותרת (SP), עלי גביע (Pt), אבקנים (St). B, היברידיזציה עם sense של שבת VitP1 (393 בסיסים). C ו-D, תקריבי פרחים משלב (1) מהיברידיזציה עם anti sense. E, תקריבים מפרחים בשלב (2) מהיברידיזציה עם anti sense.

```

1   ACAATTTTTCGAACAAAAAGAAAAACATGAAATGCACGTTTGATAATTGAAAAATTATT
61  TTTAATTATTTAAAGTTACTCTCAATTGTTTTAATTATTTTCCAAGGGTATTTAAAAA
121 AAACACAAATATGTAAAAAATAAACATTAAATATAAATATTTTAAAAACATATTTAA
181 AAATAGATTAAAAACATTTCAAATAAATTTAATTTACAACATATTATAAAAAAATTTA
241 AAAACTATTTTTTTGAATTATTTTGAAAACATTAAGCGTAAGTGTGACATGGATTAA
301 TACATTACAAAAAATAAAATTAATGAATACATATGAAACTTGTAAAGGAAGAAATT
361 TCTCAGTTTTATCTCCTTTGCCATCTCAAACATAAGAAAAAGGATGGGAATCCTAAATA
421 AATTATTTTTATATTTTATATTTTATTATAATTGATCGTTATAAGTCGCAACAATTTGT
481 AAAAAGAAAAACCCTAGTTCCAAACTGGAAAACACATGAAAACTTCCAAACAGCATCTA
541 GGGTTACACAAGGTACAACCAATGCACCTACAAGTATAGCAGGTCACACCATGGATCCA
601 GATTGGTTTATTGATTCAAACCCAATGGTGAGCTTCTGTTTGTGACTTTGACAGTTTG
661 ACTCTGAAGATCACATTCCAATTTTGAAGTCAACACACCCAAAAACACTCCAATGTGCC
721 CTTTTCCCTTTTGACCCATTCTCATCCACATATTTATATCTGAAAAACTCCTTTAC
781 ATTTTGATTTGATGGTTAAGATCTGATTAATATACCAGTTTAGTTCCATCACTGAAAAA
841 CCCTAGACAAGACTCTCACAGACTTCTAGGGTTTAAAGTTTGAACGTTGCAAGTACCAC
901 ATGCAACACGGCCATGTTACGTATCAAAGCCACCAAGTGCTCTCTAGTCTTGTCTGT
961 TGCTTAATTGAAACCCTAACCTAAACTCCATCAATTAATATCAGTTTGATTGATTTTT
1021 TAGAGAGAAATGGGGAGAAACCCAATGGTAAGAAAGTGAAGTACTAAGCAAGCCAAA
1081 CCAAAGAGCAGATAATGGCAGTTGGCTTGGCTATGTCAACAACCCATAAACAAGTCGTCC
1141 ATTCTGTGGCTCTGGAAGTTCATTATCCCCCAACTTATATTGGA

```

תמונה 9: רצף הפרוטוטור של הגן VitP1 ב-1187 בסיסים מעל לקודון מתינון הראשון (ATG). TATA box מסומנים באפור בהיר, CAAT box מסומנים בכחול, CArG box מסומנים באפור כהה ומוטיבים לאתר קישור מסומנים במסגרת שחורה.

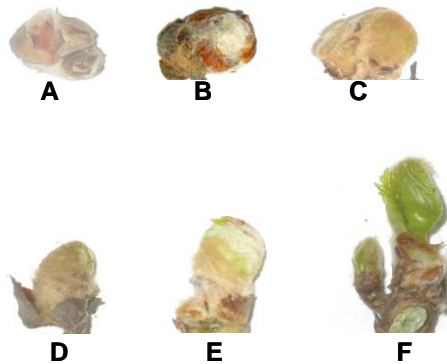
נקשרים ל CArG boxes ואילו ה- LEAFY binding site ידוע כקושר את החלבון LEAFY שהינו גן מרכזי בבקרה על התמיינות הפרח וידוע כמבקר ביטוי של הגן PI מארבידופסיס וההומולוג שלו GLO מלוע הארי.

שני אתרי GARg box נמצאו בעמדות 508- ו 686- נוקלאוטידים מקודון התחל ATG ושני אתרי קישור ל LEAFY נמצאו בעמדות 476- ו 898- נוקלאוטידים מקודון התחל. לכן, ולאתרים הקובעים את ביטוי הספציפי ברקמת הפרח עשויים להיות שימושים ביוטכנולוגיים במניפולציה של ביטוי בפרח בעתיד.

מעקב אחר ביטוי הסמנים בפקעי 'פרלט' לאורך התעוררות

בשלב זה עמדו לרשותנו שלושה גנים. הרצפים שימשו לאנליזה פילוגנטית שהצביעה על שיוכם לשלוש המשפחות הנדונות של בקרי התפתחות אברי הפרח המוכרות בצמחי מודל (תוצאות לא מובאות ממגבלת מקום) אולם דגם הביטוי שלהם חרג מהמוכר בצמחי מודל. אחד הגנים (VitPI) הוכח כסמן ספציפי לאברי הפרח מעבר לכל ספק. בסמן השני (AG) המתבטא ברקמת פרח ופרי ניתן להשתמש במחקר על רקמת פקע כסמן להתפתחות רקמת פרח משום שאין בפקע רקמת פרי. השאלה אם ניתן להשתמש ב-AP כסמן לרקמת הפרח נדונה על רקע התבטאותו גם בקנוקנות ובשדרות וההנחה שהנחה היא שמאחר שרקמת השדרה והקנוקנות התמיינו בעיקר בקיץ הקודם הרי שעלייה ברמה בולטת ברמת הטרנסקריפט תעיד בעיקר על אינדוקציה של התפתחות הפרח.

לשם מעקב אחר התפתחות הפרחים על גבי התפרחת על הגפן השלמה בתנאי הכרם נדגמו כבר בשנה הראשונה פקעים בכרם 'פרלט' מסחרי אחת לשבוע, למשך מספר שבועות, מעמדות 1 - 4 הידועות כפוריות בזן זה. מועד הדגימה הראשון היה ב- 4 לינואר כאשר הפקעים היו בתרדמה מלאה. ב- 21 לינואר נזמרו שתי שורות לאחר איסוף הפקעים, כאשר שורה אחת רוססה ב- 5% 'דורמקס' לשבירת התרדמה ושורה שניה רוססה במים ושמשה כביקורת. ניתן לחלק את הדגימות שנאספו לשלוש קבוצות: פקעים בתרדמה, פקעים בשלב תפיחה ופקעים בהם פרץ קודקוד הצימוח (תמונה 10). בעקבות הריסוס בשובר תרדמה קיימת שונות בהתפתחות הפנולוגית בין השורה המרוססת ושורת הביקורת (טבלה 1).



תמונה 10: מצבים פנולוגיים של הפקעים בשלבי הבחינה השונים

(A) dormant bud, (B), swelling bud, (C) advance swelling bud, (D) beginning of bud burst. (E) bud burst, (F) crown stage.

על מנת לבחון את השפעת הריסוס בשובר התרדמה על הגפנים המטופלות נערך מעקב אחר מדגם מייצג של יחורים חד פרקיים בתנאי המרצה אופטימלים בחדר גידול. במסגרת זו נלקחו תשע קבוצות בנות עשרה יחורים חד פרקיים מהשורה המרוססת ומשורת הביקורת לאחר ריסוס הגפנים ב- 5% 'דורמקס' ב- 21 לינואר. יחורים חד פרקיים אלו הוצבו בתנאים אופטימליים של 23°C ו 12 שעות תאורה יומית. יחורים מהם פרץ הפקע נספרו ואחוז פקעים מתעוררים חושב לכל קבוצת ניסוי. יחורים אלו שימשו למעקב אחר קצב התעוררות. מעקב זה

הראה כי תחילת תהליך פריצת קודקוד השריג מבין קשקשי הפקעים המטופלים החלה לאחר 13 יום ממועד הטיפול. התעוררות פקעי הביקורת חלה כשבוע לאחר מכן. כלל ה-RNA הופק מהדגימות שנאספו בכרם מדי שבוע כמפורט בטבלה 1 ונשמרו ב-80°C. cDNA הוכן מדגימות אלו ושימש לאנליזות Real Time PCR בעזרת פריימרים ייחודיים לכל גן.

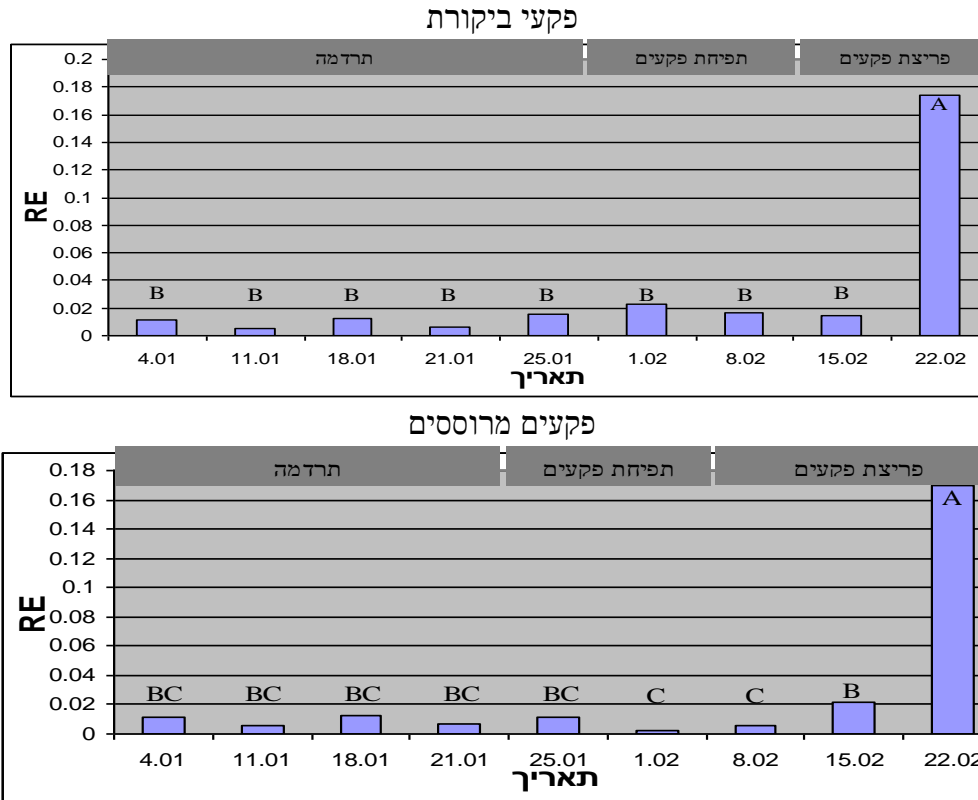
השוואת השתנות דגם הביטוי מהגן VitPI בפקעי 'פרלט' מטופלים ופקעי בקורת במהלך ההתעוררות
 על פי אנליזת Real Time PCR (תמונה 11) ניתן לראות כי ביטוי הגן VitPI בפקעי 'פרלט' מטיפול הביקורת אפסי בפקעים רדומים ובתחילת תהליך ההתעוררות (4.01, 11.01, 18.01, 21.01, 25.01, 1.02, 8.02 ו-15.02), כאשר רמת תעתיק הגן נשארת קבועה פחות או יותר והיא סביב 0.01 RE. מעט לאחר תחילתו של תהליך פריצת הפקעים (בתאריך 15.02) ישנה עליה מועטת ברמת תעתיק הגן ל 0.02 RE אך רמה זו אינה נבדלת מדגימות מוקדמות. רק בשלב מתקדם של פריצת הפקעים (22.02) עולה רמת התעתיק מהגן ל RE 0.17 וביטוי זה גבוה באופן מובהק מהביטוי במועדי דגימה קודמים. אנליזה דומה שנערכה עם פקעים מטופלים בשנה השנייה הראתה עלייה כבר ב-15 לפברואר, אם כי לא מובהקת, ודגם כללי דומה לזה שתואר עבור פקעי הבקורת. על פי הנתונים שתוארו מעל נראה שהעלייה בביטוי מהגן מוגבלת לשלב פריצת הפקעים. טבלה 1: תאור פנולוגי של פקעים שנדגמו מגפנים מטופלות בציאנמיד חומצי וגפני בקורת במהלך התרדמה והיציאה מתרדמה.

Date	Phenological description
4 Jan	Dormant buds (Fig 10A)
11 Jan	Dormant buds (Fig10 A)
18 Jan	Dormant buds (Fig10 A)
21 Jan	Dormant buds (Fig10 A) pruning and spraying with HC and water.
25 Jan	HC Buds become swollen (Fig10 B)
	Control Dormant buds (Fig10 A)
1 Feb	HC Advance swelling (Fig10 C)
	Control Buds become swollen (Fig10 B)
8 Feb	HC Beginning of bud burst (Fig10D)
	Control Advance swelling (Fig10 C)
15 Feb	HC Bud burst (Fig10 E)
	Control Beginning of bud burst (Fig10 D)
22 Feb	HC Crown burst (Fig10 F)
	Control Bud burst (Fig10F)

השוואת השתנות דגם הביטוי מהגן VitAG ששובט מגפן בפקעי 'פרלט' מטופלים ופקעי בקורת לאורך התעוררות

רמת ביטוי הגן VitAG ששובט מגפן בפקעי 'פרלט' בזמן תרדמה ולאורך ההתעוררות בכרם נבדקה באנליזת Real Time PCR בדומה למתואר עבור רמת הביטוי של VitP1 ועבור אותה סדרת דגימות של חומר צמחי. על פי תוצאות אנליזת Real Time PCR (תמונה 12) רמת תעתיק הגן VitAG בפקעי 'פרלט' מטיפול הביקורת נמוכה כאשר הם נמצאים בשלב תרדמה ועומדת על ערך של 0.005 RE. רמת הביטוי נשארת נמוכה גם במהלך תפיחת הפקעים ופריצתם, אך עולה במקצת ומגיעה ל RE 0.009 (בתאריכים: 1.04 – 15.04). רק בשלב מאוחר של פריצת פקעים מתקדמת, בתאריך 22.02, תועדה עליה ברמת ביטוי הגן הנבדלת באופן מובהק מדגימות קודמות ועומדת על RE 0.05. רמת התעתיק בפקעים המטופלים אינה עולה באופן בולט במהלך תפיחת הפקעים (בתאריכים: 4.01 – 8.02). קפיצת מדרגה בולטת המביאה את רמת התעתיק ל RE 0.014 חלה עם פריצת הפקעים בתאריך 15.02, שבוע לפני העלייה בביטוי בפקעי הביקורת, ועלייה מובהקת נוספת מביאה את רמת התעתיק ל RE 0.034 בתאריך 22.02.

ביטוי הגן VitPI בפקעי פרלט



תמונה 11: השוואת השתנות רמת התעתיק מהגן VitPI בפקעי 'פרלט' מטופלים ופקעי בקורת במהלך התעוררות הפקע. אנליזת Real Time PCR נעשתה לדגימות פקעים ודגימות מקודקודי צימוח שפרצו מהפקע לאחר היציאה מתרדמה. דגימות מתאריכים: 4.01, 11.01, 18.01 ו 21.01 נאספו לפני ריסוס ודגימות אלו משותפות לגפנים מרוססות ולגפני הביקורת. הריסוס נעשה ב-21.1. מכל הפקע RNA הוכנו באופן בלתי תלוי שתי דגימות cDNA. מכל דגימת cDNA נערכו שתי ריאקציות באותו סבב של Real Time PCR. השוואת נתוני הריאקציה לעקומת כיוול שנערכה עם מיהולי cDNA משתנים נתנה ערך יחסי של רמת תעתיק הגן בדוגמא. נימול תוצאות נעשה על ידי חלוקה ברמת תעתיק מהגן הריבזומלי 18S שנבדק במקביל באותו סבב של Real Time PCR. אותיות שונות המוצגות מעל עמודות מציינות שונות סטטיסטית ברמת מובהקות של 0.05. על פי התאור הפנולוגי הפקעים מחולקים לשלוש קבוצות. אותיות שונות המוצגות מעל עמודות מציינות שונות סטטיסטית ברמת מובהקות של 0.05.

מעקב אחר ביטוי הגן VitAP1 ששובט מגפן בפקעי 'פרלט' מטופלים ופקעי בקורת לאורך התעוררות

בניגוד למתואר עבור שני הגנים האחרים בחינת רמת התעתיק VitAP1 במהלך ההתעוררות הצביעה על עלייה בביטוי מהגן כבר בשלב תפיחת הפקעים, מספר שבועות לפני פריצת הפקע (תמונה 13) בדומה לממצאים שהוצגו עבור 'טמפרניו' על ידי קבוצת מחקר ספרדית (Calonje et al., 2004). ב-25.01, כשבוע לאחר הזמירה, נראתה עלייה מסוימת של רמת התעתיק בפקעי הביקורת אם כי מבחינה פנולוגית לא נראה עדיין כל שינוי והפקעים הוגדרו כנמצאים בתרדמה. חשוב להבחין כי בשבוע שלאחר מכן הפקעים תפחו, ממצא המעיד כי תהליך ההתעוררות החל. מאחר ומדובר בתהליך רצוף, וכמו כן קיימת מגבלת הייצוג של דגימה הנלקחת אחת לשבוע, יתכן כי מועד איסוף הפקעים ב-25.01 קרוב לייצג את שלב תפיחת הפקעים.

גם בפקעים המרוססים נמצאה עלייה בביטוי הגן VitAP1 ב-25.01, בהם נראתה תפיחה ברורה במועד זה. תוצאות אלו עשויות להעיד על כך שבקרת הביטוי מהגן בשלב התפיחה נובעת מתהליך התפתחותי החל בפקע שאינו מושפע מהטיפול. בהתאמה יצוין כי על פי הספרות תפיחת הפקעים מקורה בשלב הראשון בספיחת מים על ידי הפקע עם היציאה מתרדמה, ושינוי פנולוגי זה אינו מלווה בשינויים המעידים על גדילת פרימורדית

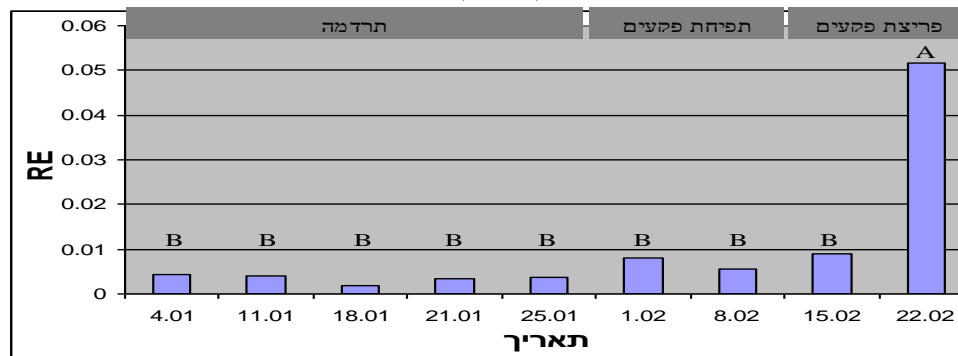
השריג בפקע. העובדה כי במהלך תפיחת הפקעים אין עלייה משמעותית ברמת תעתיק מרמזת כי תהליכי גדילה אינטנסיביים טרם החלו.

עלייה משמעותית ברמת התעתיק VitAP1 חלה בפקעים המטופלים עם פריצת הפקעים ב- 8.02. פריצת הפקעים בפקעי הביקורת חלה כשבוע לאחר מכן ובהתאמה חלה אז עלייה משמעותית ברמת התעתיק VitAP1. יוזכר כי מגמה דומה של הקדמה של שבוע בעלייה בביטוי מהפקעים המרוססים נמצאה גם עבור VitPI ו-VitAG אם כי היא אינה שונה סטטיסטית מדגימות קודמות. עליה זו מצביעה על הקדמה של שבוע בתהליכי התמיינות אברי הפרח בגפנים המרוססות. ככלל, ניתן להצביע על שלושה שלבים בביטוי הגן בפקעים מטופלים ופקעי בקורת: נמוך בזמן התרדמה, גבוה יותר בזמן התפיחה וגבוה בכארבעה סדרי גודל בשלב הפריצה.

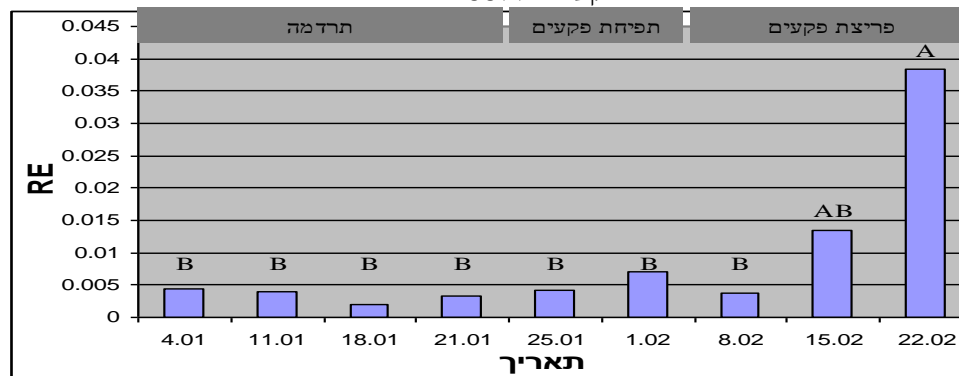
ככלל, הנתונים שהובאו מצביעים על קורלציה בין פריצת הפקעים לעלייה בביטוי משלושת סמני התפתחות הפרח ומציעים כי תהליך התמיינות אברי הפרח מתחיל עם פריצת הפקע. על בסיס זה ניתן להסביר בקלות גם את העובדה כי הופעת הסיגנל חלה בתאריך מוקדם יותר בפקעים מטופלים בהשוואה לפקעי הבקורת וזאת משום ששבירת התרדמה המלאכותית מובילה להפעלה מוקדמת יותר של פעילות פרימורדיות הנצר. השפעתו של הטיפול בציאנמיד חומצי על הקדמת הביטוי בקורלציה עם הקדמת פריצת הפקעים עשויה לרמוז כי השחרור מתרדמה משפיע על האות המאפשר תחילתו של תהליך התפתחות פרימורדיית הפרח.

ביטוי הגן VitAG בפקעי פרלט

פקעי ביקורת



פקעים מרוססים



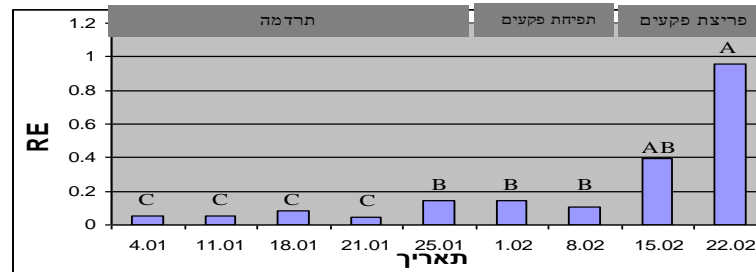
תמונה 12: השוואת רמת תעתיק הגן VitAG ששובט מגפן בפקעי 'פרלט' מטופלים ופקעי בקורת לאורך התעורות הפקע. פרטי הניסוי זהים למתואר בתמונה 11.

נראה כי מלבד השונות הפנולוגית בין שתי הקבוצות שנבחנו, הנובעת מקצב התעוררות שונה שמקורו בריסוס ה'דורמקס', מהלך התפתחות הפרחים על גבי התפרחת דומה. מן הדמיון בדגם הביטוי של הגנים השונים בפקעי הטיפול והביקורת ורמת הביטוי הדומה מהגנים הנבחנים בין שתי הקבוצות הנבחות ניתן להניח כי ריסוס ב'דורמקס' במועדים מאוחרים אינו פוגע בהתפתחות אברי הפרח כפי שנבחנה באמצעות הסמנים האמורים. למעשה, הנתונים המובאים מצביעים על פער זמנים משמעותי של שבועות בין מועד פעולתו הישיר של הציאנמיד, 1-2 ימים ממועד הריסוס (ע"פ ממצאים רבים שברשותנו) לבין מועד התמיינות הפרח בזמן הפריצה.

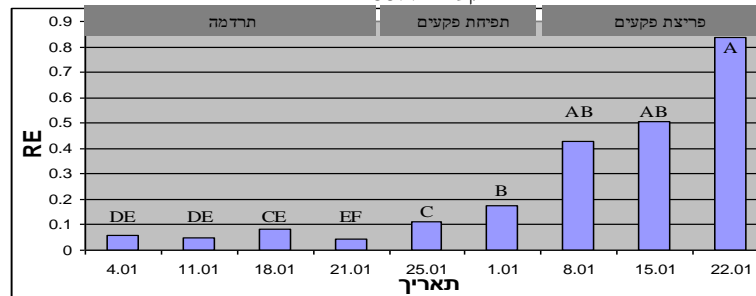
על פי נתונים ממחקרים שבצענו בעבר טיפול בציאנמיד עשוי לפגוע במבנה האשכול. טיפול שהתבצע במועד מוקדם יחסית (אמצע דצמבר) הוביל לקבלת אשכולות קטנים, פחות מסועפים ומעוטי גרגרים בהשוואה לאשכולות שהתקבלו מגפנים שרוססו חודש לאחר מכן (Or et al. 1999). הסיבה לפגיעה בגודל האשכול אינה ברורה. בהקשר זה עולה השאלה אם גם תהליך השלמת הסתעפות ציר האשכול חל לאחר שבירת התרדמה והאם הוא עשוי להיות רגיש לציאנמיד שמוביל לסיעוף דל יותר המתבטא גם במספר פרחים קטן יותר. יצוין כי ההנחה הראשונית לגבי קבילותו של AP כסמן צריכה להבחן מחדש לאור הנתונים המצביעים על עלייה בביטוי זמן רב לפני שני הסמנים האחרים. על רקע העובדה שבצמחי מודל אחרים הוראה ביטוי סימולטני משלושת הסמנים בזמן התפתחות הפרח לא סביר שהביטוי המוקדם של AP נובע מהתחלה של תהליך התמיינות אברי הפרח, מה גם שהוא לא מתבטא בעלי הגביע על פי נתוני הקבוצה הספרדית. לחלופין, אנו מניחים כי הביטוי המוקדם קשור באקטיבציה של תהליך סיעוף שדרת התפרחת הקודם לשלב הסופי של התמיינות הפרחים. זיהוי של אינטראקטורים עם הטרנסקריפט של AP עשוי במקרה כזה לקרב אותנו להבנת בקרת הסיעוף שאחראית לגודלו הסופי של האשכול ולבחינת השפעתו האפשרית של הציאנמיד על שלב זה.

ביטוי הגן VitAP1 בפקעי פרלט

פקעי ביקורת



פקעים מרוססים

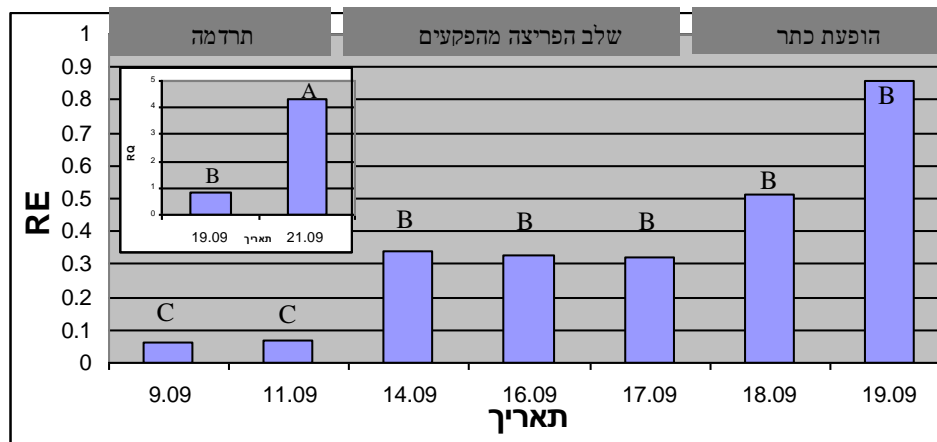


תמונה 13: רמת תעתיק הגן VitAP1 ששוטב מגפן בפקעי 'פרלט' מטופלים ופקעי בקורת לאורך התעוררות הפקע. פרטי הניסוי זהים למתואר בתמונה 11.

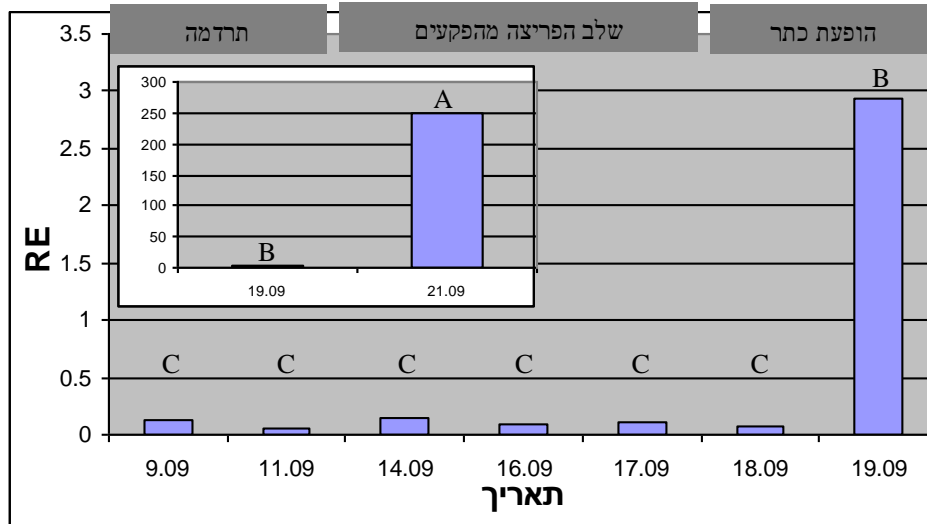
על פי הממצאים ב'פרלט' נראה כי התמיינות חלקי הפרח חלה לאחר פריצת הפקע אולם מבחינה פנולוגית עשויה להיות שונות בין זנים במועד התפתחות הפרחים. שאלה זו של שונות הובילה לבחינת התהליך

בסולטנינה. על בסיס התוצאות המוצגות בתמונות 14-16 שהתקבלו עבור שלושת הגנים מתקבלת תמונה דומה לזו שתוארה מעל לגבי פקעי פרלט לפיה העלייה בביטוי הגן VitAP1 החלה ראשונה, בסיום שלב התפיחה ולקראת הפריצה מהפקעים. עלייה נוספת, משמעותית יותר, בביטוי הגן VitAP1 החלה במקביל לעלייה בביטוי שני הגנים האחרים VitPI ו VitAG. ככלל נראה כי התמיינות הפרחים על גבי התפרחת בסולטנינה חלה בשלב פנולוגי מאוחר יותר מזו שהובחנה בפרלט והושלמה רק בסיום תהליך הפריצה ובשלב פרישת הכתר. העובדה כי בפקעי 'פרלט', מטופלים ובלתי מטופלים, ובפקעי סולטנינה הביטוי מהגן VitAP1 מקדים את הביטוי משני הגנים האחרים תומכת בהנחה כי תהליך סיעוף שידרת התפרחת חל בשלב התפיחה ואילו התמיינות הפרחים חלה בשלב מאוחר יותר.

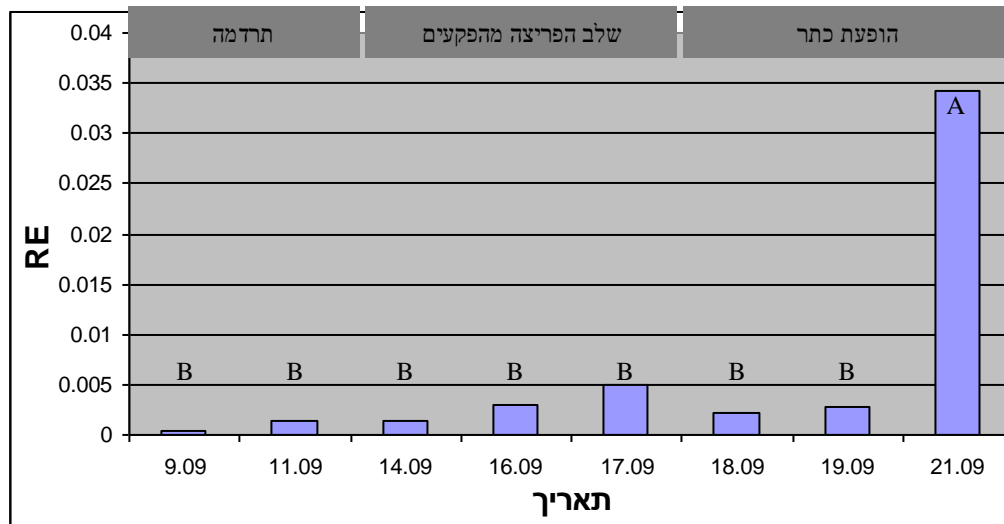
נערך נסיון שדה דומה לזה שתואר עבור פרלט בכרם מהזן סופיריור שבו אופיין דגם הפוריות בזן סופיריור והוגדרו עמדות פוריות (פקעים תחתונים) ועמדות לא פוריות (פקעים עליונים). איסוף פקעים מטופלים ופקעי בקורת נערך בנפרד עבור עמדות פוריות ובלתי פוריות בשלבים שונים של התפתחות הפקע. בהמשך יבחן דגם ביטוי הגנים המדווחים גם בזן זה ועל בסיס הידיעה של עיתוי ביטויים ניתן יהיה לבחון בכלים גנומיים תהליכים החלים לפני התמיינות הפרח ומעורבים אולי בבקרת תהליך זה ובהסתעפות שקודמת לה וקובעת ככל הנראה את גודלו הסופי של האשכול. השוואה בו זמנית בין פקעים מטופלים לפקעי בקורת בעמדות פוריות ולא פוריות מספקת מערכת מאד מבוקרת שיכולה ללמד לגבי השלב ההתפתחותי של סיום התמיינות התפרחת. המידע על עיתוי ההתמיינות יאפשר לנו להתמקד בתקופה הרלוונטית בנסויים מבוקרים לבחינת השפעת הטמפרטורה על מבנה האשכול וכמות הפרחים באשכול.



תמונה 14: רמת תעתיק הגן VitAP1 בפקעי 'סולטנינה' לאורך התעוררות הפקע והנצת השריג בעונת הגידול השניה. אנליזת Real Time PCR נעשתה לדגימות פקעים ודגימות מקודקודי צימוח שפרצו מהפקע לאחר היציאה מתרדמה. מכל הפקת RNA הוכנו באופן בלתי תלוי שתי דגימות cDNA. מכל דגימת cDNA נערכו שתי ריאקציות באותו סבב של Real Time PCR. השוואת נתוני הריאקציה לעקומת כיוול שנערכה עם מיהולי cDNA משתנים נתנה ערך יחסי של רמת תעתיק הגן בדוגמא. נירמול תוצאות נעשה על ידי חלוקה ברמת תעתיק מהגן הריבוזומלי 18S שנבדק במקביל באותו סבב של Real Time PCR. אותיות שונות המוצגות מעל עמודות מציינות שונות סטטיסטית ברמת מובהקות של 0.05. באיור 6b מוצגת השוואה בין רמת ביטוי הגן בדוגמא של קודקוד צימוח שנדגמה עם הופעת הכתר ב- 19.09.03 לבין דוגמא של תפרחות שנאספה לאחר פרישת העלים ב- 21.09.03.



תמונה 15: רמת תעתיק הגן VitPI בפקעי 'סולטנינה' במהלך התעוררות הפקע ופריצת השריג בעונת הגידול השניה. פרטי הניסוי כמפורט בתמונה 14. עמודות המצויינות באותיות שונות נבדלות סטטיסטית זו מזו ברמת מובהקות של 0.05. על פי התאור הפנולוגי חולקו דוגמאות לשלוש תקופות התפתחותיות עיקריות



תמונה 16: רמת תעתיק הגן VitAG בפקעי 'סולטנינה' לאורך התעוררות הפקע ופריצת השריג בעונת הגידול השניה. פרטי הניסוי כמפורט באיור 14. עמודות המצויינות באותיות שונות נבדלות סטטיסטית זו מזו ברמת מובהקות של 0.05. דוגמאות חולקו פנולוגית לשלוש תקופות התפתחותיות עיקריות.

סיכום**מטרות המחקר לתקופת הדו"ח**

מטרת המחקר הינה ברור מועד התפתחותם של איברי הפרח על גבי פרימורדיית התפרחת בפקע ובחינת השפעות גורמים סביבתיים והורטיקולטוריים על התהליך.

עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח

איתרנו רצפים של הגנים *Agamous* ו-*Pistilata* מצמחי מודל, איתרנו אזורי רצף ייחודיים לגן הספציפי שיהיו שונים ועל בסיס אנליזה זו תוכננו פריימרים מורכבים ששימשו לאמפליפיקציה של מקטעים מתאימים. על פ הרצף של של האמפליקונים שהתקבלו אושר כי הגנים ששובטו הם האורטולוגים לשלושת הגנים. דגם הביטוי של הגנים האמורים ברקמות גפן שונות נבדק באמצעות אנליזות *Real Time PCR* ו-*Northern*. מן התוצאות עולה כי ביטוי הגן *VitPI* ספציפי לפרחים בלבד, ביטוי מהגן *VitAG* נראה בפרחים ובפירות והאורטולוג *Apatella* מתבטא בקנוקות, שדרות ופרחים. בשלב הבא שימשו הגנים המתוארים כסמנים ביוכימיים לזיהוי התמיינות אברי הפרח בפקעים במהלך התרדמה ובשלב פריצת הפקע בעזרת ריאקצית *Real Time PCR*. אנליזת *In Situ* הראתה ביטוי ייחודי של *VitP1* שהוא האורטולוג לגן *PISTILLATA* מארבידופסיס באבקנים ובעלי כותרת. בשלב הבא שימשו הגנים המתוארים כסמנים ביוכימיים לזיהוי התמיינות אברי הפרח בפקעי פרלט וסולטנינה במהלך התרדמה ובשלב פריצת הפקע בעזרת ריאקצית *Real Time PCR*. הושווה דגם הביטוי בפקעי הבקורת לדגם שהתקבל בעקבות שימוש בשובר תרדמה בפקעי פרלט וסולטנינה. הונח מסד לכרם דליים שיאפשר לבחון בתנאים מבוקרים השפעת הטמפרטורה על תהליך התמיינות אברי הפרח במועד פריצת הפרחים.

המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו

נמצאה קורלציה בין פריצת הפקעים לעלייה בביטוי משלושת סמני התפתחות הפרח התומכת לפיה מוצע כי תהליך התמיינות אברי הפרח מתחיל עם פריצת הפקע. הופעת תעתיקים משלושת הגנים חלה שבוע מוקדם יותר. השפעתו של טיפול הציאנמיד חומצי על הקדמת הביטוי בקורלציה עם הקדמת פריצת הפקעים עשויה לרמוז כי השחרור מתרדמה משפיע על האות המאפשר תחילתו של תהליך התפתחות פרימורדיית הפרח. לא נמצאה השפעה שלילית של הטיפול בציאנמיד על התהליך.

נושאים למחקר עתידי

בכפוף לזמינות אמצעי מחקר החומר הצמחי מפקעים פוריים ולא פוריים בסופיריור ישמש למעקב אחר תבנית ביטוי הגנים בפקעים במהלך התרחשותם של תהליכי השלמת התמיינות מריסטמת האשכול. בנוסף, תבחן בתנאים מבוקרים השפעת הטמפרטורה על תהליך התמיינות אברי הפרח במועד פריצת הפרחים. על בסיס ההקדמה בביטוי של *VitAP1* נבקש לזהות אינטרקטורים עם תוצר הגן שעשויים להיות מעורבים בבקרת הסיעוף תוך שימוש בספריית *yeast 2 hybrid* מפקעים שבנינו לאחרונה.

האם כבר הוחל בהפצת הידע? ניתנה הרצאה ביום עיון גפן מאכל ובכנס גפן מאכל בדרא"פ.

פרסום הדו"ח: אני ממליצה לפרסם את הדו"ח ללא הגבלה.

