בחינת גורמים אנדוגניים המשפיעים על מאזן הורמונאלי ועל גודל פרי באבוקדו 'האס'

עבודת גמר

מוגשת לפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה

על שם רוברט ה. סמית

של האוניברסיטה העברית בירושלים

לשם קבלת תואר 'מוסמך במדעי החקלאות'

מאת

רויטל אקרמן-רוזנפלד

תשס"ט רחובות 2009

עבודה זו נעשתה בהדרכתם של:

ד"ר ורד יריחימוביץ

המכון למדעי הצמח

מנהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני

וד"ר אבי צדקה

המכון למדעי הצמח

מנהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני

תודות,

ברצוני להודות מעומק ליבי לד"ר ורד יריחימוביץ על ההדרכה המקצועית, התמיכה הרבה והיחס האישי לאורך כל הדרך.

תודה לד"ר אבי צדקה על הליווי המקצועי.

תודה מיוחדת לירדנה דהן על הסבלנות, הסיוע, היעוץ בכל שאלה במהלך העבודה וכמובן על הסיפורים והאוזן הקשבת.

תודה למשה גורן על עזרתו הרבה במעבדה ומחוצה לה.

תודה לאמיר, בן זוגי על האהבה האין סופית והסבלנות... המון המון תודה!!!

תקציר

הזן 'האס' מהווה מרכיב חשוב בין זני האבוקדו בעולם ובארץ. הבעיה העיקרית בזן היא אחוז גבוה של פירות קטנים, כ- 40%-60% מכלל הפירות הינם בעלי משקל סופי נמוך מ- 220 גר'. הפירות הקטנים נבדלים מהפירות הגדולים בצורה ובגודל, הבדלים אלו ניתנים לזיהוי בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרי. אפיון פירות קטנים הראה כי בפירות אלו קליפת הזרע מנוונת וקצב גידולם מואט, למרות זאת, היבטים נוספים הקשורים בהתפתחות הפרי כגון תהליכי הבשלה והזדקנות אינם מושפעים. התפתחות וגידול פרי תלויים בקצב חלוקת התאים ובגידולם. ברוב מיני הפירות חלוקת התאים נמשכת במשך תקופה קצרה לאחר החנטה, אולם באבוקדו חלוקת התאים נמשכת במהלך כל שלבי התפתחות הפרי. מחקר אנטומי השוואתי שנערך בזן 'האס' הוביל למסקנה כי הגורם המגביל את התפתחות הפרי אינו גידול התאים אלא עיכוב בתהליך חלוקתם. ממצא אשר הוביל לסדרת עבודות שנערכה במטרה לנסות ולאפיין שינויים במאזן ההורמונלי בין פירות גדולים וקטנים. בעבודות אלו נמצא כי במהלך התפתחות הפרי, חלה עלייה חדה ברמת חומצה אבסיסית (ABA) ברקמת הציפה של פירות קטנים. כמו כן דווח, על עלייה חדה בייצור/צבירת ABA וירידה בייצור/צבירת אוקסין (IAA) בזרעי פירות קטנים. בניגוד לאוקסין, המעודד חלוקת תאים, ABA מעכבת תהליך זה, לפיכך הוצע כי עלייה ביצירת/צבירת ABA, בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרי, עשויה להוות גורם מרכזי התורם לעיכוב תהליך חלוקת התאים ולפנוטיפ פרי קטן בזן 'האס'. למרות הידע הקיים, אודות השינויים במאזן ההורמונלי החלים במהלך התפתחות הפרי, המידע אודות הסיגנלים המולקולארים הקושרים בין פעילות מחזור התא בפרי האבוקדו ובין השינויים הורמונאלים החלים בפרי הינו מצומם ביותר.

גודל פרי הינה תכונה כמותית התלויה בביטויים של מספר גנים. בעגבנייה מופו מספר QTLs (Quantitative trait locus) המשפיעים על משקל הפרי. נמצא כי אחד מ- QTLs אלו, *fw2.2* (Fruit weight 2.2), אחראי לשונות של כ- 30% בין גודל העגבנייה ה"גדולה" המתורבתת, לבין עגבניית זן–הבר בעלת פרי קטן. שיבוט FW2.2 חשף כי QTL זה משפיע באמצעות גן יחיד (*Lefw2.2* (ORFX)), המקודד לחלבון הפועל כבקר שלילי של חלוקת תאים בפרי. הגן *Lefw2.2* חולק הומולוגיה עם ESTs צמחיים נוספים המקודדים לכאורה לחלבונים בעלי תפקיד שאינו ידוע, למיטב ידיעתנו לא דווח עד כה על גן הומולוגי באבוקדו. בהילקח בחשבון הידע הקיים בהקשר לפנוטיפ 'פרי קטן' באבוקדו 'האס', נראה סביר ואף מעורר עניין להניח כי גם באבוקדו קיים גן הומולוגי ל- *Lefw2.2* המתבטא ביתר בפרי קטן ומעכב את תהליך חלוקת התאים בפרי. לפיכך, בחלקו הראשון של המחקר ניסינו לזהות ולאפיין גן הומולוגי לגן *Lefw2.2* באבוקדו

'האס'. באמצעות שימוש בשיטת sq-RT-PCR אותר מקטע גן מאבוקדו (*Pafw2.2*) החולק הומולוגיה גבוהה לגן *Lefw2.2*. רצף הגן החלקי המתורגם מקודד ל- 136 חומצות אמיניות וחולק הומולוגיה של 63.70% ברמת החלבון עם LeFW2.2. בדיקת דפוס ביטויו של הגן אשר בודד, בפירות גדולים וקטנים, הראתה כי במהלך התפתחות הפרי *Pafw2.2* מתבטא ביתר ברקמות פרי קטן (ציפה, קליפת זרע וזרע), זאת בהשוואה לאותן רקמות בפרי הגדול. ממצאים אלו מרמזים כי *Pafw2.2* עשוי לקודד לחלבון הפועל באופן דומה ל- LeFW2.2, קרי, כבקר שלילי של חלוקת תאים בפרי. תפקידו האפשרי של *Pafw2.2* בבקרת חלוקת תאים בפרי האבוקדו והשפעתו האפשרית על גודל פרי נידונה בהמשך.

במקביל ובהמשך לעבודות קודמות אשר העלו את הסברה כי עלייה ביצירת/צבירת ABA, עשויה להוות גורם מרכזי התורם לעיכוב תהליך חלוקת התאים ולפנוטיפ פרי קטן, בחלקה השני של העבודה, התמקדנו באפיון דגם הביטוי של גנים מאבוקדו, המעורבים במסלול הביוסינתזה של ABA במהלך התפתחות הפרי. המידע הקיים לגבי סינתזת ABA בפרי האבוקדו ואופן בקרתה במהלך התפתחות הפרי מצומצם. בעבודות קודמות זוהתה באבוקדו משפחת הגנים *PaNCED1-3*, המקודדים לחלבונים המבקרים שלבים מוקדמים בסינתזת ABA, אולם דגם ביטוים של גנים אלו לא נלמד בפרי המתפתח. כמו כן, גנים נוספים המקודדים לאנזימים הפעילים בשלבים סופים של סינתזת ABA כגון ABA aldehyde oxidase ו-MoCo sulfurase לא זוהו עדיין באבוקדו.

השלב האחרון במסלול סינתזת ABA הינו חמצונו של חומר הביניים ABA-aldehyde. תהליך המזורז ע"י האנזים ABA-AO, הדורש לצורך פעילותו שינויים הכוללים הוספת שייר מוליבדן (Mo) ושייר גופריתי (sulfur), האנזים המזרז את הוספת שייר הגופרית למרכז ה- MO הינו MoCo sulfurase. בעבודה הנוכחית שיבטנו מפרי אבוקדו מזן 'האס' מקטע גן מאבוקדו המקודד לכאורה ל- MoCo sulfurase. מקטע הגן המתורגם מקודד ל- 263 חומצות אמיניות ומראה הומולוגיה גבוהה לדומיין ה- N-טרמינלי של הגנים *FLACCA* מעגבנייה ו- *ABA3* מארבידופסיס, המקודדים לאנזים MoCo sulfurase (68.61% ו-67.93%, בהתאמה). מעקב אחר דגם הביטוי של הגנים המקודדים ל- *NCED1-3* ולגן המקודד לכאורה ל- MoCo sulfurase במהלך התפתחות פירות גדולים וקטנים, הראה, כי במהלך התפתחות פרי קטן חלה עלייה חדה ברמת השעתוק של הגן המקודד לאיזופורם-NCED3 ברקמות הפרי השונות, בעוד ביטויו של הגן המקודד לכאורה ל- MoCo sulfurase היה כמעט קונסטיטוטיבי עם עלייה מתונה בביטוי תעתיק הגן בפירות קטנים. מנתונים אלו ניתן להסיק כי העלייה ברמת ABA בפירות הקטנים, אשר עליה דווח בעבר, מקורה מסינתזה *de novo* של ABA ברקמות השונות. עלייה זו מבוקרת ברמת השעתוק ותלויה בעיקר בשעתוקו של הגן המקודד לאיזופורם- NCED3. ייתכן

כי לגן המקודד לכאורה ל-PaMoCo sulfurase תפקיד בקרתי משני בבקרת יצור ABA. הקשר האפשרי בין שינויים ברמת ABA בפרי קטן, עלייה ברמת הביטוי של *Pafw2.2* ועיכוב בתהליך חלוקת התאים מוצג בדיון.

תוכן עניינים

רשימת קיצורים..9

1. מבוא...10

1.1. אבוקדו – רקע כללי...10
1.1.1. מקור ותפוצה..10
1.1.2. תאור בוטני 10
1.1.3. הזן 'האס' 11

1.2. בעיית גודל פרי באבוקדו 'האס'..11

1.3. מאזן הורמונאלי והשפעתו על התפתחות פרי באבוקדו 'האס'................................12

1.4. שינויים במאזן קרבוהידרטים ואיזופרנואידים והשפעתם על התפתחות פרי באבוקדו 'האס'..13

1.5. השפעת טיפולי PGR (Plant growth regulators) על גודל הפרי באבוקדו 'האס'.15

1.6. מחזור חלוקת התא ובקרתו בתאי צמח...15

1.7. Lefw2.2 בקר שלילי של חלוקת תאים בפרי...17

1.8. מסלול סינתזת ABA 18

1.8.1. בקרת מסלול סינתזת ABA באבוקדו..20

1.9. מטרות המחקר...20

2. שיטות וחומרים 21

2.1. חומר צמחי 21

2.2. חתכים היסטולוגים – הערכת מספר תאים וגודל תאים 21

2.3. הפקת Total RNA...22

2.4. שיבוט חלקי של גן ההומולוגי ל *Lefw2.2* מאבוקדו 'האס'.....................................22

2.5. שיבוט חלקי של גן ההומולוגי ל- MoCo sulfurase מאבוקדו 'האס' 26

2.6. אנליזה חצי כמותית(Semi-quantitative RT-PCR)..27

2.7. Northern blot (Drager and Stern, 1998)..**28**

2.8. שיטות מולקולאריות כלליות...30

2.8.1. אלקטרופורזה של DNA בג'ל אגרוז..30
2.8.2. בידוד מקטעי DNA מג'ל אגרוז 30
2.8.3. החדרת פלסמיד לחיידקי *E.coli*...30
2.8.3.1. ליגציה - ריתוך מחדר לתוך פלסמיד 30
2.8.3.2. הכנת חיידקים קומפטנטיים לטרנספורמציה באמצעות שוק חום-קור (Chung and Miller, 1988). 31
2.8.3.3. טרנספורמציה לחיידקים...31
2.8.4. הפקת DNA פלסמידי וקביעת רצף...31
2.8.4.1. חיתוך הפלסמיד בעזרת אנזימי רסטריקציה...32
2.8.4.2. קביעת רצף ה- DNA ועיבוד רצפים...32

3. תוצאות 33

3.1. תוצאות – חלק א. 33
3.1.1. התפתחות פירות 'האס' גדולים וקטנים - שטח תאים ומספר תאים.....................33
3.1.2. שיבוט חלקי של גן הומולוגי ל- Lefw2.2 מאבוקדו 'האס'.................................35

3.2. תוצאות - חלק ב 41
3.2.1. שיבוט חלקי של גן מאבוקדו 'האס' המקודד לכאורה ל- MoCo sulfurase. 41
3.2.2. אפיון ביטוי מקטע הגן המקודד לכאורה לאנזים PaMoCo sulfurase במהלך הבשלת הפרי ובעקת יובש בעלים. 44
3.2.3. בחינת דגם הביטוי של *PaNCED1-3* ושל מקטע הגן המקודד לכאורה ל- PaMoCo sulfurase באבוקדו במהלך התפתחות הפרי. 46

4. דיון 50

4.1. פנוטיפ פרי קטן באבוקדו 'האס' – מהו הגורם המגביל? 50

4.2. אפיון מקטע גן הומולוגיל- *Lefw2.2* באבוקדו 'האס' - ביטוי הגן במהלך התפתחות הפרי ומעורבותו האפשרית בעיכוב תהליך חלוקת תאים בפרי. 50

4.3. בקרת מסלול ביוסינתזת ABA במהלך התפתחות פרי. 54
4.3.1. אפיון מקטע גן הומולוגי ל- ABA3 ו- FLACCA באבוקדו 'האס' – תפקידו האפשרי בבקרת סינתזת ABA. 54
4.3.2. בקרת מסלול ביוסינתזת ABA במהלך התפתחות הפרי.....................................57

5. רשימת ספרות 58

ABSTRACT 64

רשימת קיצורים

2,4-D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
6-BA	6-benzyladenine
ABA	Abscisic acid
ABA-AO	Abscisic aldehyde oxidase
AI	Insoluble acid Invertase
AtNCED	*Arabidopsis thaliana epoxycaratenoid dioxygenase*
AVG	Aminoethoxyvinylglycine
CDK	Cyclin-dependent kinase
CK	Cytokinins
CKII	Casein kinase II
CPPU	N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea
DAFB	Days after full bloom
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A
HMGR	3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase.
IAA	Indole-3-acetic acid
ICK	Inhibitors of CDK
KRP	Kip Related Protein
LeFw2.2	*L. esculentun fruit weight 2.2*
LeMoCo sulfurase	*L. esculentun Molybdenum cofactor sulfurase*
MoCo	Molybdenum cofactor
NCED	Epoxycaratenoid dioxygenase
PaFw2.2	*Persea americana fruit weight 2.2*
PaMoCo sulfurase	*Persea Americana Molybdenum cofactor sulfurase*
PGR	Plant growth regulators
PLAC8	Placenta-specific gene 8 protein
pRb	Retinoblastoma protein
QTL	Quantitative trait loci
SnRK1	Sucrose non-fermenting 1-like protein kinase
SuSy	Sucrose synthase

1. מבוא

1.1. אבוקדו – רקע כללי

1.1.1. מקור ותפוצה

אבוקדו, *Persea americana Mill.*, הינו עץ סוב-טרופי הנמנה עם משפחת העריים, *Lauraceae*. מוצאו של האבוקדו מאמריקה המרכזית. תפוצת העץ רחבה מאד והוא גדל כמעט בכל האזורים הטרופיים והסובטרופיים של כדור הארץ. לישראל הובא האבוקדו בתחילת המאה ה- 20, בעיקר מקליפורניה ומפלורידה. מקובל לחלק את זני האבוקדו לשלושה גזעים: הגזע המקסיקני: גזע אשר מוצאו מן הרמות הגבוהות במקסיקו. נופו של העץ רחב, עליו קטנים וצרים ופריחתו מוקדמת. הפרי קטן (50-200 גרם), קליפתו דקה וצבעו ירוק או כצבע חציל. הגזע הגואטמלי: מוצאו מהרי גואטמלה. לרוב העץ גבוה וזקוף, עליו גדולים ופריחתו מאוחרת (סוף האביב). הפרי בינוני עד גדול, קליפתו עבה ועצית. צבעו ירוק או כצבע חציל. הגזע המערב-הודי: מוצאו משפלות טרופיות במרכז אמריקה. בדרך כלל העץ קטן וחלש מן העצים הנכללים בשני הגזעים האחרים. עונת הפריחה של גזע זה חלה בארץ בחורף ובאביב המוקדם. הפרי בינוני עד ענק. קליפתו עורית, עובייה בינוני, צבעה ירוק עד אדמדם (חומסקי, 1976; Whiley *et al.*, 2002). בין זני האבוקדו החשובים מבחינה מסחרית נמנים ה'האס', שהינו זן קליפורני בן הגזע הגואטמלי וה'פוארטה' שהינו זן מכלוא מקסיקני גואטמלי. ה'אטינגר', לעומתם הינו זן שהתגלה והפך למסחרי בישראל משווק לייצוא אך ורק ע"י ישראל.

1.1.2. תאור בוטני

האבוקדו הינו עץ תדיר-ירק. גדילת העץ נמרצת מאוד, והוא עשוי להגיע לגובה 20-30 מטר. האבוקדו הינו חד ביתי והפרח הינו דו מיני. תפרחות האבוקדו גדולות מאוד, ומכילות לעתים מאות פרחים. הפרח, שמכיל איברים זכריים ונקביים, הינו פרוטוגיני, משמע הצלקת רצפטיבית לפני שחרור האבקה מהמאבקים. הפרח נפתח פעמים, לרוב בשני ימים עוקבים, למשך כמה שעות. הפרח מתפקד באופן פונקציונלי כפרח נקבי במהלך פתיחתו הראשונה (פרח עליני, הצלקת רצפטיבית) ובאופן פונקציונלי כזכרי במהלך פתיחתו השנייה (פרח אבקני, בו מתרחש שחרור אבקה מהמאבקים). על פי זמני הפריחה, זני האבוקדו נחלקים לשתי קבוצות פריחה: קבוצה A - העץ נושא בבוקר פרחים נקביים, ובשעות אחה"צ פרחים זכריים. קבוצה B מתנהגת הפוך מקבוצה A. לקבוצה A שייכים בין היתר הזנים המוכרים 'האס', 'פינקרטון' ו'ריד' ולקבוצה B שייכים הזנים 'אטינגר', 'פוארטה' ו'נאבל' (חומסקי, 1976). אופי פתיחת הפרח המתוארת לעיל נצפית בימים חמים, אולם ידוע כי שינויי טמפרטורה עשויים לשבש את המהלך הסינכרוני

של פתיחת הפרחים. על פי מקצב הפריחה המתואר צפוי שבשעות הבוקר (בימים חמים) יאביקו זנים מטיפוס B את הזנים מטיפוס A, ובשעות אחה"צ יהיה כיוון ההאבקה הפוך. לאחרונה נמצא גם כי באמצע היום קיימת, בכל הזנים שנבדקו בישראל, תקופת פריחה וחפיפה קצרה בין הפרחים העליניים והאבקניים של אותו העץ. במהלך תקופת חפיפה זו עשויה להתרחש האבקה עצמית (האבקת שכנים) בתוך הזן (Lahav and Gazit, 1994; Gazit and Degani, 2002; Bergh, 1986; Davenport, 1986). במטעי אבוקדו מסחריים נעשים מאמצים להגביר את סיכויי ההפריה על ידי שימוש בדבורים כוקטור מאביק (Ish-Am and Eisikowitch, 1998). הפרי בעל ציפה מוצקה, בתוך הפרי זרע אחד גדול בעל שני פסיגים, עטוף בשתי קליפות זרע עבות המתייבשות לקראת ההבשלה. חומר התשמורת העיקרי שבציפה הינו שמן. תכולת השמן בפרי משתנה תלוית זן ושלב ההבשלה, ונעה בין 15-30% (Lewis *et al*. 1978). פרי האבוקדו נחשב לבעל ערך תזונתי ובריאותי רב, בעיקר הודות לשיעור הגבוה של חומצות השומן הבלתי רוויות שהוא מכיל.

1.1.3. הזן 'האס'

הזן 'האס' הינו זן קליפורני, מהגזע הגואטמלי, הנטוע בשיעור רחב מאוד בקליפורניה, במערב מכסיקו, בדרום אפריקה ובארץ. מוצאו של הזן 'האס' הינו מזריע שנמצא בקליפורניה ע"י רודולף האס בשנת 1926. זן זה נחשב לחשוב ביותר בסחר באבוקדו הבינלאומי ומהווה כ- 80% מהייצור העולמי. בארצות הברית ענף האבוקדו מתבסס ברובו על גידול הזן 'האס', המהווה כ- 95% מכלל שטחי האבוקדו, ואילו בארץ, כ- 40% מכלל שטחי האבוקדו הנטועים הינם מהזן 'האס' (http://www.avocadosource.com). הפרי מצטיין בסגולות רבות כמו תקופת קטיף ארוכה, כושר אחסון וחיי מדף ארוכים. בנוסף הפרי בעל תכונות איכותיות של טעם ומרקם, תכולת השמן בו מגיעה ל- 18-23%, קליפתו חזקה, גמישה ומתקלפת היטב, בעלת צבע המשתנה בהבשלה לסגול כהה (Whiley *et al*., 2002).

1.2. בעיית גודל פרי באבוקדו 'האס'

הזן 'האס' מהווה מרכיב חשוב בין זני האבוקדו בעולם ובארץ. הבעיה העיקרית בזן היא אחוז גבוה של פירות קטנים, כ- 40%-60% מכלל הפירות הינם בעלי משקל סופי נמוך מ- 220 גר' (Zilkah and klein, 1987; Cowan *et al*., 1997). אחוז גבוה במיוחד של פירות קטנים מתקבל בשנים של ON בהן ישנה תנובה גבוהה של פרי (Roe and Morudu, 1999). תופעה זו, מהווה בעיה חקלאית מרכזית ומשפיעה במידה ניכרת על רווחיות המטע. הפירות הקטנים

נבדלים מהפירות הגדולים בצורה ובגודל, הבדלים אלו ניתנים לזיהוי כבר בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרי. אפיון פירות קטנים הראה כי בפירות אלו קליפת הזרע מנוונת וקצב גידולם מואט. למרות זאת, היבטים נוספים הקשורים בהתפתחות הפרי כגון תהליכי הבשלה והזדקנות אינם מושפעים (Cowan *et al.*, 2005). ידוע כי גידולו של פרי, תלוי בקצב חלוקת התאים ובגידולם. ברוב מיני הפירות חלוקת תאים מתרחשת במשך תקופה קצרה, לאחר חנטת הפרי, אולם באבוקדו חלוקת התאים נמשכת במהלך כל שלבי התפתחות הפרי (Schroeder, 1953). באופן כללי ניתן להבחין בשלושה שלבים בגידול פרי האבוקדו: שלב I - בו חל גידול איטי, הנובע בעיקר מחלוקת תאים. שלב II - בו חל גידול מהיר, הנובע מגידול ניכר של התאים והמשך מתון בקצב חלוקתם. שלב III- בו חלה האטה בקצב חלוקת התאים ובקצב הגידול. באופן מעניין, מחקר אנטומי השוואתי שנערך בזן 'האס' הראה כי במהלך התפתחות הפרי גודל התאים בפירות גדולים וקטנים זהה. לעומת זאת, מספר תאים רב יותר (ליחידת שטח) הודגם בפירות גדולים, מכאן הוסק כי הגורם המגביל את התפתחות הפרי אינו גידול התאים אלא עיכוב בתהליך חלוקתם (Cowan *et al.*, 1997). ממצא זה, הוביל לסדרת עבודות שנערכה במטרה לנסות ולאפיין שינויים במאזן ההורמונאלי, במאזן הקרבוהידרטים ומאזן האיזופרנואידים, אשר עשויים להשפיע על מערך חלוקת התאים. ממצאים מעבודות אלו היוו בסיס לעבודה זו ומוצגים להלן.

1.3. מאזן הורמונאלי והשפעתו על התפתחות פרי באבוקדו 'האס'

מהלך חלוקת התאים בפרי מבוקר על ידי הורמונים צמחיים המיוצרים בחלקי הצמח השונים, בעובר ובחלקי פרי נוספים. עוד בתחילת שנות השבעים הודגמה לראשונה חשיבות CK (Cytokine) בהתפתחות פרי האבוקדו. רמות גבוהות של CK נמדדו ברקמת הציפה ונמצא מתאם חיובי בין רמת ה- CK לבין קצב גידול הפרי (Blumenfeld and Gazit, 1970). במחקרים נוספים נמצא, כי במהלך התפתחות הפרי, חלה עלייה חדה ברמת ABA (Abscisic acid) ברקמת הציפה של פירות 'האס' קטנים (Cowan *et al.*, 1997; Taylor and Cowen, 2001; Cowan *et al.*, 1999). ידוע, כי עלייה ברמת ה- ABA המתרחשת בצמח בתגובה למצבי עקה, משפיעה באופן שלילי על מחזור התא (Wang *et al.*, 1998), מכאן הוצע כי שינוי ביחס בין רמת ה- CK לבין רמת ABA, הנובע מעליה ביצירת/צבירת ABA, גורם לעיכוב בתהליך חלוקת התאים, להאטת גידול הפרי ולמופע הפנוטיפ של פרי קטן (Cowan *et al.*, 1997; Cowan *et al.*, 1999). בהתאמה, טיפולי ABA שניתנו לפירות גדולים, בתחילת שלב II של התפתחות הפרי, גרמו להתנוונות קליפת הזרע ולפנוטיפ פרי קטן, תופעה אשר נמנעה כאשר ניתן טיפול של ABA ו- CK (2iP- isopentenyladenin) (Moore-Gordon *et al.*, 1998). בנוסף, לאחרונה פורסם, כי בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרי, רמת

היצירה/צבירה של אוקסין (IAA-indole-3-acetic acid) ברקמת הזרע של פירות קטנים, נמוכה בכמה סדרי גודל מרמת הצבירה/יצירה של אוקסין בזרעי פירות גדולים. ירידה זו, ברמת ה- IAA בזרעי פירות קטנים, מתרחשת במקביל לעלייה ברמת ABA (Cowan *et al.*, 2005). אוקסין ידוע כהורמון צמחי המעודד התרחבות וחלוקת תאים, ועל כן נטען כי במקביל לעלייה ברמת ABA, חוסר היכולת ליצור/לצבור IAA, מהווה גורם מכריע המשפיע על גודל הפרי הסופי (Cowan *et al.*, 2005). למרות המידע הרב הקיים, אודות השינויים במאזן ההורמונלי החלים במהלך התפתחות הפרי, הידע אודות הסיגנלים המולקולארים הקושרים בין פעילות מחזור התא בפרי האבוקדו ובין השינויים הורמונאלים החלים בפרי הינו מצומצם ביותר.

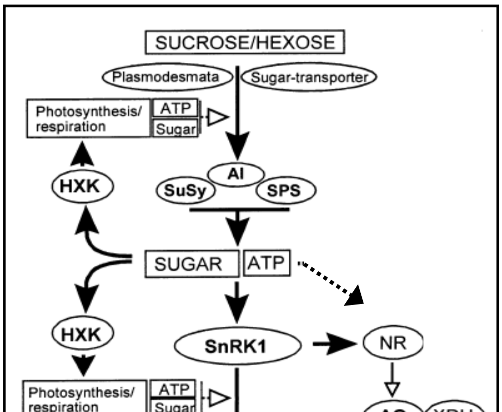
1.4. שינויים במאזן קרבוהידרטים ואיזופרנואידים והשפעתם על התפתחות פרי באבוקדו 'האס'

פרי מתפתח מתפקד כמבלע סופי (terminal sink) הדורש מינרלים, מטבוליטיים משניים, קרבוהידרטים והורמונים צמחיים המשפעים באופן ישיר או עקיף על מערך התבטאות גנים במהלך התפתחותו. מעבר החומרים בפרי האבוקדו המתפתח מתרחש ככל הנראה במסלול הבא: עוקץ הפרי -> ציפה -> אזור החלצה -> קליפת זרע/זרע -> וחזרה לרקמת הציפה (Moore-Gordon *et al.*, 1998). סוכרוז, המצטבר בתהליך הפוטוסינתזה ומהווה כ- 90% מכלל המומסים בשיפה, מועבר לתאי הפרי המתפתח המשמשים כמבלע. מעבר זה עשוי להתרחש באופן סימפלסטי או אפופלסטי. באופן מעניין, נמצא כי בפירות 'האס' קטנים תהליך התנוונות קליפת הזרע מלווה בחסימת גשרי פלסמודסמטה בתאי רקמה זו. כתוצאה מכך, מעבר החומרים הסימפלסטי אל הזרע וממנו לקוי (Moore-Gordon *et al.*, 1998). בהתאמה, נמצא, כי רמת הסוכרוז בזרעי פירות קטנים, נמוכה באופן מובהק מרמתו בפרי הגדול (Richings *et al.*, 2000). כמו כן, דווח כי רמת האנזימים הפעילים בפירוק סוכרוז:סוכרוז סינטאז (SuSy) ואינורטאז (Insoluble acid Invertase –AI) שונה בזרעי פירות גדולים וקטנים. בעוד פעילות SuSy מופחתת בפרי קטן, עולה פעילות AI, ובהתאם נמצא כי רמתו היחסית של גלוקוז מתוך כלל הסוכרים עולה אף היא (Richings *et al.*, 2000). ידוע, כי גלוקוז עשוי להשפיע על המטבוליזם של ABA ולגרום לעלייה ברמתה. מאידך, ידוע כי פעילות SuSy ו- AI מבוקרת, בין היתר, על ידי שינויים ברמת ABA (Koch, 2004; Richings *et al.*, 2000). יצירת/צבירת ABA, הן בזרע והן בציפה, עשויה להפר את המאזן ההורמונאלי הדרוש לחלוקת תאים תקינה במהלך התפתחות הפרי (Swiatek *et al.*, 2002). השאלה הנשאלת היא האם שינוי ברמת

הסוכרים בפרי קטן הינו הגורם לשינוי במאזן ההורמונאלי או לחילופין, האם הוא מתרחש כתוצאה משינוי זה? שאלה זו נותרת לעת עתה פתוחה.

גורם נוסף, בעל תפקיד מרכזי בהתפתחות הפרי הינו האנזים HMGR (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase). אנזים זה משחק תפקיד מרכזי במסלול הביוסינתזה של איזופרנואידים, ומקטלז את הפיכת HMG-CoA (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzyme A) לחומצה מוואלונית (תוצר ביניים במסלול סינתזת איזופרנואידים) (Richings *et al*. 2000). מחקרים שנערכו בעגבנייה ובמלון הראו, כי במהלך התפתחות הפרי, קיימת קורלציה ישרה בין עלייה בפעילות HMGR ובין חלוקת תאים בפרי. הוצע כי עלייה בפעילות HMGR, מעלה את רמת החומצה המלוונית ואת מאגר הסטרולים הדרוש ליצירת ממבראנות במהלך חלוקת התאים (Kobayashi *et al*., 2002; Narita and Gruissem, 1989). במקביל, מחקר שנערך באבוקדו מזן 'האס' מצא כי בפירות קטנים חלה ירידה של כ-70% בפעילות HMGR, זאת בהשוואה לפירות גדולים (Cowan *et al*., 1997). עבודה זו מורה כי פעילות גבוהה של HMGR, משפיעה אף היא על גודלו הסופי של פרי האבוקדו.

בהלקח בחשבון מכלול הממצאים אודות השינויים החלים במטבוליזם של סוכרים, הורמונים ואיזופרנואידים בפירות קטנים בהשוואה לפירות גדולים, הוצע מודל אינטגרטיבי המנסה לאגד את כלל הגורמים המשפיעים על גודל הפרי באבוקדו 'האס' (ראה איור מס' 1). על פי מודל זה שינויים בתכולת הסוכר (יחס סוכרוז/הקסוז) משפיעים על אנזים דמויי SnRK1 (Sucrose non-fermenting 1-like protein kinase) הפועל כ"סנסור" החש שינויים ברמות הסוכר ומשפעל בתגובה שרשרת אירועים המשפיעים על פעילות HMGR מחד ועל וויסות שיווי משקל הורמונאלי מאידך. שינוים אלו משפיעים על מהלך חלוקת התאים ועל גודל הפרי הסופי בהתאם (Richings *et al*., 2000; Cowan *et al*., 2001). יצוין כי מודל זה, הינו בגדר השערה בלבד.



איור מס' 1 – מודל אינטגרטיבי היפותטי המציג גורמים שונים המשפיעים על תהליך חלוקת תאים ועל גודל הפרי באבוקדו 'האס'.
(Cowan *et al*., 2001)

1.5. השפעת טיפולי PGR (Plant growth regulators) על גודל הפרי באבוקדו 'האס'

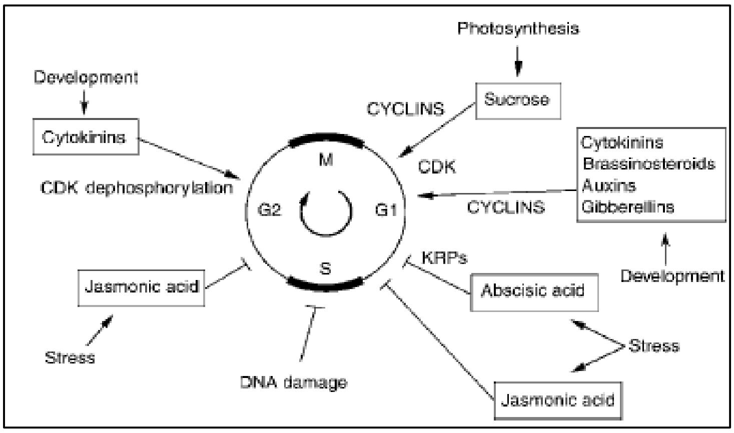
כאמור, בעיית גודל פרי בזן האס הינה אחת הבעיות המרכזיות של הגידול, ולכן נערכו עד כה ניסיונות רבים ומגוונים לצורך הגדלת פרי בזן זה. ניסיונות אלו כללו יישום חומרי צימוח ומעכבי צימוח שונים, אולם, עד כה לא נמצא מענה הפותר בצורה יעילה את בעיית גודל פרי בזן 'האס'. לדוגמא, דווח כי מתן אקסוגני של AVG (aminoethoxyvinylglycine), מעכב ביוסינתזה של אתילן, בנוסף ל- 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) שהינו אוקסין סינטטי, בזמן פריחה מלאה, העלה את יבול הפירות הגדולים (213-269 גרם לפרי) והפחית באופן משמעותי את יבול הפירות הקטנים (99-134 גרם לפרי). טיפול זה נמצא אפקטיבי כאשר הוא בוצע בשנת שפע ולא בשנת שפל (Lovatt, Calif. Avo. Com. 2007 Ann. Rpt. http://www.avocado.org/growers/page/symposium_2007). כמו כן דווח כי גודל הפרי הושפע באופן ניכר ממתן חיצוני של ציטוקנים סינטטים: 6-BA (6-benzyladenine), ו- CPPU (N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea), טיפולים אלו העלו את גודל הפרי הממוצע והפחיתו את מספר הפירות שאינם מתאימים ליצוא (Zilkah *et al*., 1998). תוצאות אלה מהוות עדות לכך שמתן חיצוני של אוקסנין וציטוקינין עשוי להשפיע בצורה חיובית על גודל הפרי, אם כי האפקטיביות של טיפולי PGR על גודל פרי משתנה ותלויה בגורמים כגון: עומס פרי בעץ, גורמים סביבתיים שונים וגורמים נוספים בלתי ידועים.

1.6. מחזור חלוקת התא ובקרתו בתאי צמח

גודלו הסופי של פרי תלוי באופן ישיר בבקרת מנגנון מחזור התא. המנגנון הבסיסי המבקר את תהליך חלוקת התאים הינו מנגנון שמור אבולוציונית בכל היצורים האאוקריוטים. ככלל, מחזור התא כולל מספר שלבים: (1) שלב G1- שלב מקדים לחלוקת ה- DNA בו התא גדל בנפחו. (2) שלב S- שלב הכפלת ה- DNA. (3) שלב G2- שלב לאחר הכפלת ה-DNA בו התא מתכונן לחלוקה. (4) שלב M- מיטוזה וציטוקינזה. הפעילות הבסיסית של מחזור התא תלויה ביצירת קומפלקסים חלבוניים בין חלבונים הנקראים ציקלינים (Cyclins) ו- CDKs (Cyclin-dependent protein kinases) אשר אחראיים לזרחון סובסטרטים ספציפיים ובכך מאפשרים את התקדמות מחזור חלוקת התא. נקודות הביקורת העיקריות במהלך חלוקת התא הן המעבר מ- G1 ל- S וכן מ- G2 ל- M (Pines, 1995; Gutiérrez *et al*., 2005). בצמחים, פועלים מספר סוגים של חלבוני ציקלינים. ככלל, משפחת חלבוני CycA חשובה למעבר משלב S ל- M, משפחת חלבוני CycB מבקרת את המעבר משלב G2 לשלב M ומשפחת חלבוני CycD,

מבקרת את המעבר משלב G1 לשלב S, (Verkest *et al.*, 2005). כמו כן ידוע, כי בקרת מחזור התא הצמחי מושפעת משינויים במאזן הסוכרים ובמאזן ההורמונאלי. לדוגמה, במחקר שנעשה בארבידופסיס, דווח כי מתן חיצוני של CK בנוסף לסוכרוז הביא לעלייה ברמת השעתוק של *CycD3*, ולעלייה בפעילות המיטוטית (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000). מאידך, הורמונים כגון ABA וחומצה ג'סמונית, מבקרים באופן שלילי את תהליך חלוקת התאים (Sa´nchez *et al.*, 2005). כך לדוגמא דווח כי הוספת הורמונים אלו לתאי תרבית של צמחי טבק (BY-2 cells) מנעה את מהלך שכפול ה- DNA, כמו כן, מחקרים שנערכו בארבידופסיס הראו קורלציה בין עלייה ברמת ABA ועלייה בביטוי גנים המקודדים לחלבונים המעכבים פעילות ציקלינים ICKs (Inhibitors of CDKs, הנקראים גם KRPs - Kip Related Proteins) (Wang *et al.*, 1998; Swiatek *et al.*, 2002). תאור סכמתי, הממחיש את אופן השפעת אותות התפתחותיים והורמונלים שונים על מחזור התא הצמחי מוצג באיור מס' 2.

יש לציין כי שעתוק הגנים המבקרים את מחזור התא (Cell-proliferating-related-genes) משתנה בהתאם לשלבי התפתחות הפרי וקשור לשינויים במאזן חומרי הצמיחה. בעגבנייה, פרופיל הביטוי של משפחת גנים המקודדים לחלבוני CDKs, ושל גנים המקודדים לחלבונים שונים הנמנים עם משפחת ציקלינים מסוג D, עולה בתחילת הפריחה ולאחר חנטת הפרי ויורד באופן משמעותי במהלך התפתחות הפרי. דגם ביטוי זה, נמצא בהתאמה עם פעילות חלוקת תאים, המתרחשת בעגבנייה במשך "חלון-זמן" פיסיולוגי קצר, לפני ואחרי חנטת הפרי (Chevalier, 2007). למיטב ידיעתנו, באבוקדו לא זוהו עדין גנים הפעילים במהלך מחזור התא ולא אופיין אופן ביטויים במהלך התפתחות הפרי.



איור מס' 2 – השפעת אותות סביבתיים והתפתחותיים על מחזור התא בצמח.
(Inzé, 2005)

1.7. Lefw2.2 בקר שלילי של חלוקת תאים בפרי

גודל פרי הינה תכונה כמותית התלויה בביטויים של מספר גנים. בעגבנייה מופו מספר QTLs (Quantitative trait locus), אחד מהם, מופה בכרומוזום 2 ונקרא *fw2.2* (Fruit weight) (Grandillo *et al*., 1999). QTL זה אחראי לשונות של כ- 30% בין גודל העגבנייה ה"גדולה" המתורבתת, לבין עגבניית זן–הבר בעלת פרי קטן (Frary *et al*., 2000; Tanksley, 2004). שיבוט *fw2.2* חשף כי QTL זה משפיע באמצעות גן יחיד ((*Lefw2.2* (*ORFX*)), המקודד לחלבון ממברנאלי, הפועל כבקר שלילי של חלוקת תאים בפרי (Frary *et al*., 2000; Cong *et al*., 2002). בתחילה, שני קווים כמעט איזוגנים, בעלי אללים של פרי 'קטן' ו- 'גדול' שמשו להבנת דפוס הביטוי של *Lefw2.2* במהלך התפתחות הפרי. תוצאות עבודה זו הראו כי בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרי, רמת השעתוק של *Lefw2.2* הייתה גבוהה באופן מובהק ברקמות הפרי של הקו הכמעט איזוגני בעל אלל 'פרי קטן' (Small fruit NIL), זאת בהשוואה לרמת שעתוק הגן בקו הכמעט איזוגני בעל אלל ’פרי גדול" (Large fruit NIL) (Frary *et al*., 2000). באותה עבודה דווח כי למרות ההבדלים במימדי הפרי בין שני הקווים, גודל התאים ברקמת הפרי השונות היה שווה. כמו כן דווח כי ההבדל בין האללים 'קטן' ו- 'גדול" לא נבעו ממוטציה באזור המקודד, אלא משינויים באזור הפרומוטור של הגן *Lefw2.2*. בעקבות עבודה זו, הועלתה ההיפותזה אשר לפיה נטען כי שינויים שחלו במהלך האבולוציה בפרומוטור של *Lefw2.2* גררו לשינוי בביטוי הגן והביאו לשינוי בגודל פרי (Frary *et al*., 2000; Liu *et al*., 2003; Tanksly, 2004). בעבודה נוספת שנערכה כעבור כמה שנים נמצא כי השונות ברמת הביטוי של ה- *Lefw2.2* mRNA בין הקווים אינה רק כמותית, אלא באה לידי ביטוי גם בתזמון שונה של ביטוי הגן. תזמון העלייה בביטוי *Lefw2.2* mRNA נמצא בקורלציה הפוכה עם הפעילות המיטוטית בפרי המתפתח. ממצא זה חיזק את הטענה כי *Lefw2.2* הינו בקר שלילי של חלוקת תאים בפרי המבקר את גודל הפרי באופן שלילי על ידי דיכוי הפעילות המיטוטית (Cong *et al*., 2002).

באופן מפתיע, למרות המחקרים הרבים שנערכו בהקשר לדפוס הביטוי של *Lefw2.2* במהלך התפתחות פרי העגבנייה, הקשר בין LeFW2.2 לפעילות מחזור התא עדיין אינו ידוע. בעבודה שפורסמה לאחרונה (Cong *et al*., 2006) דווח, כי החלבון LeFW2.2 נמצא באינטראקציה, בקרבת ממברנת התא, עם תת היחידה הבקרתית (ß) של CKII קינאז (casein kinase II). תפקידם של חלבוני קינאזות מסוג CKII נלמד היטב בשמרים ובבעלי חיים. במערכות אלו ידוע, כי חלבונים אלו מהווים חלק ממערכת האותות המבקרים את מחזור התא (Guerra *et al*., 1999). בנוסף, שימוש בתוכנות מחשב, המנבאות את אופן קיפולו המרחבי של LeFW2.2, הובילו למציאת הומולוגיה בינו ובין החלבון האונקוגני ההומני RasP21 (Frary et al., 2000).

חלבוני RAS הינם חלבונים קטנים (כ- 21 KDa) בעלי פעילות GTPase, המשחקים תפקיד בהעברת אותות לגרעין התא ומעורבים בבקרת תהליך חלוקת תאים בתאים הומנים (Coleman *et al.,* 2004). בהתחשב בהומולוגיה ברמת המבנה השלישוני עם חלבוני RAS ובהילקח בחשבון האינטראקציה האפשרית של LeFW2.2 עם CKIIβ הועלתה ההשערה כי במהלך האבולוציה התפתח LeFW2.2 מאב-קדמון של חלבון RAS וכעת יש לו תפקיד בקרתי הפועל במעלה הזרם (up-stream) ומבקר את מחזור התא במהלך התפתחות הפרי (Cong and Tanksley, 2006). הגן *Lefw2.2* חולק הומולוגיה עם ESTs צמחיים נוספים המקודדים לכאורה לחלבונים בעלי תפקיד שאינו ידוע, למיטב ידיעתנו לא דווח על EST מקביל באבוקדו.

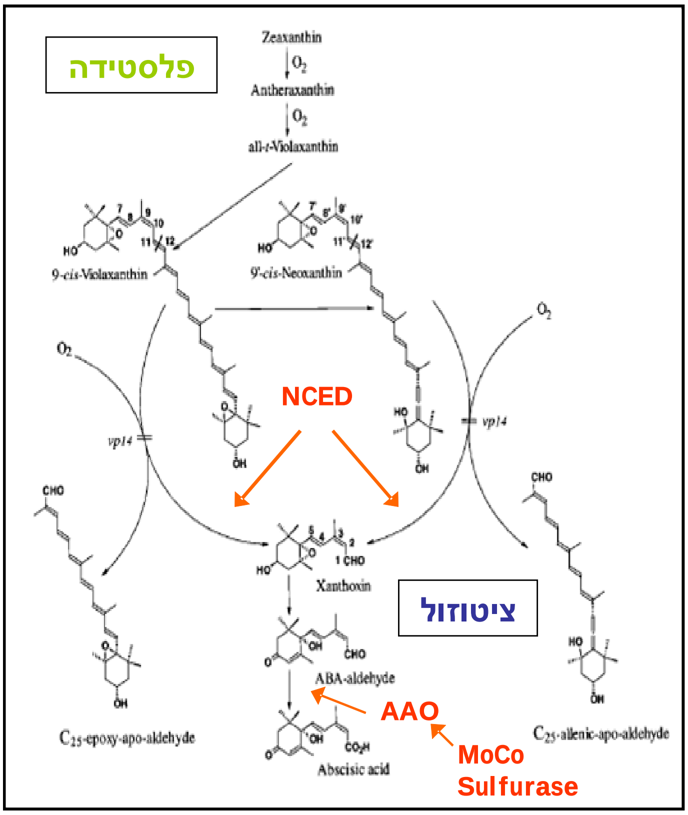
1.8. מסלול סינתזת ABA

ל- ABA תפקיד מרכזי בבקרת הסתגלות צמחים לתנאי עקה ובבקרת תהליכי התפתחות שונים ביניהם תהליך חלוקת תאים. מסלול סינתזת ABA הינו מסלול אוניברסלי המשותף לצמחים עילאיים, אולם ככל הנראה מבוקר על יד מנגנוני בקרה שונים ברקמות שונות ובתנאים שונים (Seo and Koshiba, 2002 ; Zeevaart *et al*., 1989). השלבים הראשונים של סינתזת ABA מתרחשים בפלסטידות, בהן חל ביקוע הפרקורסור הקרטנואידי - 9-cis-violaxanthin, המוביל ליצירת קסנטוקסין (Xanthoxin), שהינו חומר ביניים במסלול סינתזת ABA (Liotenberg *et al*., 1999). המשך מסלול הסינתזה מתרחש בציטוזול לאחר מעבר קסטוקסין לציטופלסמה במנגנון שטרם פוענח (ראה איור מס' 3) (Milborrow, 2001; Schwartz *et al*., 2003). מספר היבטים הקשורים לסינתזת ABA נחקרו בשנים האחרונות במערכות מודל צמחיות שונות. נקודות הבקרה העיקריות של מסלול הסינתזה מתוארת להלן:

שלבי בקרה מוקדמים: קשורים בבקרת ביטוי הגנ/ים המקודד/ים לאנזים 9-cis-epoxycaratenoid dioxygenase (NCED) , אנזים המזרז את ריאקצית ביקוע
9-cis-violaxanthin ו- 9-cis-neoxanthin המתרחשת בפלסטידה. הגן המקודד לאנזים זה זוהה ואופיין לראשונה בתירס וכונה *Vp14* ע"ש המוטנט viviparous הפגום ביכולת ייצור ABA (Tan *et al*., 1997). בהמשך זוהו ואופיינו במינים שונים גנים הומולוגים לגן זה אשר כונו *NCED* related genes. אנליזה נרחבת הראתה, כי בכל המינים גן זה משתייך למשפחות גנים המונות מספר נציגים (Tan et al., 1997; Burbidge *at el*., 1999; Qin and Zeevaart, 1999; Iuchi *at el*., 2000; Chernys and Zeevaart, 2000; Seo and Koshiba, 2002; Nambara and Marion-Poll, 2005). לדוגמא, בארבידופסיס משפחה זו מיוצגת ע"י תשעה גנים המתבטאים באופן ספציפי ברקמות שונות ובתנאים שונים (Lefebvre *et al*., 2006; Iuchi

et al., 2001). כמו כן ממצאים מעבודות במינים צמחים נוספים מורים כי עלייה בסינתזת ABA מבוקרת ברמת השעתוק ותלויה בעלייה ברמת תעתיקי *NCED* שונים ברקמות השונות (Seo and Koshiba, 2002).

שלבי בקרה מאוחרים: חמצונו של חומר הביניים ABA-aldehyde הינו השלב האחרון במסלול סינתזת ABA, תהליך זה מתרחש בציטופלסמה ומזורז ע"י האנזים ABA-AO (abscisic aldehyde oxidase) (Seo *et al*., 2004). האנזים ABA-AO דורש לצורך הפעלתו שינויים הכוללים הוספת קואפקטור מוליבן (Mo) ושייר גופריתי (sulfur). נמצא כי האנזים המזרז את הוספת שייר הגופרית למרכז ה- Mo הינו MoCo sulfurase (Bittner *et al*., 2001; Mendel and Hansch, 2002). זיהוי הגן המקודד ל- MoCo sulfurase התאפשר לאחרונה בעקבות מספר עבודות בהן אופיינו מוטנטים שונים הפגועים ביכולת ייצור ABA. נמצא כי בצמחים המוטנטים, *flacca* בעגבנייה ו- *aba3* בארבידופסיס, פגום תהליך שפעול ABA-AO בשל מוטציות בגנים המקודדים לאנזים MoCo sulfurase, גנים אלו כונו בהתאמה *FLACCA* ו- *ABA3* (Xiong *et al*., 2001; Sagi *et al*., 2002). לימוד תפקידו של MoCo sulfurase כאנזים מפתח המבקר את סינתזת ABA עומד כיום על הפרק במעבדות שונות החוקרות נושא זה בצמחי מודל שונים.



איור מס' 3 – מסלול סינתזת ABA. אנזימים מרכזים המשתתפים בתהליך הביוסינתזה מסומנים באדום. איור מותאם מתוך: Chernys and Zeevaart, 2000.

1.8.1. בקרת מסלול סינתזת ABA באבוקדו

עד כה, נחקרה בקרת מסלול סינתזת ABA באבוקדו בעיקר בהקשר להבשלת פרי, כאשר המניע למחקר היה הממצא לפיו באבוקדו רמת ייצור ABA עולה במהלך תהליך ההבשלה (Adato *et al.*, 1976). מחקרים אלו, הובילו לשיבוט ולאפיון משפחת הגנים המקודדים לשלושה איזופורמים שונים של NCED, אשר כונו בהתאם *PaNCED1-2-3* (Chernys and Zeevaart, 2000). לימוד דגם הביטוי של גנים אלו במהלך הבשלת הפרי הראה כי רמת *PaNCED1* ו- *PaNCED3* עולה בצורה חדה בציפת הפרי, במקביל לעלייה ביצירת ABA. בנוסף, דווח כי הגן *PaNCED1* בלבד אחראי לעלייה בסינתזת ABA בעלים בעקבות עקת יובש (Chernys and Zeevaart, 2000). ממצאים אלו מורים כי בקרת ייצור ABA במהלך הבשלת פרי ובתגובה ליובש, שונה. לעומת זאת דגם הביטוי של *PaNCED1-2-3* לא נלמד עד כה בפרי המתפתח, וניתן להניח כי קיימים הבדלים בביטוי גנים אלו בפרי גדול וקטן במהלך התפתחות הפרי. כמו כן, גנים נוספים המקודדים לאנזימים הפעילים בשלבים סופים של סינתזת ABA כגון abscisic aldehyde oxidase ו-MoCo sulfurase לא זוהו עדיין באבוקדו.

1.9. מטרות המחקר

בהילקח בחשבון הידע הקיים בהקשר לפנוטיפ 'פרי קטן' באבוקדו 'האס', נראה סביר ואף מעורר עניין להניח כי גם באבוקדו קיים גן הומולוגי ל- *Lefw2.2* המתבטא ביתר בפרי קטן ומעכב את תהליך חלוקת התאים בפרי. לפיכך, בחלקה הראשון של עבודה זו התרכזנו בזיהוי ואפיון גן הומולוגי לגן *Lefw2.2* באבוקדו 'האס'.במקביל, בחלקה השני של העבודה, בכדיי לאפשר הבנה עמוקה יותר ברמה הביולוגית של הבקרה על מסלול ביוסינתזת ABA באבוקדו והשפעתה על גודל פרי, התמקדנו בלימוד ואיפיון דגם הביטוי של גנים מאבוקדו המעורבים בבקרת מסלול הביוסינתזה של ABA במהלך התפתחות הפרי.

2. שיטות וחומרים

2.1. חומר צמחי

איסוף פירות 'האס' התבצע במטע אבוקדו הנטוע בקבוצת שילר בחלקה שנטעה בשנת 1982 על כנות מערב הודיות עם מרווח של 6 מטר בין השורות ו- 6 מטר בין העצים בשורה. בחלקה זו נטועים בנוסף גם עצי 'אטינגר' המשמשים כזן המפרה של הזן 'האס'. עצי 'אטינגר' פזורים בחלקה כך שכל עץ רביעי או שישי בשורה הינו עץ מזן 'אטינגר'. במהלך העבודה נדגמו ממטע זה פירות גדולים וקטנים במועדים שונים במהלך תקופת התפתחות הפרי. הפירות נאספו מ- 12 עצי 'האס' אשר נבחרו בתחילת עונת הפריחה לאחר ביצוע סקירת פריחה כללית במטע. דגימות ראשונות נלקחו 47 ימים לאחר פריחה מלאה, אולם, חלוקה לקבוצות דיגום של פירות גדולים וקטנים התבצעה כ- 90 ימים לאחר מועד הפריחה, בשלב בו ניתן היה לזהות בבירור הבדלים בין פירות גדולים וקטנים (Cowan *et al*., 1997). הפירות הובאו למעבדה לצורך מדידות אורך, קוטר ומשקל רטוב. לאחר מדידות הפרי, פורקו הפירות למרכיביהם. רקמות הפרי המופרדות (ציפה, קליפת זרע וזרע.) הוקפאו בחנקן נוזלי ונשמרו ב- 80°C- בכדי לשמש בהמשך להפקת RNA.

בנוסף, ולצורך דגימות רקמות פרי בשלבים שונים של הבשלת הפרי הובאו למעבדה, בתקופת קטיף הפרי, פירות גדולים מהזן 'האס'. הפירות הושארו בטמפרטורת החדר עד להבשלתם. במהלך הבשלת הפרי (13 ,11 ,9 ,6 ,3 ,0 ימים לאחר קטיף), נדגמה רקמת הציפה מ- 3 פירות בכל נקודת זמן. הרקמות הנדגמות הוקפאו בחנקן נוזלי ונשמרו ב- 80°C- בכדי לשמש בהמשך להפקת RNA.

לבסוף, לצורך איסוף עלי אבוקדו, לפני ולאחר עקת יובש, נעשה שימוש בשתילים 'האס' צעירים אשר גודלו בחממה במכון וולקני. בכדי להשרות תנאי עקת יובש נלקחו משתילים אלו עלים בוגרים. העלים נשקלו והושמו על השולחן במעבדה בטמפ' חדר למשך שעתיים-שלוש לצורך ייבושם. לאחר איבוד 20% עד 30% ממשקלם, הושמו העלים בשקיות נייר לחות עטופות בנייר אלומיניום המשך 4 שעות (Xiong *et al*., 2001). העלים הוקפאו בחנקן נוזלי ונשמרו ב- 80°C- בכדי לשמש בהמשך להפקת RNA.

2.2. חתכים היסטולוגים – הערכת מספר תאים וגודל תאים

18 פירות (9 גדולים ו- 9 קטנים) אשר נדגמו בנקודות זמן שונות במהלך תקופת התפתחות הפרי, שימשו לצורך הכנת חתכים היסטולוגיים של רקמת הציפה. הפירות נחתכו לרוחבם, במרכז הפרי, למקטעים בעובי של כ- 0.5 ס"מ. המקטעים קובעו בתמיסת FAA (50%

(Ethanol, 10% Formaldehyde, 5% Acetic acid למשך 24 ש' ועברו סידרה של דהידרציות על ידי השרייתם בריכוזים שונים של אתנול (Ethanol): טרט-בוטנול (Tert-butanol) (פינקלמן כימיקלים בע"מ) (75%:25%, 55%:45%, 35%:50%, 20%:50%, 10%:40% בהתאמה).
לאחר ייבושן קובעו הדוגמאות בפארפין מומס ב- $60^{o}C$ (Paraplast plus) (Oxford Labware, St. Louis. U.S.A.). הכנת החתכים בוצעה ע"י חיתוך הדוגמאות במכשיר מיקרוטום מסוג Laica RM2245 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) החתכים נצבעו בספרנין (Safranin) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) ובפאסט גרין (Fast-green) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), הצובעים באדום: כיטין, סוברין, קוטין, ליגנין ובירוק: ציטופלסמה וצלולוז. החתכים שהוכנו צולמו במיקרוסקופ אור (DMLB 100S) ובמצלמה DC 200 (מתוצרת Leica).
בכדי לחשב את שטח התאים ומספר התאים ברוחבה של רקמת הציפה, נבחרו באקראי בכל חתך שלושה אזורים (בשטח של $90,000\ \mu m^2$): אזור ליד קליפת הזרע, במרכז הציפה וכן ליד האקסוקארפ ונספרו בהם מספר התאים. ממוצע שטח התאים ברקמת הציפה חושב על ידי חילוק השטח הנדגם ($90,000\ \mu m^2$) במספר התאים שהתקבל בכל ספירה. ממוצע מספר התאים הכולל ברוחב רקמת הציפה חושב על ידי שימוש בנוסחה הבאה: $n=d\sqrt{X}*3.33$, כאשר n הינו מספר התאים, d הינו רוחב ציפת הפרי פרי במילימטרים ו- X הוא מספר התאים שנספר באזור הנדגם (Cowan *et al.*, 1997).

2.3. הפקת Total RNA

הפקת Total RNA מרקמות הפרי השונות ומעלים נעשתה בשיטת CTAB (Chang *et al.,* 1993).
איכות ה-RNA נאמדה באמצעות הפרדה על ג'ל אגרוז 1% (20mM NaPhosphate, pH 6.8 8% Formaldehyde) וע"י כימות במכשיר הננודרופ – (Spectophotometer NanoDropND 1000) (NanoDropTechnologies, Rockland, USA).

2.4. שיבוט חלקי של גן ההומולוגי ל *Lefw2.2* מאבוקדו 'האס'

על מנת לשבט גן ההומולוגי ל- *Lefw2.2* מאבוקדו, זוהו תחילה אזורים שמורים בעלי הומולוגיה גבוהה במגוון הצמחים על ידי חיפוש במאגרי המידע NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).
ההשוואה בין רצפים ברמת החלבון ואיתור רצפים שמורים נעשתה בעזרת התוכנה DNAMAN (Lynnon BioSoft) ובאתר- http://align.genome.jp. על בסיס מידע זה, עוצבו תחלים סמי-דגנרטיביים לאזורים השמורים (טבלה מס' 1), תחלים אלה שימשו להגברה של מקטע הגן

בשיטת RT-PCR ע"י שימוש ב- RNA שהופק מרקמת ציפה של פרי קטן, 120 יום לאחר פריחה מלאה. השלמה חלקית של ריצוף הגן נעשתה בשיטת 3'RACE. חיזוי אזורים הידרופוביים בחלבון בוצע באמצעות התוכנות 'DAS' (http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS) ו- SOSUI (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html) (ראה תוצאות, איור מס' 11).

שיבוט מקטע חלקי של *Pafw2.2* בוצע כדלקמן:

הגברת מקטע הגן נעשתה על ידי שימוש בערכת ONE-STEP RT-PCR Premix (Intron, Korea) לפי הוראות היצרן. עקרון השיטה מתבסס על כך שבמבחנה מתבצעת תחילה יצירת הגדיל הראשון של cDNA ולאחריה ראקצית PCR להגברת מקטע ספציפי של גן מטרה, כאשר כל התהליך חל במבחנה אחת.

הריאקציה בוצעה לאחר טיפול מקדים של ה- RNA ב- DNase. טיפול זה נערך באופן הבא:

ל 4 µg של Total RNA הוסף:

1 µl 10X DNase I Buffer (Promega, Madison, WI, USA)

1 µl DNase free RNase (1 U/ µl) (Promega, Madison, WI, USA)

נפח הריאקציה הושלם ל- 10 µl ע"י מים שעברו טיפול ב- DEPC. הדוגמאות הודגרו חצי שעה ב- 37°C לאחר מכן הוסף:

1 µl Stop reaction Buffer (Promega, Madison, WI, USA)

לאחר הטיפול ב- DNase בוצעה הריאקציה כדלקמן:

למבחנה המסופקת בערכה של ONE-STEP RT-PCR Premix (Intron, Korea) הוסף :

2 µg DNAse treated RNA

1 µl Primer forward (Fw2.2 dS) (10 pmol/ul)

1 µl Primer reveres (Fw2.2 dAS) (10 pmol/ul)

וכן מים מזוקקים פעמיים (ddH_2O) מטופלים ב- DEPC עד לנפח של 20 µl.

תנאי ריאקצית ה- PCR היו כדלקמן: 30 דקות ב- 45°C, 5 דקות ב- 94°C, 45 מחזורים של: 30 שניות ב-94°C, 60 שניות ב- 60°C ו- 2 דקות ב-72°C. 10 דקות אחרונות ב- 72°C. הריאקציה בוצעה במכשיר מסוג Multigene של חברת Labnet. תוצר ה- PCR הופרד בג'ל של אגרוז (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) בריכוז של 1.2%. כסמן גודל שימש λ DNA, 1 kb DNA Ladder GeneRuler™ (Farmentes, Canada), המכיל מקטעים בגדלים של 250 - 10000 base pairs (bp).

השלמה חלקית של ריצוף הגן בשיטת 3’RACE:

סינתזת הגדיל הראשון של ה- cDNA, נעשתה ע"י שימוש ב- RNA שהופק מרקמת ציפה של פרי קטן ותחל אשר מכיל Oligo dT ורצף בסיסים ידוע (ראה טבלה מס' 2). רצף זה שימש לאחר מכן כעוגן לריאקצית ההגברה ב PCR.

הגדיל הראשון של ה - cDNA סונתז כדלקמן:

ל-2 µg של total RNA (מטופל ב- DNase) הוסף:

1 µl Oligo dT anchor primer (T17AP) (10 pmole/ µl)

מים מזוקקים פעמיים (ddH_2O) ומטופלים ב- DEPC עד נפח 11 µl

התמיסה הודגרה 5 דקות ב 70°C והועברה במהירות לקרח. למבחנת הריאקציה הוספו:

4 µl 5X M-MuLV RT buffer (Fermentas, Irvine, USA)

2 µl dNTP mix (10 mM each)

0.5 µl RNAse inhibitor (40 U/ µl) (Fermentas, Irvine, USA)

נפח הריאקציה הושלם ל 19 µl ע"י מים מזוקקים פעמים (ddH_2O) מטופלים ב – DEPC.

המבחנה הודגרה למשך 5 דקות ב 37°C.

למבחנת הריאקציה הוסף:

1 µl M-MuLV RT enzyme (200 U/ µl) (Fermentas, Irvine, USA)

המבחנה הודגרה במשך שעה ב-42°C. סיום הריאקציה בוצע ע"י הדגרה למשך 10 דקות ב-70°C.

בהמשך, תוצר ריאקצית ה- cDNA שימש לריאקצית PCR ראשונה שבוצעה כדלקמן:

הריאקציה בנפח כולל של 50 µl הכילה:

10 µl 5X Phusion GC Buffer (מכיל 1.5 mM $MgCl_2$)

1 µl dNTP mix (10 mM each)

1 µl Primer forward 1 (Fw2.2 dS) (10 pmol/ul)

1 µl Anchor Primer (AP) (10 pmol/ul)

0.5 µl Phusion DNA Polymerase (0.02 U/µl) (FINNZYMES, Finland)

1 µl cDNA (0.2 µg)

נפח הריאקציה הושלם ל- 50 µl עם מים מזוקקים פעמים (ddH_2O) מטופלים ב-DEPC.

תנאי ריאקצית ה- PCR היו כדלקמן: 5 דקות ב-98°C, 45 מחזורים של: 10 שניות ב- 98°C, 30 שניות ב- 58°C ו 45 שניות ב- 72°C. 15 דקות אחרונות ב- 72°C. תוצר ה- PCR הורץ בג'ל אגרוז בריכוז של 1.2%.

לאחר ההרצה נוקה התוצר באמצעות ערכת NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Germany) בהתאם להוראות היצרן.

לאחר ריאקצית ה- PCR הראשונה בוצעה ריאקצית PCR נוספת (Semi-nested-PCR).

הריאקציה בנפח כולל של 50 µl הכילה:

3 µl PCR Product

10 µl 5X Green Go Taq Reaction Buffer (7.5 mM $MgCl_2$)

1 µl dNTP mix (10 mM each)

1 µl Primer forward 2 (PaFw2.2 S2) (10 pmol/ul)

1 µl Primer (AP) (10 pmol/ul)

0. 25 µl Go Taq DNA Polymerase (5 U/µl)

נפח הריאקציה הושלם ל-50 µl עם מים מזוקקים פעמים (ddH_2O) מטופלים ב- DEPC.

תנאי ריאקצית ה- PCR היו כדלקמן: 2 דקות ב- 94°C, 45 מחזורים של: דקה אחת ב- 94°C, דקה אחת ב- 58°C ו- 2 דקות ב- 72°C. 15 דקות אחרונות ב- 72°C. תוצר ה- PCR הורץ בג'ל אגרוז 1.2%, נוקה ונשלח למעבדות חי בע"מ לקריאת רצף הבסיסים.

שם התחל	רצף התחל 3 → 5	טמפ' החיבור
Fw2.2 dS	GGTGGTCNACNGGNTTRTGTCATT	65
Fw2.2 dAS	AGCCNCGGTTCTTYAGYTCYCTGT	65

אותיות קוד	N	V	D	B	H	W	M	R	K	S	Y
בסיסים	A,C,G,T	G,A,C	G,A,T	G,T,C	A,T,C	A,T	A,C	A,G	G,T	G,C	C,T

טבלה מס' 1: התחלים הדגנרטיביים אשר שמשו להגברת הגן *Pafw2.2*. ואותיות הקוד לצרופי הבסיסים השונים.

טמפ' החיבור	רצף התחל 3 → 5	שם התחל
57.8	GACTCGAGTCGACATCGA(T)17	T17AP
52.1	GACTCGAGTCGACATCGA	AP
68	ATTGCAGCGATAGTGAACAGAGGAGC	PaFw2.2 S2

טבלה מס' 2: הרצפים ששימשו להגברת מקטע '3 של *Pafw2.2*

2.5. שיבוט חלקי של גן הומולוגי ל- MoCo sulfurase מאבוקדו 'האס'

על מנת לשבט גן הומולוגי ל- *MoCo sulfurase* מאבוקדו זוהו תחילה אזורים שמורים מאזור ה- N טרמינל של הגן בעלי הומולוגיה גבוהה במגוון צמחים על ידי חיפוש במאגרי המידע NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). ההשוואה בין רצפים ברמת החלבון ואיתור רצפים שמורים נעשתה בעזרת התוכנה DNAMAN (Lynnon BioSoft) ובאתר- http://align.genome.jp. על סמך הרצף של הגן מעגבנייה, עוצבו תחלים לאזורים השמורים (ראה טבלה מס' 3). תחלים אלו שימשו להגברת מקטע הגן מ- cDNA שהופק מ- RNA מרקמת ציפה מפרי קטן של אבוקדו 'האס'.

הגדיל הראשון של ה- cDNA סונתז כמתואר בסעיף 2.4.

תוצר ריאקצית ה- cDNA, שימש לריאקצית PCR שבוצעה כדלקמן:

הריאקציה בנפח כולל של 50 µl הכילה:

10 µl 5X Phusion GC Buffer (1.5 mM $MgCl_2$ מכיל)

1 µl dNTP mix (10 mM each)

1 µl Primer forward (MoCo S1) (10 pmol/ul)

1 µl Primer Reverse (MoCo AS1) (10 pmol/ul)

0.5 µl Phusion DNA Polymerase (0.02 U/µl) (FINNZYMES, Finland)

1 µl cDNA (0.2 µg)

נפח הריאקציה הושלם ל- 50 µl עם מים מזוקקים פעמים (ddH_2O) מטופלים ב-DEPC.

תנאי ריאקצית ה- PCR היו כדלקמן: 5 דקות ב- 98°C, 45 מחזורים של: 10 שניות ב- 98°C, 30 שניות ב- 60°C ו 45 שניות ב- 72°C. 15 דקות אחרונות ב- 72°C. תוצר ה-PCR הורץ בג'ל אגרוז בריכוז של 1.2%.

לאחר ההרצה נוקה התוצר באמצעות ערכת NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Germany) בהתאם להוראות היצרן.

שם התחל	רצף התחל 3 → 5	טמפ' החיבור
MoCo S1	AACAGCGTCCTTGGGATTAGGGAA	60.3
MoCo AS1	GCACTTGCACCAGGATTGCAAAA	59.2

טבלה מס' 3: התחלים אשר שמשו להגברת הגן *PaMoCo sulfurase* על סמך רצף הגן בעגבנייה.

2.6. אנליזה חצי כמותית (Semi-quantitative RT-PCR)

התחלים הספציפים אשר שמשו לאנליזה חצי כמותית מופיעים בטבלה מס' 4 בפרק זה. תחלים ספציפיים לגנים *Pafw2.2* ו- *PaMoCo sulfurase* תוכננו על פי רצף הבסיסים של ה- DNA ששובט (מפורט לעיל). תחלים ספציפיים לגנים *PaNCED1* ו- *PaNCED3* תוכננו על פי רצף הגנים שפורסם בעבר (Charnys and Zeevaart, 2000). תחלים ספציפיים לגן *PaACTIN*, תוכננו בהתאם לרצף הגן המופיע במאגר המידע של Floral Genome Project (http://fgp.bio.psu.edu/fgp).

הגדיל הראשון של ה- cDNA מרקמות שונות (עלים, ציפה, קליפת זרע וזרע) סונתז כמתואר בסעיף 2.4, הגברת מקטעי גנים ספציפים בוצעה כדלקמן:

5 µl 5X Green Go Taq Reaction Buffer (7.5 mM $MgCl_2$ מכיל)
1 µl dNTP mix, 10 mM each
1 µl Primers forward (10 pmol/ul)
1 µl Primer reveres (10 pmol/ul)
0.125 µl Go Taq DNA Polymerase (5 U/µl)
1 µl cDNA (0.2 µg)

נפח הריאקציה הושלם ל- 25 µl עם מים מזוקקים פעמים (ddH_2O) מטופלים ב- DEPC.
תנאי ריאקצית ה- PCR היו כדלקמן: 2 דקות ב- 94°C, 27-42 מחזורים של: דקה אחת ב- 94°C, דקה אחת בטמפרטורות המתאימות לכל זוג תחלים, דקה אחת ב- 72°C ושלב הארכה קצר - 10 שניות בלבד - 72°C. עבור כל גן כוילו תנאי הריאקציה ומספר מחזורי ההגברה ב- PCR (ראה טבלה מס' 4) באופן זה, כמות התוצר שמתקבלת בכל ריאקציה מקבילה למידת התבטאות הגן ברקמה הנבדקת.

שם הגן	שם התחל[1]	רצף התחל 3 ← 5	טמפ' החיבור	מספר מחזורי PCR	תוצר PCR (bp)
Pafw2.2	PaFW2.2 F	ATTGCAGCGATAGTGAACAGAGGAGC	65	42	201
	PaFW2.2 R	TTCTTGGCACAAGGCACAACACTC			
PaNCED1	PaNCED F	TCAACGAATCCAACCAGAGCCTGA	60	42	818
	PaNCED R	TACAAGCAGTGGAAGAAGGGAAGG			
PaNCED3	PaNCED3 F	GAACAAGACCCTGAGACTGAG	60	42	302
	PaNCED3 R	ATTATAGAGAACCAGCTAAGGTAC			
PaMoCo sulfurase	PaMoCo F	ACCCAAGCTATGTCACCAGCAGAA	60	27	524
	PaMoCo R	AGAGAAGCCGTATGCCTGGCTATT			
PaACTIN	PaActin F	TGAAATACCCCATTGAGCATGG	60	27	267
	PaActin R	GAATCCAGTACAATACCTGTGGTACG			

טבלה מס' 4: רצפי התחלים, טמפ' החיבור ומס' מחזורי ה- PCR אשר שמשו להגברת הגנים השונים בריאקצית ה- sq-RT-PCR וגודל התוצר המצופה.

1- F מיצג את התחל forward , R מייצג את התחל reverse.

2.7. Northern blot (Drager and Stern, 1998)

דגם הביטוי של הגנים *PaNCED1* ו- *PaNCED3* בציפת הפרי במהלך הבשלת הפרי ובעלים בעקבות השראת יובש בעלים, נבדק ע"י אנליזת Northern. בשל ההומולוגיה הגבוהה בין הגנים הנ"ל, השתמשנו בגלאים ספציפים שהוגברו מחלקי ה 3'UTR של שני הגנים אלו (Charnys and Zeevaart, 2000).

סימון הגלאים בוצע באופן הבא:

מקטעי ה- DNA המנוקים אשר שמשו כגלאים (50 ng) הורתחו ב 100^oC למבחנת הריאקציה הוסף:

10X buffer klenow (Promega, Madison, WI, USA)

0.5mM dNTP-C

0.25 u/µl DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment (Promega, Madison, WI, USA)

1 µg Random Primers (Promega, Madison, WI, USA)

2 µl [α^{32}P] dCTP (Roche Diagnostics, Meylan,France)

המבחנה הודגרה למשך שעה ב 37°C.

ניקוי הבסיסים העודפים נעשה ע"י הערכה: QIAquick nucleotide removal kit (Qiagene, Inc. Hilden, Germany)

הרצת הדוגמאות ו- Blotting

לדוגמאות ה- RNA (10 µg) הוספו 7 µl של בופר הרצה (50% Formamide, 16.5% Formaldehyde, 10mM EDTA, 40mM NaPhosphate, pH 6.8, 0.2 µg/µl EtBr, 10% Glycerol, Bromofenol blue). הדוגמאות חוממו למשך 15 דקות ב- 65°C על מנת לפתוח את המבנה השניוני של ה- RNA. מיד לאחר מכן הועברו הדוגמאות לקרח והוטענו בג'ל אגרוז 1.2% (8% Formaldehyde, 20mM NaPhosphate, pH 6.8). הפרדת הדוגמאות נעשתה בבופר הרצה (10mM NaPhosphate, pH 6.8, 7.5% Formaldehyde) במכשיר אלקטרופורציה במתח של 100V למשך כ- 4 שעות. לאחר ההרצה וההפרדה של ה- RNA בשדה חשמלי הועברו הדוגמאות לממברנת ניילון ($Hybond –N^{+}$, Amersham, Buckinghamshire, UK) (Sambrook *et al*., 1989).

קדם היברידיזציה

חסימת האתרים הפנויים מחומצות גרעין בממברנה במטרה למנוע קישור לא ספציפי של הגלאי נעשתה ע"י טלטול הממברנה בתמיסת היברידיזציה ($0.25M\ Na_2PO_4$,pH 6.8-7.2, 100 mg BSA, 3.5% SDS, 1mM EDTA) למשך שעה ב- 65°C.

היברידיזציה

לתמיסת הקדם היברידיזציה הוסף הגלאי המסומן אשר חומם מראש ב- 100°C למשך 5 דקות. תגובת ההיברידיזציה בין הגלאי לבין ה- RNA נעשתה תוך כדי טלטול בתנור היברידיזציה, למשך הלילה ב- 65°C.

שטיפות וחשיפה לפילם

הגלאי נאסף לשימוש חוזר והממברנה נשטפה לשם הסרת שאריות הגלאי שנקשר באופן לא ספציפי. שתי שטיפות ראשונות נעשו עם בופר שטיפה 1 ($40mM\ NaPO_4$,pH 6.8-7.2, 5% SDS), ב- 65°C למשך 5 דקות כל אחת. בהמשך בוצעו שתי שטיפות עם בופר שטיפה 2 ($40mM\ NaPO_4$,pH 6.8-7.2, 1% SDS) ב- 25°C עד לשטיפת מרבית החומר הרדיואקטיבי

הלא קשור (קרינת רקע), וקבלת קריאה חזקה במונה גייגר באזורים ספציפיים. מונה הגייגר היה מדגם FLA-5000 , Fujifilm. הפילם נחשף למשך 1-4 ימים.

2.8. שיטות מולקולאריות כלליות

2.8.1. אלקטרופורזה של DNA בג'ל אגרוז

התמיסות והחומרים הדרושים להרצה הוכנו על פי הפרוטוקולים המקובלים (Maniatis *et al.*, 1982). התמיסות הכילו אתידיום ברומיד (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) בריכוז סופי של 0.2 µg/ml. תוצרי ה- PCR ותוצרי חיתוך של DNA פלסמידי, הופרדו על גבי ג'ל אגרוז בריכוז של 1%-1.5%. ההרצה נעשתה במתקן אלקטרופורזה אופקי שהכיל בופר הרצה 1xTAE ובמתח של 100 Volts. בחינת הג'ל נעשתה על גבי שולחן UV באורך גל של 320 nm (TFX-35M Viber Lourmat, france).

2.8.2. בידוד מקטעי DNA מג'ל אגרוז

בידוד מקטעי DNA מהג'ל, על מנת לקבוע את רצף המקטע, נעשה באמצעות הערכה המסחרית NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Germany) בהתאם להוראות היצרן. הניקוי נעשה על ידי המסת הג'ל וספיחת ה-DNA לממברנת סליקה. לאחר מכן נשטף ה- DNA על ידי בופר המכיל אתנול והומס במים.

2.8.3. החדרת פלסמיד לחיידקי *E.coli*

2.8.3.1. ליגציה - ריתוך מחדר לתוך פלסמיד

ליגציה נעשתה למקטעי DNA, שבודדו בריאקציות PCR לצורך קביעת רצף הבסיסים. הליגציה נעשתה באמצעות ערכת pGEM T Easy (Promega, Madison, WI, USA), בהתאם להוראות היצרן. בריאקצית PCR, מוסיף האנזים Taq Polymerase בתום הארכת התבנית מספר בסיסים מסוג ATP. וקטור הליגציה מכיל בקצותיו בסיסי TTP, ועל-כן יכולה להתבצע ליגציה בין קצוות המחדר לקצוות הוקטור.

הריאקציה בנפח כולל של 10 µl הכילה:

3 µl PCR fragment

1 µl Vector

5 µl 2X Buffer T4 Ligase

1 µl T4 Ligase

הריאקציה בוצעה למשך הלילה בטמפ' של 4°C.

2.8.3.2. הכנת חיידקים קומפטנטיים לטרנספורמציה באמצעות שוק חום-קור (Chung and Miller, 1988).

החיידקים ששימשו בעבודה זו הם חיידקי *E.coli* מסוג DH5α. כל התמיסות עברו עיקור לפני השימוש. הכנת החיידקים נעשתה בשימוש $CaCl_2$, כשהמטרה היא קבלת חיידקים בעלי יכולת מוגברת לקליטת פלסמידים בעזרת שוק חום וקור. תרבית חיידקים גודלה במצע SOB (2% Bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM $MgCl_2$, 10mM $MgSO_4$) ב- 37°C למשך לילה. למחרת, התרבית נמהלה פי 100 עם מצע SOB וגודלה ללילה נוסף בטמפ' של 20°C בטלטול (נפח התרבית 250 ml). הגידול נמשך עד שהתרבית הגיעה ל- $O.D._{650nm}$=0.4-0.6. המשך העבודה נעשה בקרח. בתום הגידול החיידקים קוררו בקרח למשך 10 דקות והושקעו ב- 2500 g במשך 10 דקות ב- 4°C. משקע החיידקים הורחף ב- 80 ml של תמיסת TB מקוררת (10mM Hepes, 15mM $CaCl_2$, 250mM KCl, 55mM $MnCl_2$, pH 6.7) והועבר לקרח למשך 10 דקות. נפח החיידקים חולק ל- 4 מבחנות, כאשר כל מבחנה הכילה 20ml. החיידקים הושקעו ב- 2500 g למשך 10 דקות ב- 4°C והמשקע הורחף ב- 20 ml של TB קר. לכל מבחנה הוסף DMSO 7%. החיידקים קוררו למשך 10 דקות בקרח, חולקו למנות של 500µl והוקפאו מיד בחנקן נוזלי. החיידקים אוחסנו ב- 80°C-.

2.8.3.3. טרנספורמציה לחיידקים

הטרנספורמציה נעשתה באמצעות שוק חום (Chung and Miller, 1988). חיידקים קומפטנטיים הופשרו בקרח. לחיידקים הוסף µl 5-10 מתוצר הליגציה והם הונחו בקרח למשך 30 דקות. החיידקים הועברו ל- 42°C למשך 30 שניות ומיד הוחזרו לקרח למשך שתי דקות. החיידקים אוששו עם µl 800 מצע LB (1% Bacto-Tryptone, 0.5% Bacto-Yeast extract, 1% Nacl, pH 7.2), טולטלו למשך שעה ב- 37°C, ונזרעו על גבי צלחות על מצע LB ואנטיביוטיקה מתאימה לסלקציה (אמפיצילין, בריכוז סופי של 100 µg/ml). הצלחות הודגרו ב- 37°C למשך הלילה.

2.8.4. הפקת DNA פלסמידי וקביעת רצף

מושבות חיידקים בודדות גודלו ב- 3 ml של LB, שהכיל את האנטיביוטיקה המתאימה (אמפיצילין, בריכוז סופי של 100 µg/ml), בטלטול ב- 37ºC למשל לילה. הפקת DNA פלסמידי, נעשתה באמצעות הערכה המסחרית Plasmid Mini Kit (RBC Bioscience, Taipai, Taiwan) בהתאם להוראות היצרן. ההפקה נעשתה על ידי הטענת הנוזל העליון המתקבל לאחר

פירוק החיידקים ומיצוי ה- DNA של הפלסמיד מתוכה. תוצרי הפקה זו שימשו בין היתר לתהליכי קביעת רצף עבור DNA.

2.8.4.1. חיתוך הפלסמיד בעזרת אנזימי רסטריקציה

חיתוך DNA פלסמידי נעשה לאחר בידוד הפלסמיד. החיתוך בוצע על מנת לוודא כניסתו של המחדר הרצוי לתוך הפלסמיד. החיתוך נעשה על ידי אנזים הרסטריקציה *Eco*RI (Promega, Madison, WI, USA).

תנאי הראקציה:

5 µl Plasmid

2 µl 10X Buffer H (Promega, Madison, WI, USA)

0.5 µl EcoR I (12 U/ µl)

נפח הריאקציה הושלם ל- 20 µl עם מים מזוקקים פעמיים. לאחר מכן המבחנה הודגרה למשך שעתיים ב- 37°C.

תוצרי החיתוך הורצו בג'ל אגרוז של 1%.

2.8.4.2. קביעת רצף ה- DNA ועיבוד רצפים

קביעת הרצף נעשתה על ידי מעבדות חי בע"מ (רחובות, ישראל). לקביעת הרצפים נעשה שימוש בתחלים אוניברסליים T7, SP6 או בתחלים ספציפים לרצף. אנליזת הרצפים נעשתה באמצעות תוכנת BLAST באתר: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/index.html.

וכן באמצעות האתר: http://align.genome.jp אשר נתן את ההתאמה לרצף הבסיסים וחומצות האמינו של החלבון המבוקש.

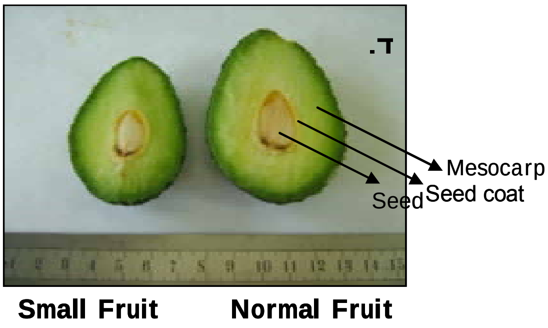
3. תוצאות

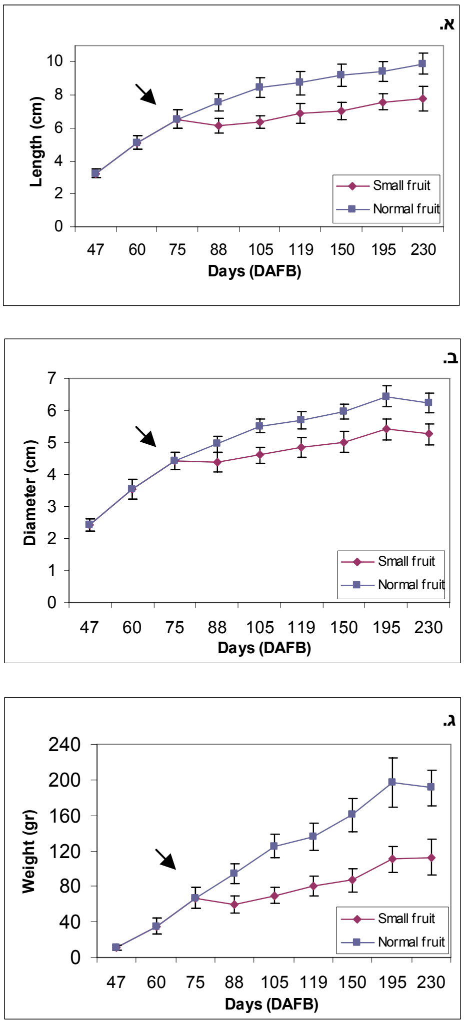
3.1. תוצאות – חלק א.

3.1.1. התפתחות פירות 'האס' גדולים וקטנים - שטח תאים ומספר תאים ברקמת הציפה.

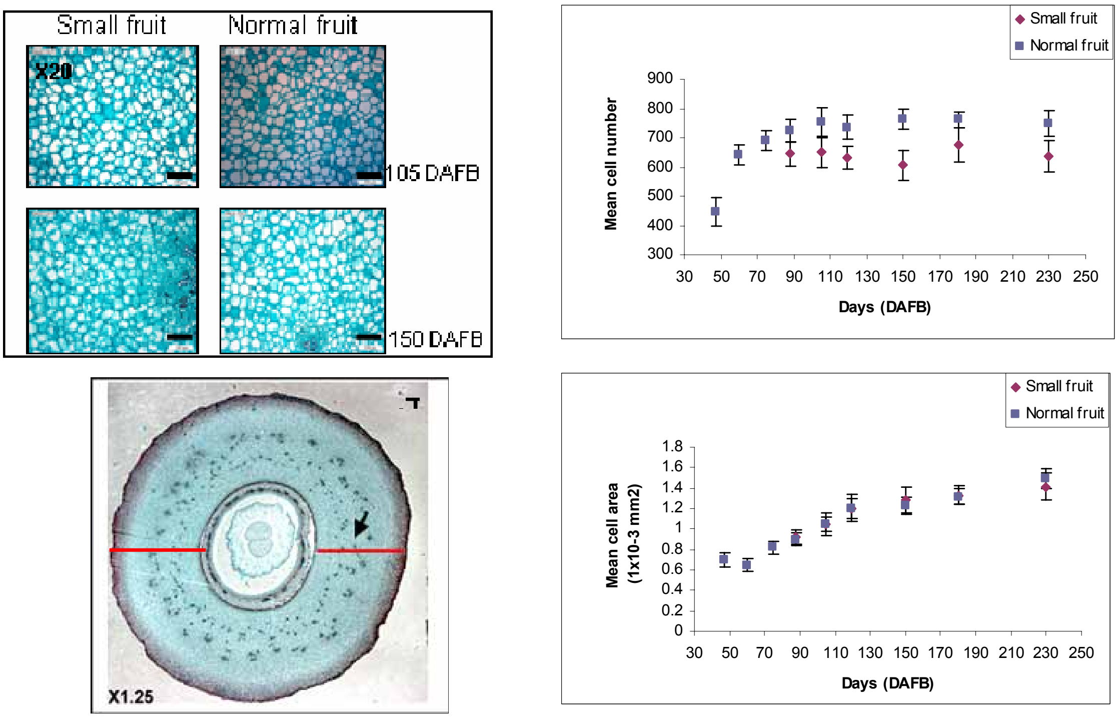
בעבודות קודמות נטען כי הגורם המגביל את התפתחות הפרי בזן 'האס' הינו עיכוב בתהליך חלוקת תאים (Cowan *et al.*, 1997). בעקבות ממצא זה ובכדי לבסס את המערכת המחקרית בה עבדנו, ערכנו בשלב ראשון, בדיקות לקביעת שטח התאים ומספר התאים בפירות גדולים וקטנים במהלך התפתחות הפרי. לצורך בדיקות אלו, נדגמו פירות גדולים וקטנים במועדים שונים במהלך תקופת הגידול. דגימות ראשונות נלקחו 47 ימים לאחר פריחה מלאה, אולם, חלוקה לקבוצת דיגום של פירות גדולים וקטנים התבצעה כ- 90 יום לאחר מועד הפריחה, בשלב בו ניתן היה לזהות בברור הבדלים בין פירות גדולים וקטנים (Cowan *et al.*, 1997). הפירות הובאו למעבדה לצורך מדידות קוטר, אורך ומשקל רטוב. כפי שניתן לראות באיור מס' 4 עקום הגידול של פירות גדולים וקטנים שהתקבל היה בעל אופי סיגמואיד פשוט. הבדלים מובהקים במדדי הרוחב והאורך של הפירות הגדולים וקטנים, נצפו כ- 90 יום לאחר פריחה מלאה וכמו כן, נמצא שינוי מובהק במשקל הפירות הגדולים והקטנים במהלך התפתחות הפרי ובמשקל הפרי הסופי (ראה איור מס' 4 א-ג).

בחינת חתכי רוחב היסטולגיים של ציפת פירות גדולים וקטנים בשלבי התפתחות שונים בוצעה כמתואר בעבודות קודמות (Cowan *et al.*, 1997). תוצאות חישובי מספר התאים לרוחב ציפת הפרי ותוצאות חישובי שטח התאים הממוצע, מוצגים באיור מס' 5. התוצאות שהתקבלו על ידינו מורות כי במהלך התפתחות הפרי חלה בציפת הפירות הגדולים והקטנים גדילה בשטח התאים, גדילה זו התמתנה בחודשים האחרונים של התפתחות הפרי והגיעה לפלטו כ- 120 יום לאחר פריחה מלאה. במהלך תקופת התפתחות הפרי לא נצפו הבדלים מובהקים בשטח התאים הממוצע המחושב בין פירות גדולים וקטנים (איור מס' 5ב' ואיור מס' 5ג'). לעומת זאת, תוצאות חישוב מספר התאים הממוצע לרוחב ציפת הפרי, הראה כי במהלך תקופת התפתחות הפרי מספר התאים בפירות הקטנים, היה קטן באופן מובהק מאשר בפירות גדולים (איור מס' 5א'), תוצאות אלו מורות כי פנוטיפ פרי קטן הינו אמנם תולדה של עיכוב ו/או עצירה בתהליך חלוקת התאים בפרי ואינו נגרם כתוצאה מעיכוב בגידול התאים, בהתאם, התוצאות הללו מאששות ממצאי עבודות קודמות (Cowan *et al.*, 1997).





איור מס' 4 – שינויים במדדי קוטר,אורך ומשקל טרי של פירות גדולים וקטנים מהזן 'האס' במהלך עונת הגידול. (א-ג) השתנות אורך, קוטר ומשקל טרי של פירות 'האס' גדולים וקטנים. העקומות מייצגות ממוצע של 36 פירות -/+ סטיית תקן. החץ מתאר את נקודת הזמן בה בוצעה חלוקה לקבוצות דיגום של פירות גדולים ופירות קטנים. **(ד)** חתך אורך מייצגים של פרי גדול ופרי קטן 88 יום לאחר פריחה מלאה.



איור מס' 5- שינויי ממוצע במספר ובשטח התאים המחושב של פירות גדולים וקטנים במהלך התפתחות הפרי **(א)** שינוי במספר התאים הממוצע המחושב לרוחב רקמת הציפה **(ב)** שטח התאים הממוצע המחושב של פירות גדולים וקטנים במהלך תקופת התפתחות הפרי. העקומות והנקודות מייצגות ממוצע של 54 ספירות +/- סטיית תקן. **(ג)** חתכי רוחב היסטולוגים מציפת פירות גדולים וקטנים בשלבים שונים של התפתחות הפרי **(ד)** חתך רוחב היסטולוגי של חנט אבוקדו צעיר. האזורים אשר שימשו לספירת תאים מסומן באדום.

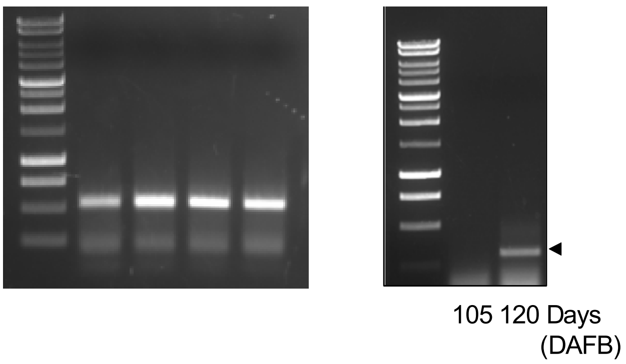
3.1.2. שיבוט חלקי של גן הומולוגי ל- Lefw2.2 מאבוקדו 'האס'.

כפי שצויין במבוא *Lefw2.2* הינו גן המקודד לחלבון הפועל כבקר שלילי של חלוקת תאים בשלבי התפתחות מוקדמים של פרי העגבנייה. עלייה בביטוי דגם הביטוי של גן זה נמצאת בקורלציה הפוכה עם הפעילות המיטוטית בפרי (Cong *et al.*, 2002). בהילקח בחשבון תוצאות עבודות קודמות המורות כי הגורם המעכב את התפתחות הפרי בזן 'האס' אינו עיכוב בגידול התאים, אלא עיכוב בתהליך חלוקתם (Cowan *et al.*, 1997), ובעקבות אישוש ממצא זה בעבודה זו, ניתן היה להניח כי גן זהה המקודד לחלבון הפועל באופן דומה, קיים באבוקדו. מתוך הנחה זו החלטנו לנסות לשבט גן הומולוגי ל- *Lefw2.2* באבוקדו 'האס'. שיבוט חלקי של הגן בוצע בשיטת RT-PCR על ידי שימוש ב- cDNA שהופק מרקמת ציפה של פירות קטנים (120 ימים לאחר פריחה מלאה). לצורך כך הושוו תחילה רצפי ESTs ממגוון צמחים אשר הראו הומולוגיה גבוהה ל- *LeFw2.2* ותוכננו תחלים סמי-דגנרטיביים כנגד אזורים שמורים אלו (ראה חומרים ושיטות,

סעיף 2.4). שימוש בתחלים אלו הוביל להגברת מקטע DNA באורך 102 bp אשר הראה הומולוגיה של 70.26% ברמת ה- DNA ו- 52.67% ברמת החלבון לגן *Lefw2.2*. בהמשך, בודד קצהו ה- '3 של הגן בשיטת 3'RACE. ג'ל מייצג של תוצרי ה PCR שהתקבלו משימוש בתחלים הסמי-דגנרטיבים של הגן *Lefw2.2* ושל תוצר ה 3'RACE מוצגים באיור מס' 6. הגן החלקי אשר שובט מאבוקדו הינו באורך 564 בסיסים, מתוכם 156 בסיסים מהווים את האזור הלא מתורגם של הגן (3'UTR). רצף הגן החלקי המתורגם מקודד ל- 136 חומצות אמיניות וחולק הומולוגיה של 65.44% ברמת ה- DNA ו- 63.70% ברמת החלבון עם הגן *Lefw2.2* – בהתאם כונה גן זה על ידינו *Pafw2.2* (ראה איור מס' 7 ו- 8).

השוואת רצף הגן החלקי המתורגם *Pafw2.2* עם רצף הגן המתורגם *Lefw2.2* מעגבנייה ועם מספר רצפי ESTs הומולוגים מתורגמים מייצגים מוצגת באיור מס' 9. מתוצאות השוואה זו ניתן לראות כי *Pafw2.2* חולק הומולוגיה גבוהה (עד 71.8%) עם ESTs ממספר מיני צמחים חד פסיגיים ודו פסיגיים. ההומולוגיה הגבוהה ביותר נמצאה לתרגום EST מגפן המקודד לחלבון בעל פעילות בלתי ידועה ואילו הומולוגיה הנמוכה ביותר (53.4%) נמצאה לתרגום EST מפטוניה המקודד אף הוא לחלבון בעל פעילות שאינה מוגדרת.

אנליזה פונקציונלית של מקטע החלבון PaFW2.2 הראתה כי בחלבון קיים אזור (domain) הנקרא PLAC8 (Placenta-specific gene 8 protein) (איור מס' 10), דומיין עשיר בחומצה האמינית ציסטאין (Cys) המצוי ב- 127 חלבונים בחי ובצומח (Nakagawa *et al.*, 2006). תפקידו של דומיין זה, המצוי גם כן ב- LeFW2.2, אינו ידוע אולם ניתן לשער כי גשרי ציסטיאינים הנוצרים באזור זה עשויים להשפיע על מבנהו המרחבי של החלבון. שימוש בתוכנה לחיזוי אזורים חוצי ממברנה בחלבון, מורה כי ב- *Pafw2.2* קיימים שני אזורים (domains) הידרופוביים העשויים להוות לכאורה אזורים חוצי ממברנה, אזורים אלו מקבילים לאזורים אשר מופו כאזורים חוצי ממברנה ב- *Lefw2.2* (Cong and Tanksley, 2006) (איור מס' 11). רמת הדמיון הגבוהה ברמת החלבון וברמת המבנה השניוני המשוער בין *Pafw2.2* ובין *Lefw2.2* מעלה את האפשרות כי *Pafw2.2* עשוי לקודד לחלבון הפועל באופן דומה ל- LeFW2.2, קרי, כבקר שלילי של חלוקת תאים בפרי.



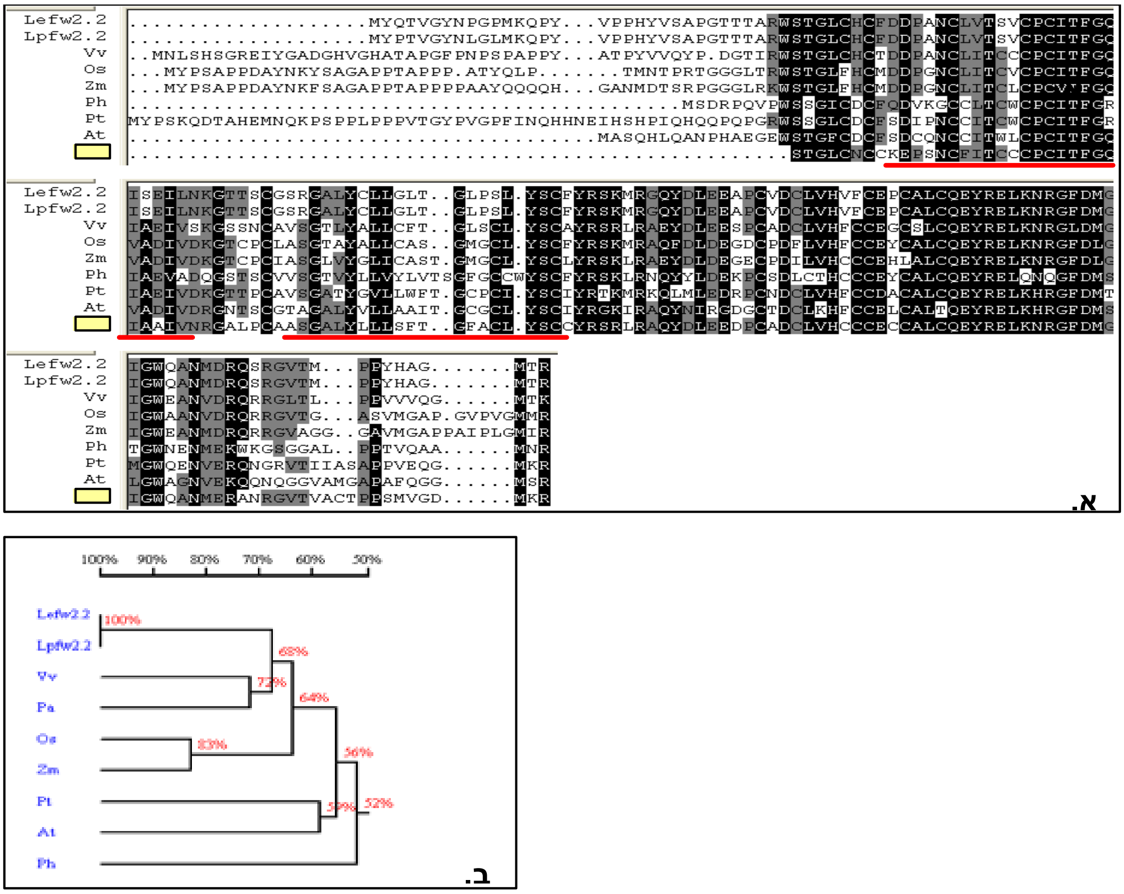
איור מס' 6 - תוצרי RT-PCR של הגן *Pafw2.2*. (א) תוצר ה PCR שהוגבר מ cDNA על ידי שימוש בתחלים סמי-דגנרטיבים כנגד אזורים שמורים ב- *fw2.2*. (ב) תוצרי הגברה שהתקבלו בשיטת 3'RACE.

```
1          TCGACTGGTCTTTGTCATTGCTGCAAAGAACCCTCAAATTGTTTTATCACCTGCTGTTGC
1           S  T  G  L  C  H  C  C  K  E  P  S  N  C  F  I  T  C  C  C

61         CCATGCATCACATTTGGACAGATTGCAGCGATAGTGAACAGAGGAGCCCTGCCTTGTGCG
21          P  C  I  T  F  G  Q  I  A  A  I  V  N  R  G  A  L  P  C  A

121        GCTAGCGGCGCTCTGTACCTCCTGTTGAGTTTTACAGGCTTTGCTTGCTTGTACTCATGC
41          A  S  G  A  L  Y  L  L  L  S  F  T  G  F  A  C  L  Y  S  C

181        TGCTATCGTTCGAGATTGAGGGCGCAGTATGACTTGGAGGAGGACCCTTGTGCGGACTGC
61          C  Y  R  S  R  L  R  A  Q  Y  D  L  E  E  D  P  C  A  D  C

241        CTAGTTCATTGCTGTTGTGAGTGTTGTGCCTTGTGCCAAGAATACAGAGAGCTCAAGAAC
81          L  V  H  C  C  C  E  C  C  A  L  C  Q  E  Y  R  E  L  K  N

301        CGCGGTTTTGACATGGGAATCGGTTGGCAAGCAAACATGGAGAGGGCAAACCGTGGTGTT
101         R  G  F  D  M  G  I  G  W  Q  A  N  M  E  R  A  N  R  G  V

361        ACTGTTGCCTGTACACCACCATCAATGGTTGGAGACATGAAGAGATAGGTGTTGGGTCAA
121         T  V  A  C  T  P  P  S  M  V  G  D  M  K  R  *

421        ATTTGATTGAGCAATTGTAGCTACAATATTGTCATGTAACTGCCACAAATAACAGGGTCA
481        TCTCCATATATCGTTTCTATAACTGAGTACTCTTATGGGTGTTTGGTACTTTGATTACAT
541        GATTTCAAAATAATGCATTGTGCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

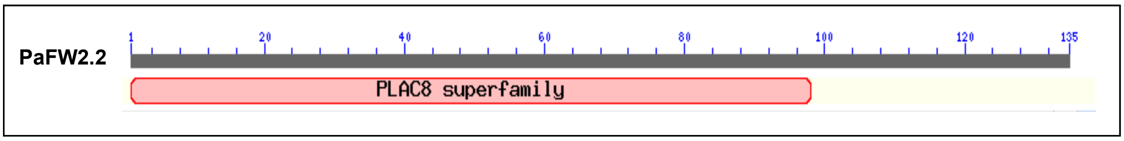
איור מס' 7 – רצף הגן החלקי *Pafw2.2*. רצף הנוקליאוטידים וחומצות האמינו של *Pafw2.2*. האזור של ה- ORF (Open reading frame) מסומן באפור. תרגום רצף חומצות האמינו נעשה בתוכנה DNAMAN.

```
Lefw2.2        ATGTATCAAACGGTAGGATATAATCCAGGTCCAATGAAACAACCTTATGTTCCTCCTCAC
Pafw2.2        ------------------------------------------------------------


Lefw2.2        TATGTATCTGCCCCCGGCACCACCACGGCGCGGTGGTCGACTGGTCTTTGTCATTGTTTT
Pafw2.2        ------------------------------------TCGACTGGTCTTTGTCATTGCTGC
                                                   ******************** *

Lefw2.2        GATGACCCTGCTAACTGTTTAGTTACTAGTGTTTGCCCTTGTATCACCTTTGGACAGATT
Pafw2.2        AAAGAACCCTCAAATTGTTTTATCACCTGCTGTTGCCCATGCATCACATTTGGACAGATT
               .*:**.**  *:** *****:.* ** :*   ******:** *****.************

Lefw2.2        TCTGAAATACTAAACAAAGGAACAACTTCATGTGGGAGTAGAGGTGCATTATATTGTTTG
Pafw2.2        GCAGCGATAGTGAACAGAGGAGCCCTGCCTTGTGCGGCTAGCGGCGCTCTGTACCTCCTG
                *:*..*** *.****.****.*..   *:**** *. ***.** **: *.**     **

Lefw2.2        CTGGGATTGACAGGATTGCCTAGCCTATATTCCTGCTTCTACAGGTCTAAAATGAGGGGG
Pafw2.2        TTGAGTTTTACAGGCTTTGCTTGCTTGTACTCATGCTGCTATCGTTCGAGATTGAGGGCG
                **.*:** *****.**  **:** *.** **.**** *** .* ** *.*:****** *

Lefw2.2        CAATATGATCTGGAAGAGGCACCTTGTGTTGATTGTCTTGTACATGTATTCTGTGAACCT
Pafw2.2        CAGTATGACTTGGAGGAGGACCCTTGTGCGGACTGCCTAGTTCATTGCTGTTGTGAGTGT
               **.*****  ****.****..*******  ** ** **:**:***  .*  *****.  *

Lefw2.2        TGTGCTCTTTGCCAAGAATACAGAGAGCTTAAGAACCGTGGCTTTGATATGGGAATAGGG
Pafw2.2        TGTGCCTTGTGCCAAGAATACAGAGAGCTCAAGAACCGCGGTTTTGACATGGGAATCGGT
               *****  * ******************** ******** ** ***** ********.**

Lefw2.2        TGGCAAGCTAATATGGATAGACAAAGCCGAGGAGTTACCATG------------CCCCCT
Pafw2.2        TGGCAAGCAAACATGGAGAGGGCAAACCGTGGTGTTACTGTTGCCTGTACACCACCATCA
               ********:** ***** **. .**.***:**:***** .*             **. *:

Lefw2.2        TATCATGCAGGCATGACCAGGTGA
Pafw2.2        ATGGTTGGAGACATGAAGAGATAG
               ::  :** **.*****. **.*..
```

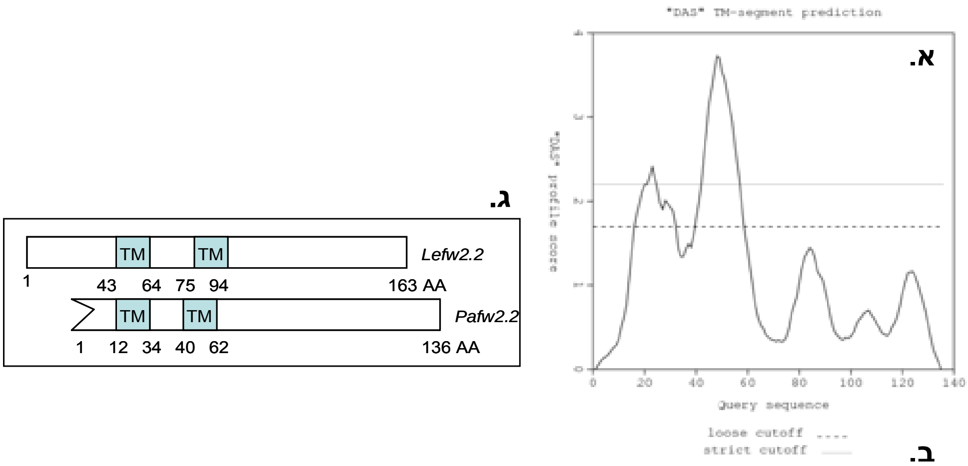
איור מס' 8 – השוואת רצף הגן החלקי *Pafw2.2* לגן *Lefw2.2* בעגבנייה. אנליזת ה- Multiple Alignment נעשתה בתוכנה ClustalW. * - נוקלאוטיד שמור בכל הפרטים הנבדקים



איור מס' 9- השוואת רצף הגן המתורגם *Pafw2.2* עם רצף הגן המתורגם *Lefw2.2* ומספר רצפי ESTs הומולוגים מתורגמים מייצגים. (א) השוואת רצף הגן המתורגם *Pafw2.2* עם רצף LeFW2.2 (*Lycopersicon esculentum*, AAF74286) רצף LpFW2.2 (AAF74287 *Lycopersicon pennellii*), ורצפי ESTs צמחיים מתורגמים מגפן (*Vitis vinifera*, CAO47798), אורז (BAF10122 *Oryza sativa*), תירס (*Zea mays*, ACF85498) פטוניה (*Petunia x hybrid*, AAD02554), צפצפה (*Populus trichocarpa*, ABK95453) וארבידופסיס (*Arabidopsis thaliana*, NP_680337). רצפי ה- ESTs הינם ממאגר רצפי ESTs ב- NCBI. אזורים מושחרים מורים על זהות של 75% ומעלה בכל הפרטים הנבדקים. אזורים אפורים: זהות של 50% עד 75%. אזורים בעלי פוטנציאל להיות חוצי ממברנה מסומנים באדום. **(ב)** עץ פילוגנטי על סמך אחוזי ההומולוגיה בין הרצפים הצמחיים השונים שהתקבלו ב- BLAST (נעשה בתוכנה DNAMAN).



איור מס' 10- אנליזה פונקציונאלית של מקטע החלבון PaFW2.2. האזור הנקרא PLAC8 מסומן באדום. (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)



No.	N terminal	transmembrane region	C terminal	type	length
1	12	SNCFITCCCPCITFGQIAAIVNR	34	SECONDARY	23
2	40	AASGALYLLLSFTGFACLYSCCY	62	PRIMARY	23

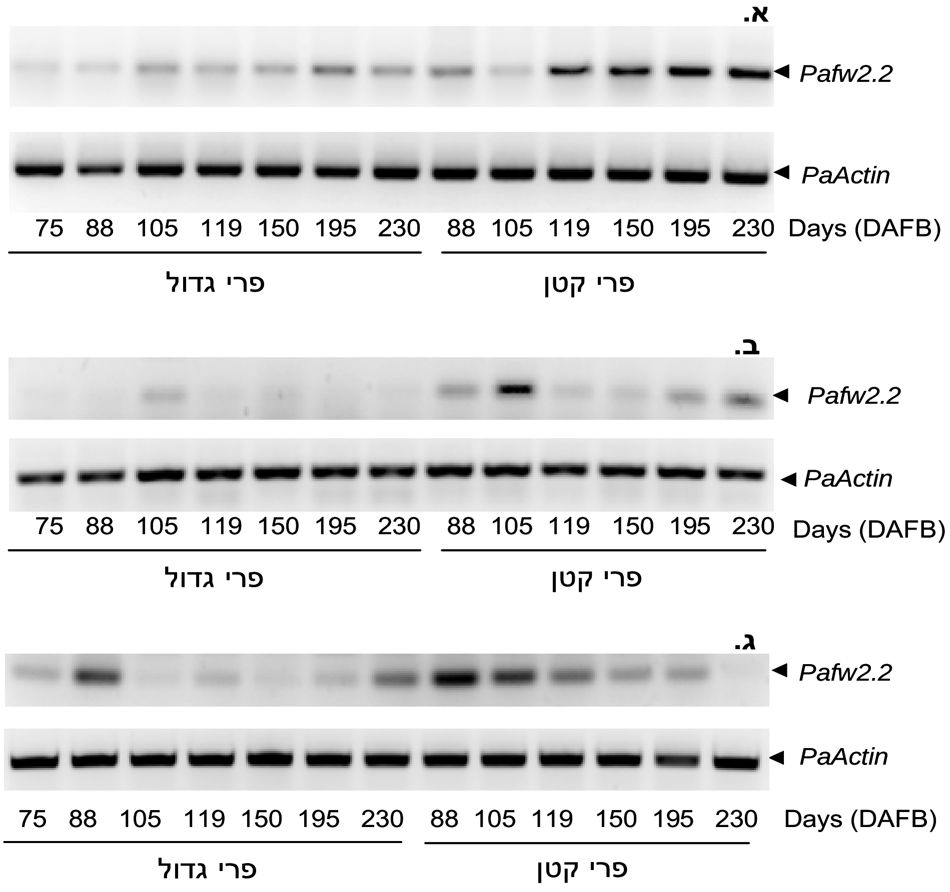
איור מס' 11- מבנה PaFW2.2. **(א)** חיזוי אזורים הידרופוביים, חוצי ממברנה ב PaFW2.2. **(ב)** רצף חומצות האמינו של אזורים חוצי ממבנה ב- PaFW2.2 . **(ג)** דיאגראמות סכמאטיות המשוות בין מבנה PaFW2.2 ו- LeFW2.2.

3.1.3. בחינת דגם הביטוי של הגן *Pafw2.2* במהלך התפתחות הפרי

בכדי לבדוק את דגם ביטוי הגן *Pafw2.2* במהלך התפתחות הפרי ולבחון האם קיים הבדל בפרופיל ביטוי הגן בין פירות קטנים וגדולים בוצעה אנליזת sq-RT-PCR. לצורך סינתזת cDNA נעשה שימוש ב- RNA אשר הופק מרקמת הציפה, קליפת הזרע והזרע של פירות גדולים וקטנים. לצרכי ביקורת פנימית, נבדק במקביל דגם הביטוי של גן המקודד לאקטין אשר אמור להתבטא באופן קונסטיטוטיבי. איור 12א' מורה כי במהלך התפתחות הפרי חלה ברקמת הציפה של פירות גדולים וקטנים עלייה בביטוי הגן, עלייה אשר הגיעה לשיאה כ- 195 יום לאחר פריחה מלאה. בקליפת הזרע ביטוי ה mRNA עבור *Pafw2.2* היה נמוך הן בפירות גדולים והן בפירות הקטנים, אולם נצפתה רמה גבוהה יחסית בביטוי הגן כ- 105 יום לאחר פריחה מלאה בפירות הקטנים (איור מס' 12ב'). במקביל, ברקמת הזרע (איור מס' 12ג') נצפו בפירות קטנים רמות גבוהות של ביטוי ה- mRNA עבור *Pafw2.2* בתקופה שבין 88 ל- 105 יום לאחר פריחה מלאה, וירידה הדרגתית בביטוי הגן במהלך התפתחות הפרי. בזרעי פירות גדולים נצפתה רמה גבוהה בביטוי הגן כ- 88 יום לאחר פריחה מלאה.

רמת הביטוי של ה- mRNA עבור אקטין הייתה אחידה במהלך התפתחות הפרי ולא נצפו הבדלים בין פירות גדולים וקטנים.

יש להדגיש כי למרות הדמיון בפרופיל ביטוי *Pafw2.2* בין פירות גדולים וקטנים, נצפתה שונות כוללת ברמת ביטוי הגן בין פירות גדולים וקטנים. בהילקח בחשבון רצף תקופת התפתחות הפרי, רמת ביטוי ה mRNA עבור *Pafw2.2* הייתה גבוהה באופן ניכר ברקמות פירות קטנים לעומת פירות גדולים. חשוב לציין כי התוצאות המוצגות באיור מס' 12 מהוות תוצאות מייצגות. תוצאות דומות, אם כי לא זהות לחלוטין, המורות כי במהלך רצף תקופת התפתחות הפרי רמת הביטוי הכוללת של *Pafw2.2* הייתה גבוהה בפירות קטנים לעומת פירות גדולים, התקבלו בשלוש חזרות בלתי תלויות שנערכו באופן דומה (ראה נספח 1).



איור מס' 12 – אנליזת sq-RT-PCR לאפיון ביטוי הגן *Pafw2.2* במהלך תקופת התפתחות הפרי בפירות גדולים וקטנים (תמונת נגטיב). cDNA מרקמת הציפה (**א**), קליפת זרע (**ב**) והזרע (**ג**) שימש להגברת מקטע הגן *Pafw2.2* ע"י 42 מחזורי PCR ולהגברת מקטע הגן *PaActin*, על ידי 27 מחזורי PCR .

3.2. תוצאות - חלק ב

3.2.1. שיבוט חלקי של גן מאבוקדו 'האס' המקודד לכאורה ל- MoCo sulfurase

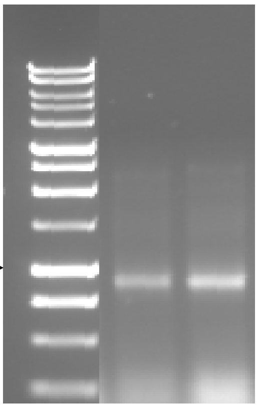
עבודות שנערכו באבוקדו 'האס' הראו כי בפרי קטן חלה עלייה חדה ביצירת/צבירת ABA, בעקבות ממצא זה הוצע, כי שינוי במאזן ההורמונלי, הנגרם כתוצאה מעלייה ב- ABA, עשוי להיות אחד הגורמים התורמים לעיכוב תהליך חלוקת התאים ולפנוטיפ פרי קטן בזן 'האס' (Taylor and Cowan, 2001). אחת ממטרות עבודה זו הייתה שיבוט גנים מאבוקדו המקודדים לאנזימים הפעילים בשלבים האחרונים של מסלול סינתזת ABA, ואפיון ביטוים בפירות גדולים וקטנים במהלך התפתחות הפרי. בשלב ראשון בחרנו להתמקד בשיבוט ואפיון הגן המקודד לאנזים MoCo sulfurase. אנזים הפועל כקטליזטור המזרז הוספת שייר גופרית לחלבונים המכילים קופאקטור MoCo. מודיפקציה זו, המתרחשת לאחר תרגום, מאפשרת בין היתר את הפעלת האנזים ABA-AO המקטלז את השלב האחרון של סינתזת ABA. בכדי לבודד את הגן המקודד לכאורה ל- MoCo sulfurase באבוקדו, השוונו תחילה את רצפי הגנים *FLACCA* ו- *ABA3* (המקודדים לגן *MoCo sulfurase* בעגבנייה ובארבידופסיס – ראה סעיף 1.8 במבוא). על סמך השוואה זו, תוכננו תחלים כנגד אזורים שמורים בגנים הללו. התחלים שאיתם עבדנו התבססו על רצף הגן *FLACCA* מעגבנייה (ראה חומרים ושיטות, סעיף 2.4). שיבוט חלקי של הגן בוצע בשיטת RT-PCR ע"י שימוש ב- cDNA אשר סונטז מציפת פרי קטן. בשיטה זו הוגבר מקטע DNA באורך 789 bp אשר הראה הומולוגיה של 68.61% ו- 67.93% ברמת ה- DNA למקטעי הגנים המקבילים *FLACCA* ו- *ABA3* מעגבנייה ומארבידופסיס (איור מס' 13). תוצאותינו הראו כי מקטע הגן המתורגם מקודד ל- 263 חומצות אמיניות ומראה הומולוגיה של 67.3% ו- 65.8% לחלבוני MoCo sulfurase מארבידופסיס ומעגבנייה, בהתאם כונה מקטע גן זה על ידינו *PaMoCo sulfurase*. השוואת רצף הגן החלקי המתורגם *PaMoCo sulfurase* עם מספר גנים ממינים שונים המקודדים לחלבון MoCo sulfurase מוצגת באיור מס' 14. חלקו ה-N טרמינלי של החלבון מכיל מספר אזורים הדרושים לפעילות האנזים, בינהם: אזור קישור PLP (pyridoxal 5-phosphate binding motif), מוטיב המכיל ציסטאין שמור (C_{430} ב- ABA3 ו- C_{427} ב- FLACCA) ושני דומינים נוספים הקרויים MoCo domains (molybdopterin-oxidoreductases). כפי שניתן לראות באיור 14א', כל האזורים הללו מצויים במקטע החלבון המתורגם אשר בודד מאבוקדו. תוצאות אנליזת - BLAST של מקטע החלבון המתורגם מאבוקדו באתר NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) כללו חלבוני MoCo sulfurase ממערכות שונות ביניהם צמחים, אצות, חד תאיים ויונקים. ההומולוגיה

הגבוהה ביותר של PaMoCo sulfurase התקבלה עם החלבון ABA3 מארבידופסיס ועם תרגום ESTs מגפן (67.3%). עבור החלבון FLACCA מעגבנייה התקבלה הומולוגיה של 65.8%. הומולוגיה נמוכה התקבלה עם חלבונים מעכבר ומאדם בעלי דומין הומולוגי לחלקו ה N טרמינלי של MoCo sulfurase (41.4% ו- 42.2%, בהתאמה).

א.

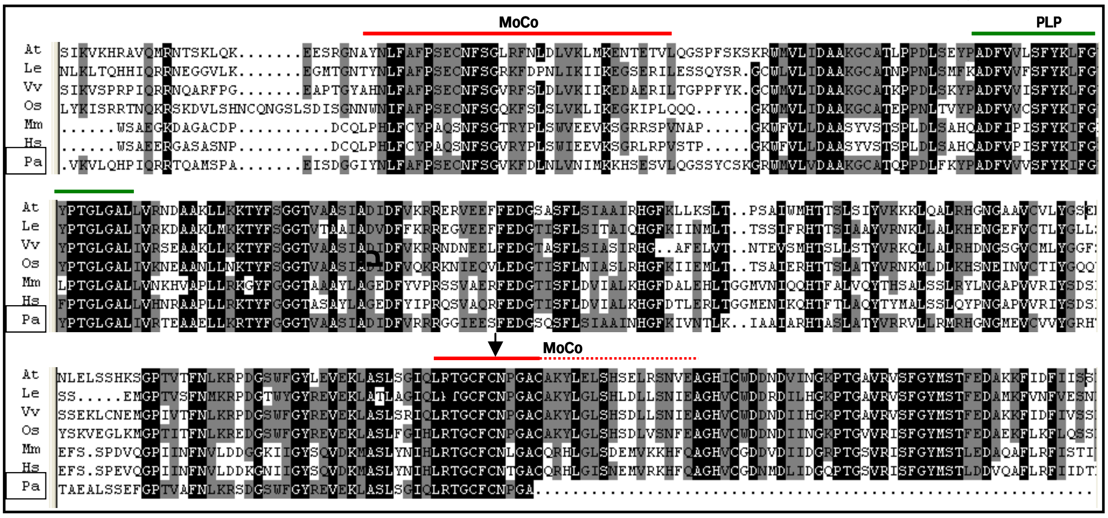
```
Pa          ---------------------------------------------------GTTAAGGTT
FLACCA      ATTGAAGATACA------CATGTTGGTGAATCAGAAAGCCCACAGTCTAACTTAAAACTA
ABA3        ATTGAAGAGGCAGCTAACCAACCAGGCCAGCTTACAAATTCAGGACCATCTATCAAGGTA
                                                                * **  *

Pa          TTGCAACATCCAATACAGAGGAGAACCCAAGCTATGTCACCAGCAGAAATCTCAGACGGT
FLACCA      ACACAGCACCACATTCAGAGAAGAAATGAAGGTGGCGTTCTGAAAGAAGGGATGACAGGT
ABA3        AAGCATCGTGCTGTGCAGATGAGAAACACTTCTAAACTCCAAAAGGAAGAGTCAAGAGGA
               ** *      * ****  ****       *      *     ***         **

Pa          GGTATTTACAACTTATTTGCCTTTCCTTCAGAGTGCAATTTCTCTGGTGTGAAATTTGAC
FLACCA      AACACATACAACTTGTTTGCATTCCCATCAGAATGCAATTTTTCAGGTCGAAAATTCGAC
ABA3        AATGCCTATAATCTATTTGCTTTCCCCTCGGAGTGCAATTTTTCTGGCCTGAGGTTTAAT
                  ** **  * ***** ** ** ** ** ******** ** **    *  **  *

Pa          CTCAACTTGGTTAATATTATGAAGAAACATTCGGAAAGTGTTCTGCAAGGCTCATCATAT
FLACCA      CCTAACCTGATTAAGATTATCAAAGAAGGGTCTGAAAGAATCTTAGAAAGCTCCCAGTAT
ABA3        CTAGATCTGGTGAAGTTGATGAAAGAAAATACTGAGACCGTGCTACAAGGCTCCCCCTTT
            *   *  ** * **  * ** **  **    * ** *   *  *  ** ****    * *

Pa          TGTAGTAAGGGGCGATGGATGGTTTTGGTTGATGCTGCAAAAGGATGTGCAACACAACCA
FLACCA      TCCAG---AGGTTGCTGGTTAGTTCTGATAGATGCTGCTAAAGGATGTGCTACCAATCCA
ABA3        AGCAAGAGCAAGCGGTGGATGGTCTTGATTGATGCTGCAAAGGGTTGTGCTACACTACCA
               *         * *** * **  ** * ******** ** ** ***** **    ***

Pa          CCTGATCTTTTCAAGTACCCTGCTGATTTTGTCGTCGTCTCATTTTATAAGATATTTGGC
FLACCA      CCAAATTTATCAATGTTTAAAGCAGACTTTGTTGTGTTCTCATTCTACAAGTTATTTGGC
ABA3        CCTGATTTATCGGAGTATCCTGCAGATTTTGTTGTTCTGTCATTCTACAAGTTATTTGGT
            **  ** * *    **     ** ** ***** **  * ***** ** *** *******

Pa          TATCCCACTGGGCTTGGTGCTCTCATCGTTAGAACTGAAGCTGCAGAGTTACTAAAAAGG
FLACCA      TATCCAACTGGCCTTGGAGCACTCATTGTTCGAAAGGATGCTGCTAAGCTGATGAAGAAG
ABA3        TATCCTACTGGGCTTGGCGCTCTCCTTGTACGGAATGATGCAGCCAAATTGCTCAAAAAG
            ***** ***** ***** ** *** * **  * *  ** ** **  *  *  * ** * *

Pa          ACATACTTTGGTGGAGGAACTGTAGCTGCATCCATTGCCGATATTGACTTTGTACGGAGA
FLACCA      ACCTACTTTAGTGGAGGCACGGTGACTGCAGCTATTGCTGACGTTGACTTTTTCAAAAGA
ABA3        ACTTATTTTAGTGGAGGCACTGTTGCTGCTTCAATTGCTGACATCGACTTTGTAAAAAGA
            ** ** *** ******* ** **  ****  * ***** **  * ****** *    ***

Pa          AGAGGAGGTATCGAGGAATCATTTGAGGATGGAAGTCAATCATTTCTGAGCATAGCTGCT
FLACCA      AGAGAAGGTGTAGAGGAATTTTTTGAGGATGGAACCATTTCATTCTTGAGCATAACAGCA
ABA3        AGGGAAAGGGTGGAGGAGTTTTTTGAGGATGGTTCTGCTTCATTCCTGAGCATAGCAGCC
            ** * * *  * ***** *  ***********       *****  ******** * **

Pa          ATAAATCATGGATTCAAAATAGTCAATACATTAAAGATTGCTGCAATAGCCAGGCATACG
FLACCA      ATTCAACATGGGTTCAAAATAATTAATATGCTAACGACATCTTCGATTTTCCGGCATACA
ABA3        ATCCGTCATGGCTTCAAATTACTCAAGTCGCTTACACCTTCTGCAATTTGGATGCACACA
            **    ***** ****** ** * **     * *      ** * **      *** **

Pa          GCTTCTCTGGCAACTTATGTAAGAAGAGTGCTTCTAAGAATGAGGCATGGCAATGGAATG
FLACCA      ACATCAATTGCAGCATATGTGAGGAATAAGCTTTTGGCACTGAAGCATGAAAATGGAGAA
ABA3        ACGTCACTTTCCATATATGTGAAAAAGAAGCTTCAGGCTTTACGACATGGAAACGGGGCT
             * **  *  *    ***** *  *    ****       *    ****  ** **

Pa          GAGGTGTGCGTGGTTTATGGAAGACATACTGCTGAGGCATTATCTAGTGAGTTCGGTCCG
FLACCA      TTTGTTTGCACGCTGTACGG---------------GTTATTATCTAGTGAGATGGGCCCC
ABA3        GCTGTATGTGTTCTGTATGGCAGTGAAAATCTGGAGTTATCTTCACATAAATCAGGCCCA
               ** **     * ** **               *  **  **   * *    ** **

Pa          ACAGTTGCATTCAATTTGAAAAGATCAGATGGCTCCTGGTTTGGATATCGAGAGGTGGAA
FLACCA      ACAGTTTCATTCAACATGAAAAGACCAGATGGAACATGGTATGGATACCGTGAGGTGGAA
ABA3        ACGGTTACATTCAACTTGAAAAGACCTGATGGCTCTTGGTTTGGCTACTTGGAGGTGGAG
            ** *** *******  ******** * *****  * **** *** **    ********

Pa          AAATTGGCTTCTTTGTCTGGCATTCAGTTGAGGACAGGGTGCTTTTGCAATCCTGGTGCA
FLACCA      AAATTGGCAACCTTGGCAGGAATTCAACTGCGGACAGGATGTTTTTGCAATCCTGGTGCT
ABA3        AAGCTTGCTTCTTTATCTGGAATTCAGTTACGGACAGGATGTTTTTGCAATCCTGGCGCA
            **  * **  * **  * ** *****  *  ******* ** ************** **
```

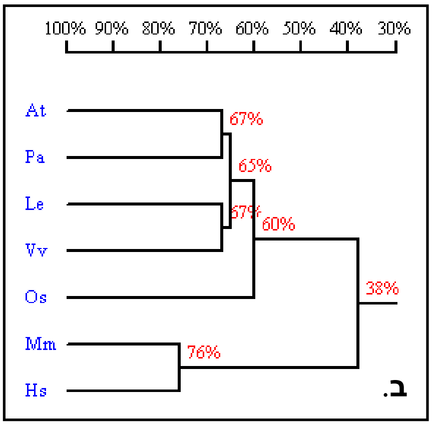
ב.



איור מס' 13- מקטע cDNA של הגן *PaMoCo sulfurase*.
(א) השוואת מקטע cDNA של הגן *PaMoCo sulfurase* עם מקטע הגן *FLACCA* מעגבנייה (AY074788) ו- *ABA3* מארבידופסיס (AY034895). השוואת הרצפים נעשתה בתוכנה ClustalW. * - נוקלאוטיד שמור בכל הפרטים הנבדקים. **(ב)** תוצר RT-PCR שהוגבר מ- cDNA על ידי שימוש בתחלים שתוכננו על פי רצף הגן FLACCA מעגבנייה.

א.





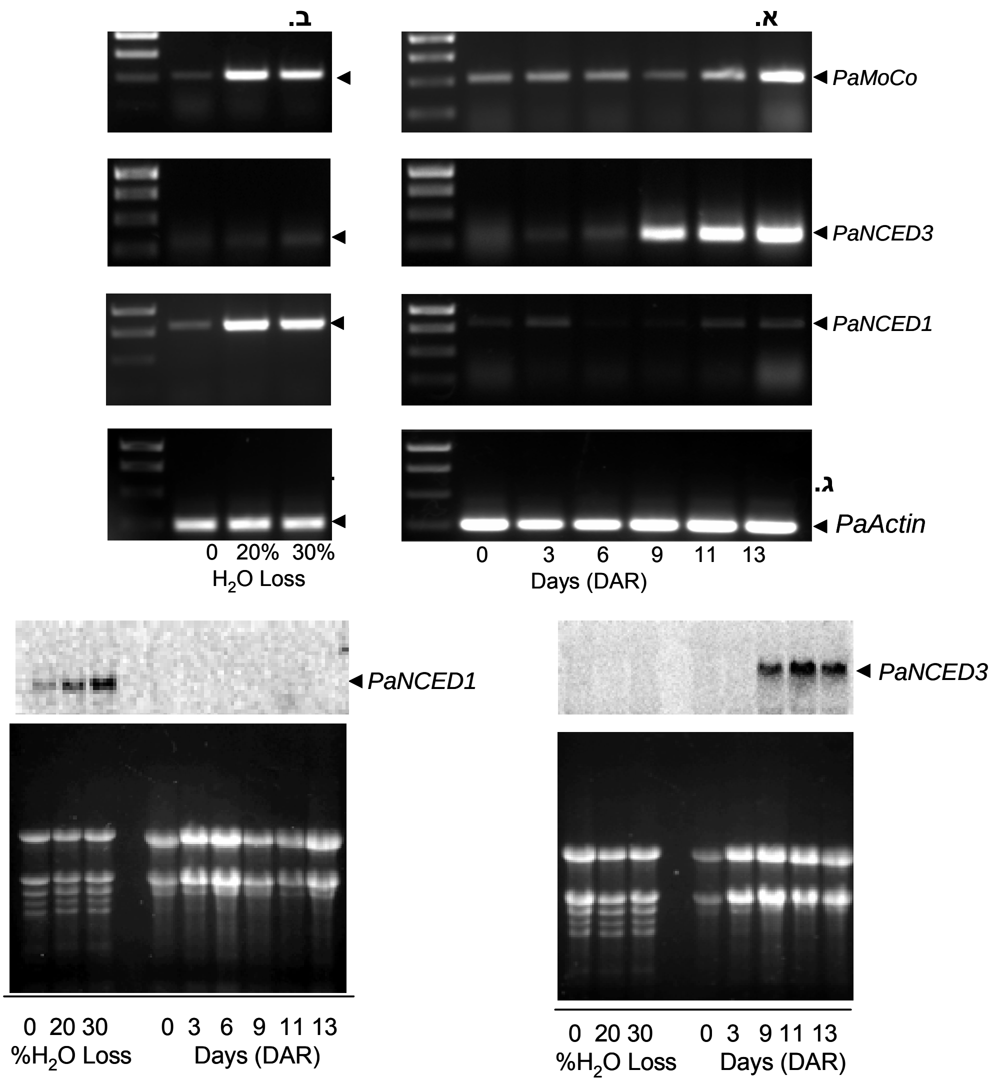
ב.

איור מס' 14- השוואת רצף החלבון המתורגם PaMoCo sulfurase ומספר רצפים הומולוגים מייצגים. (א) השוואת רצף החלבון המתורגם PaMoCo sulfurase עם רצף החלבון ABA3 מארבידופסיס (AAK58888 ,*Arabidopsis thaliana*), FLACCA מעגבנייה (AAL71858, *Lycopersicum esculentum*), ורצפי ESTs צמחיים מתורגמים מגפן (*Vitis vinifera*, CAO23775), אורז (*Oryza sativa*, ABH88164), עכבר (*Mus musculus*, NP_081055) ואדם (*Homo sapiens*, Q96EN8). אזורים מושחרים מורים על זהות של 75% ומעלה בכל הפרטים הנבדקים. אזורים אפורים: זהות של 50% עד 75%. אזורים בעלי פוטנציאל לפעילות של molybdopterin oxireductases (MoCo) מודגשים באדום, אזור לקשירת pyridoxal 5-phosphate (PLP) מודגש בירוק, החץ מסמן את מוטיב הציסטאין השמור **(ב)** עץ פילוגנטי על סמך אחוזי ההומולוגיה בין הרצפים השונים שהתקבלו ב- BLAST (נעשה בתוכנה DNAMAN).

3.2.2. אפיון ביטוי מקטע הגן המקודד לכאורה לאנזים PaMoCo sulfurase במהלך הבשלת הפרי ובעקת יובש בעלים

בכדי לקבל אינדיקציה ראשונית לגבי תפקודו של הגן *PaMoCo sulfurase* בבקרת סינתזת ABA, ולמרות שעדין לא הושלם ריצוף הגן השלם, בדקנו את דגם הביטוי של מקטע הגן שבודדנו בתנאים בהן ידוע כי רמת ABA עולה: בעלים לפני ואחרי עקת יובש ובציפת פרי במהלך הבשלת הפרי (Adato *et al*., 1976). הבדיקה בוצעה באמצעות אנליזת sq-RT-PCR וכביקורת פנימית נבדק גם כן דגם הביטוי של ה- mRNA עבור *PaNCED1* ו- *PaNCED3*. תוצאות אנליזה זו מוצגות באיור 15 א-ב. כפי שניתן לראות, בתנאים בהם עבדנו, הודגמה בעקבות עקת יובש עלייה בביטוי ה- mRNA המקודד לכאורה עבור MoCo sulfurase עלייה זו הודגמה במקביל לעלייה בביטוי *PaNCED1* (איור 15ב'). ממצאים אלו עולים בקנה אחד עם ממצאים מעבודות קודמות בהן דווח כי העלייה ברמת ABA בעלים בעקבות עקת יובש, מלווה בעלייה חדה בביטוי *PaNCED1* (Chernys and Zeevaart, 2000). בנוסף, במהלך הבשלת פרי, נצפה ביטוי קונסטיטוטיבי של מקטע ה- mRNA המקודד לכאורה ל- MoCo sulfurase ועלייה מתונה בביטויו לקראת סוף תהליך ההבשלה (איור 15א'), עלייה זו הודגמה לאחר העלייה החדה ברמת *PaNCED3* אשר החלה כתשעה ימים לאחר קטיף הפרי. תוצאות אלו מורות כי ככל הנראה ל- *MoCo sulfurase* תפקיד משני בבקרת סינתזת ABA.

כמו כן, באופן מפתיע ובניגוד לממצאי עבודות קודמות, באנליזת ה- sq-RT-PCR שערכנו, לא ניתן היה לראות עלייה בביטוי ה- mRNA עבור *PaNCED1* במהלך תקופת ההבשלה של הפרי, (איור מס' 15א'). כיוון שממצא זה סתר ממצאים אשר פורסמו בעבודה קודמת ערכנו אנליזת Northern אשר בה בדקנו במקביל את דגם הביטוי של *PaNCED1* ו- *PaNCED3* בעלים בתנאי יובש ובציפת פרי במהלך הבשלת פרי. דוגמאות ה- RNA של עלה ופרי הורצו על אותה ממברנה והוגבו עם פרובים ספציפיים כנגד *PaNCED1* ו- *PaNCED3*. התוצאות שקיבלנו מורות בברור כי בעקבות עקת יובש ולאחר איבוד 20% ממשקל העלים, חלה עלייה משמעותית בביטוי *PaNCED1* אך לא הודגמה עלייה בביטוי *PaNCED3* (איור מס' 15 ג ו- ד). מאידך, בציפת הפרי ובמהלך הבשלת הפרי ניתן לראות באופן ברור עלייה ברמת הביטוי של *PaNCED3* ולעומת זאת לא הודגמה עלייה בביטוי ה mRNA המקודד עבור *PaNCED1* (איור מס' 15 ג ו- ד). ממצא זה מורה כי ככל הנראה באבוקדו עלייה ביצירת ABA בפרי ובעלה מבוקרת באופן שונה ע"י גנים המקודדים לאיזופורמים שונים של NCED .



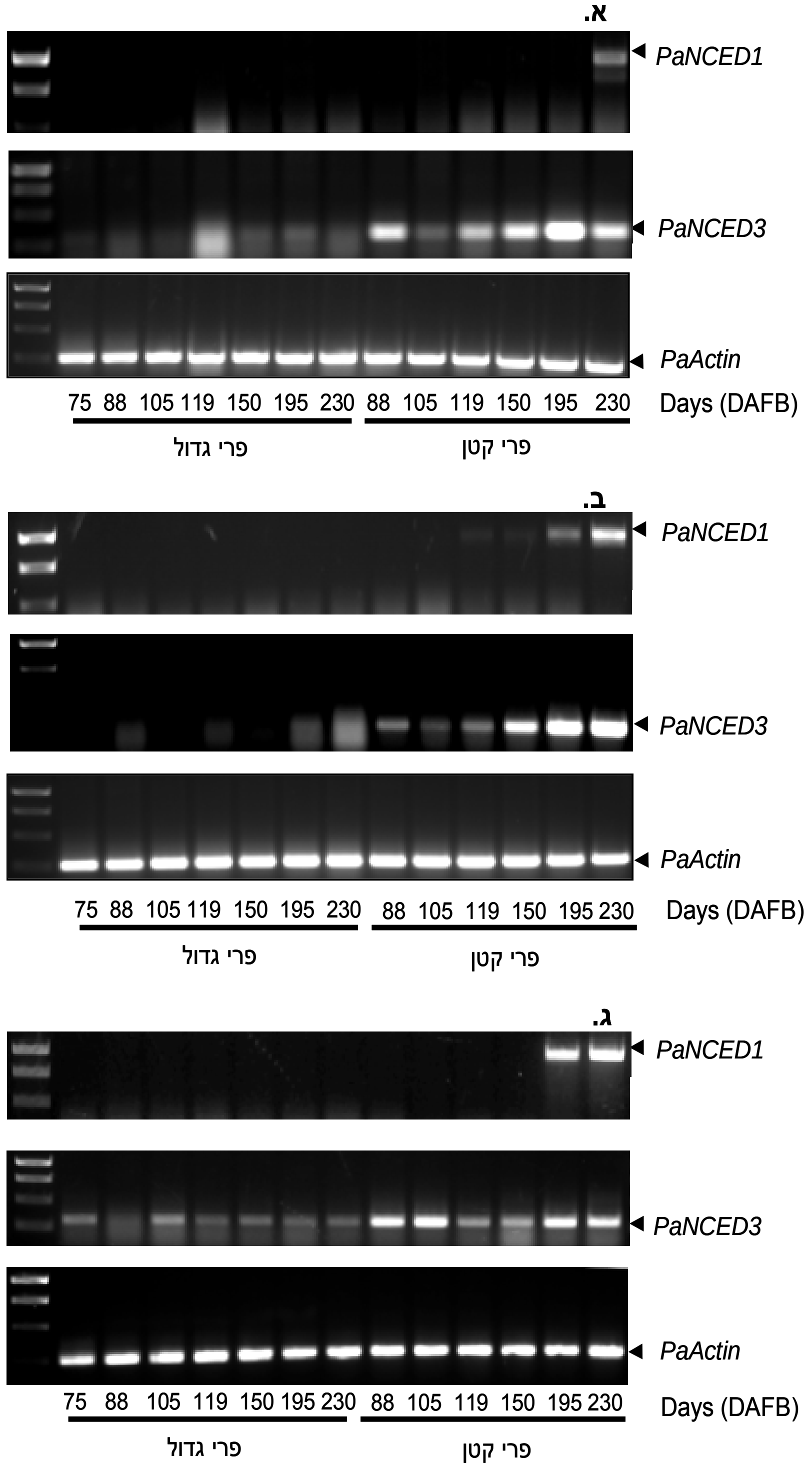
איור מס' 15 – אפיון ביטוי הגנים *PaNCED1*, *PaNCED3* ומקטע הגן המקודד לכאורה ל- PaMoCo sulfurase בציפת פרי לאחר קטיף ובעלים לאחר עקת יובש.

(א-ב) אנליזת sq-RT-PCR לאפיון ביטוי הגנים *PaNCED1*, *PaNCED3* ומקטע הגן המקודד לכאורה ל- PaMoCo sulferase ברקמת ציפת פרי של פרי לאחר קטיף (פנל ימני) ובעלים לפני ולאחר עקת יובש (פנל שמאלי).

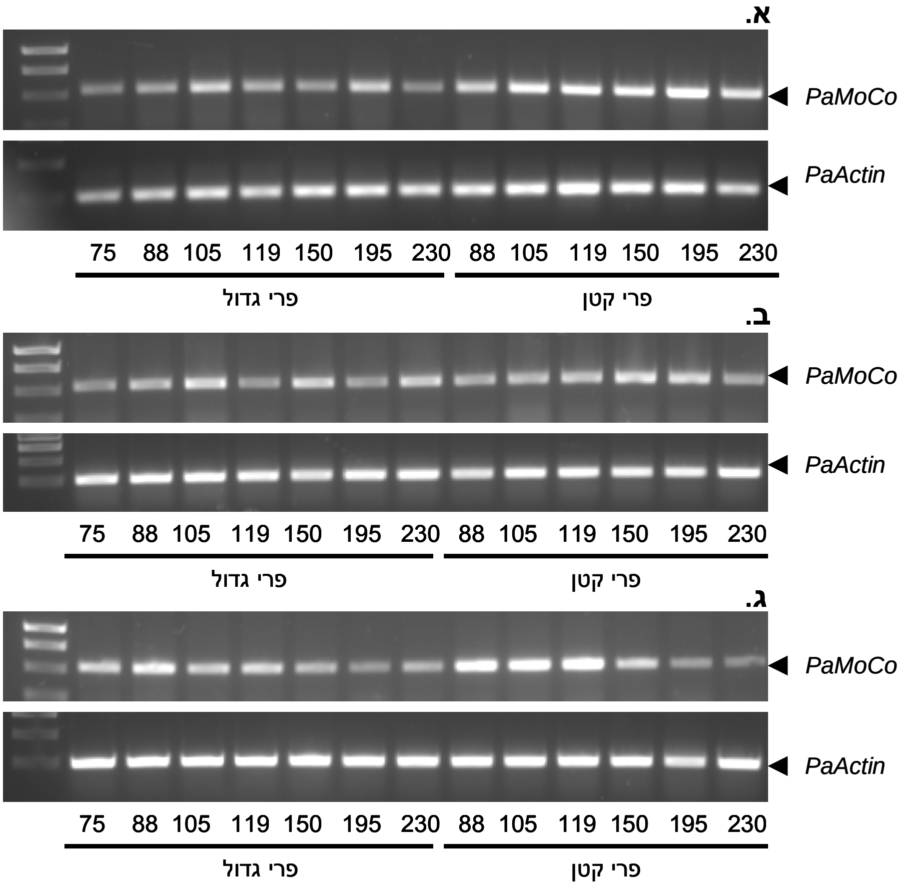
(ג-ד) אנליזת Northern blot לאפיון דגם הביטוי של הגן *PaNCED3* והגן *PaNCED1* בעלים, לפני ולאחר עקת יובש וברקמת ציפת פרי לאחר קטיף.

3.2.3. בחינת דגם הביטוי של *PaNCED1-3* ושל מקטע הגן המקודד לכאורה ל- PaMoCo sulfurase באבוקדו במהלך התפתחות הפרי

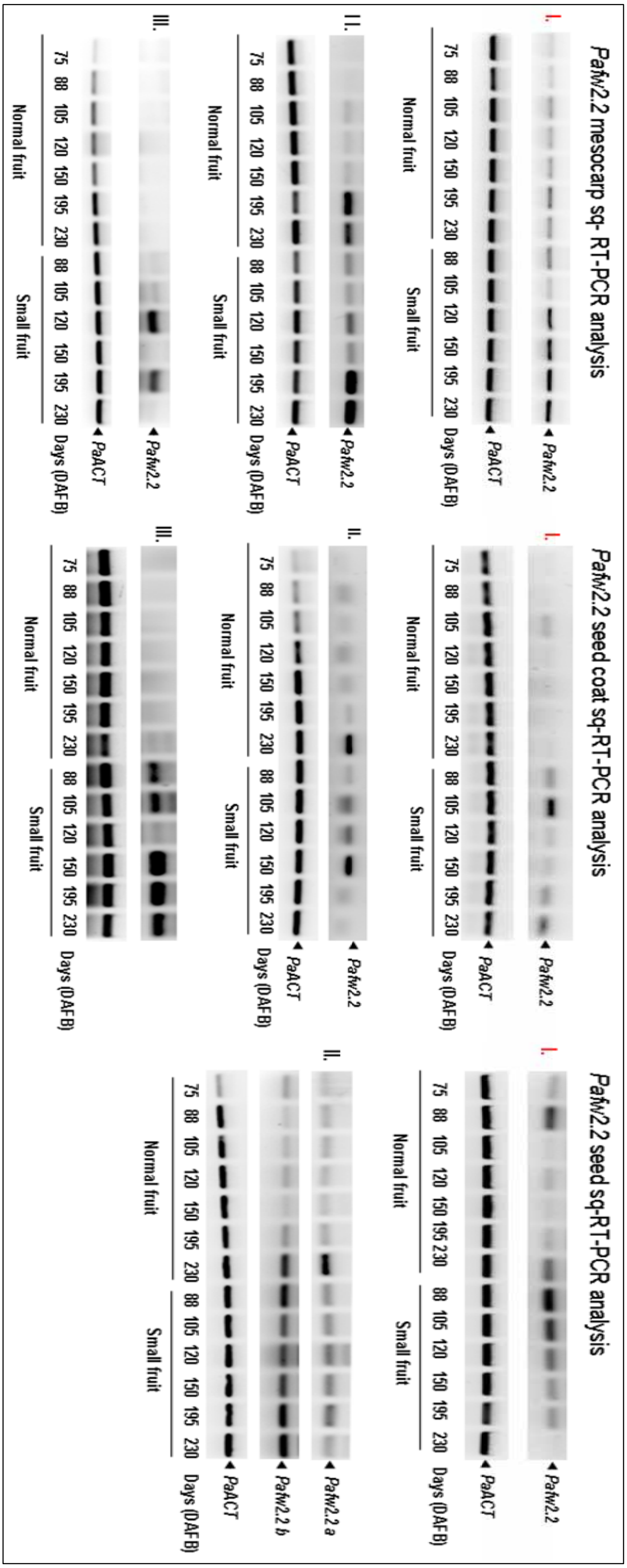
לאחר שלב האיפיון שנערך בסעיף 3.2.1 בדקנו בהמשך את דגם הביטוי של הגנים המקודדים ל- *NCED1*, ל- *NCED3* ולגן המקודד לכאורה ל- PaMoCo sulfurase בפירות גדולים וקטנים במהלך התפתחות הפרי (איור מס' 16 ו- 17). כפי שניתן לראות באיור מס' 16 תוצאות אנליזה sq-RT-PCR הראו, כי בציפה ובקליפת הזרע של פירות קטנים חלה עלייה ברמת ה- mRNA עבור *PaNCED3*. עלייה זו החלה עם מופע פנוטיפ הפרי הקטן (88 ימים לאחר פריחה מלאה), ושיאה נצפה בשלבים מאוחרים של התפתחות הפרי. ברקמת הזרע לעומת זאת נצפתה עלייה ברמת ה- mRNA של *PaNCED3* עם מופע פנוטיפ הפרי הקטן (88 יום לאחר פריחה מלאה). בנוסף, התוצאות שהתקבלו הראו כי בפירות קטנים עלה ביטוי הגן *PaNCED1* ברמה מסויימת בשלושת הרקמות שנבדקו לקראת סוף תקופת התפתחות הפרי (195-230 ימים לאחר פריחה מלאה) (איור מס' 16). בדיקת דגם הביטוי של הגן המקודד לכאורה ל- PaMoCo sulfurase הראתה ביטוי כמעט קונסטיטוטיבי של תעתיק הגן במהלך התפתחות הפרי ברקמות הנבדקות של פירות גדולים וקטנים, אם כי עלייה מתונה בביטוי תעתיקי הגן נצפתה בשלב II של התפתחות הפרי בזרעים של פירות קטנים (88-119 יום לאחר פריחה מלאה) (איור מס' 17).



איור מס' 16 - sq- RT- PCR לאפיון ביטוי הגנים *PaNCED1*-ו *PaNCED3* במהלך התפתחות הפרי cDNA מרקמת הציפה (**א**), קליפת זרע (**ב**) והזרע (**ג**) שימש להגברת מקטע הגן *PaNCED1* ו- *PaNCED3* ע"י 42 מחזורי PCR ולהגברת מקטע הגן *PaActin*, על ידי 27 מחזורי PCR.



איור מס' 17 – sq-RT- PCR לאפיון ביטוי הגן המקודד לכאורה ל- PaMoCo sulfurase. cDNA מרקמת הציפה (**א**), קליפת זרע (**ב**) והזרע (**ג**) שימש להגברת מקטע הגן *PaMoCo sulfurase* ע"י 27 מחזורי PCR ולהגברת מקטע הגן *PaActin*, על ידי 27 מחזורי PCR .



נספח 1- מוצגות מספר חזרות אשר בוצעו בכל רקמה (ציפה, קליפת זרע וזרע) בשיטת sq-RT-PCR לאפיון ביטוי הגן *Pafw2.2* במהלך התפתחות הפרי בפירות גדולים וקטנים. החזרה הראשונה בכל רקמה הינה התמונה המוצגת באיור 14.

בכל האנליזות, למעט זו המוצגת כ *Pafw2.2a*, cDNA מרקמות הפרי השונות שימש להגברת מקטע הגן *Pafw2.2* ע"י 42 מחזורי PCR ולהגברת מקטע הגן *PaActin*, על ידי 27 מחזורי PCR. באנליזה המצויינת מקטע הגן *Pafw2.2* הוגבר ע"י 38 מחזורי PCR.

4. דיון

4.1. פנוטיפ פרי קטן באבוקדו 'האס' – מהו הגורם המגביל?

מופע פרי קטן בזן 'האס' הינה תופעה כללית הבאה לידי ביטוי בכל אזורי הגידול של הזן. בעייה חקלאית זו מחריפה ביתר שאת בשנות שפע בהשוואה לשנות שפל, כאשר אחוז גבוה יותר של פירות קטנים פר עץ מתקבל בשנת שפע. לדוגמא, בקליפורניה דווח על קבלת 44% פירות קטנים (מכלל הפירות) בשנת השפע לעומת 3-10% פירות קטנים בשנת השפל (פרופ' קרול לווט- דיווח אישי). פנוטיפ 'פרי קטן' עשוי להתקבל כתוצאה ממספר גורמים הכוללים: עיכוב בתהליך גדילת התאים, עיכוב בתהליך חלוקת התאים או שילוב שני גורמים אלו. בדיקת גודל התאים ומספר התאים בפירות גדולים וקטנים ברקמת הציפה, שנערכה בעבודה זו, מורה כי מופע פרי קטן באבוקדו 'האס' הינו תולדה של עיכוב בתהליך חלוקת התאים ולא בגדילתם, לפיכך, תוצאותינו מאששות ממצאים מעבודות קודמות שפורסמו בנושא (Cowan *et al.*, 1997). יש להדגיש כי בעבודה זו נספרו תאי הציפה בחתך רוחב בלבד. בכדי להשלים את התמונה יש לבצע בנוסף גם ספירת תאים בחתכי רוחב של רקמת הזרע וקליפת הזרע. בהמשך נשאלת השאלה מהם הגורמים המבקרים באופן שלילי את תהליך חלוקת התאים בפרי קטן. האם קיים פקטור המבקר באופן כללי את מהלך חלוקת התאים בפרי? ומהו הקשר, אם קיים, בין שינוי ברמת ABA ועיכוב בתהליך חלוקת התאים בפרי? בכדי לנסות ולענות על שאלות אלו בחרנו להתמקד בעבודה זו בזיהוי ואפיון גן הומולוגי לגן *Lefw2.2* באבוקדו 'האס' ובבחינת דגם ביטויו בפירות גדולים וקטנים. במקביל, בכדי לאפיין את אופן בקרת סינתזת ABA בפרי קטנים, התרכזנו, בבחינת דגם הביטוי של גנים המקודדים לאנזימים הפועלים בשלבים שונים של מסלול סינתזת ABA במהלך התפתחות הפרי.

4.2. אפיון מקטע גן הומולוגי ל- *Lefw2.2* באבוקדו 'האס' - ביטוי הגן במהלך התפתחות הפרי ומעורבותו האפשרית בעיכוב תהליך חלוקת תאים בפרי

בעבודות שנערכו בעגבנייה, זוהה הגן (*ORFX*) *Lefw2.2* כגן האחראי לכ- 30% מהשונות בין העגבנייה המתורבתת לבין עגבניית זן- הבר, קטנת המימדים (Frary *al el.*, 2000). מחקרים שנערכו בקווי עגבנייה כמעט איזוגניים הנושאים אלל 'פרי גדול" ואלל 'פרי קטן' הראו כי השינויים בגודל הפרי קשורים לשינוי בדגם הביטוי של *Lefw2.2* ואינם קשורים בשינוי במבנה החלבון. ביטוי ביתר של *Lefw2.2* בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרי (לפני ומיד לאחר חנטה) נמצא

בקורלציה הפוכה עם פעילות מיטוטית בפרי, ממצא זה הוביל למסקנה כי הגן *Lefw2.2* מקודד לחלבון הפועל כבקר שלילי של חלוקת התא בשלבים מוקדמים של התפתחות הפרי (Nesbitt and Tanksley, 2001; Cong *et al*., 2002; Liu and Tanksley, 2003). הגן *Lefw2.2* חולק הומולוגיה עם מספר ESTs צמחיים, המקודדים לכאורה לחלבונים בעלי פעילות ביולוגית לא מוגדרת. עד כה, לא נמצא קשר קורלטיבי כלשהו בין אופן הביטוי של ESTs אלו ושינויים בגודל פרי במינים שונים. אפיון מבנה החלבון LeFW2.2 חשף כי חלבון זה כולל שני אזורים הידרופוביים המעגנים אותו לכאורה לממברנת התא, ממצא אשר אומת באמצעות בדיקת מיקום החלבון בתא על ידי יצירת חלבון כימרי LeFW2.2 מאוחה לחלבון GFP (Cong and Tanksley, 2006).

בעבודה זו אותר מקטע גן מאבוקדו (*Pafw2.2*) החולק הומולוגיה גבוהה (65.44%) לגן *Lefw2.2*. בידודו של מקטע הגן נעשה בשיטת RT-PCR על ידי שימוש בתחלים סמי-דגנרטיבים ולאחר מכן שובט קצהו של הגן בשיטת 3'RACE. רצף הגן החלקי המתורגם מקודד ל- 136 חומצות אמיניות וחולק הומולוגיה של 63.70% ברמת החלבון עם LeFW2.2. אפיון מקטע הגן הראה, כי בדומה ל- *Lefw2.2*, *Pafw2.2* מקודד לכאורה לחלבון המכיל שני אזורים הידרופוביים חוצי ממברנה (איור מס' 11). בהמשך לזיהוי מקטע הגן *Pafw2.2*, נבדק דפוס ביטוי הגן במהלך התפתחות הפרי בפירות קטנים וגדולים באמצעות שיטת sq-RT-PCR. היתרון בשימוש בשיטה זו הוא שהיא מאפשרת בדיקת רמת ביטוי גן מסוים תוך כדי שימוש בכמויות נמוכות של RNA. בנוסף ע"י שימוש בשיטה זו ניתן לקבל אינדיקציה לגבי רמת ביטויו של גן המתבטא ברמה נמוכה יחסית ולא ניתן לזיהוי ע"י היברדיצית Northern. מאידך, לשיטה זו קיימים מספר חסרונות הכוללים אי דיוקים שעשויים לנבוע כתוצאה מהנפחים הזעירים הנלקחים לריאקציה, הגברה לא שווה של מולקולות ה DNA וכן הגברת מקטעים אשר מקורם בזיהומים שונים. לפיכך, יש צורך לבצע חזרות וביקורות מתאימות ולהתייחס לתוצאות המתקבלות בזהירות הנדרשת. למרות חסרונות השיטה, ההחלטה לעבוד על פיה התקבלה במקרה זה, בשל העובדה שהיה צורך במספר מחזורים גבוה של ריאקצית ה- PCR (42 מחזורים) על מנת לקבל תוצר עבור מקטע הגן *Pafw2.2*. כאן המקום לציין כי גם בעבודות שנערכו בעגבנייה נטען כי תעתוק מסגרת הקריאה של הגן (ORFX) *Lefw2.2* נמוך מכדי לקבל אינדיקציה של הגן בשיטת ההיברדיזציה Northern, ולכן נעשה שימוש בשיטת sq-RT-PCR ובשיטת real-time PCR בכדי לבדוק את רמת ביטוי *Lefw2.2* בפרי (Fray *et al*., 2000; Cong and Tanksley, 2006; Baldet *et al.,* 2006).

בעבודה זאת, ערכנו שלוש חזרות בלתי תלויות בכדי לבדוק את פרופיל התבטאות הגן *Pafw2.2* בפירות גדולים וקטנים במהלך התפתחות הפרי (ראה תוצאות, נספח 1). נמצא שקיימת שונות

באנליזות השונות. שונות זאת יכולה לנבוע מטעויות פיפטציה, הבדלים בריאגנטים ו/או הבדלים ביעילות ה- PCR וכמו כן משונות פיזיולוגית הנובעת מהעובדה שהמערכת בה עבדנו עשוייה להיות מושפעת מתנאים סביבתיים (נדגמו פירות מ 12 עצים שונים במטע). למרות כל זאת חשוב להדגיש כי מכלול התוצאות מורה כי במהלך רצף תקופת התפתחות הפרי רמת הביטוי הכוללת של *Pafw2.2* הייתה גבוהה בפירות קטנים לעומת פירות גדולים. תוצאות אלו עולות בקנה אחד עם ממצאים מעבודות שנערכו בעגבנייה, בהן דווח כי ביטוי *Lefw2.2* נמצא בקורלציה הפוכה עם הפעילות המיטוטית בפרי וכי בהילקח בחשבון סך תקופת התפתחות הפרי, ביטוי הגן *Lefw2.2* היה גבוה יותר בפירות מקוים "כמעט איזוגנים" בעלי אלל פרי קטן, לעומת פירות מקוים "כמעט איזוגנים" בעלי אלל פרי גדול (Cong et al., 2002). לפיכך, ממצאים אלו עשויים לתמוך ברעיון כי באבוקדו, Pafw2.2 פועל באופן דומה ל Lefw2.2 .

ההתייחסות לביטוי הגן בדיון זה הינה על סמך התמונה המוצגת באיור מס' 12. על פי איור זה ניתן לראות כי ברקמת הזרע של פירות קטנים התקבל ביטוי גבוה של *Pafw2.2* בפרק הזמן שבין DAFB 88-105 וירידה הדרגתית בהצטברות התעתיק במהלך התפתחות הפרי (12ג'). מאידך, בפירות הגדולים התקבל ביטוי גבוה יחסית של תעתיק הגן אך ורק כ- 88 יום לאחר פריחה מלאה. בהנחה שבזרע האבוקדו חלוקת תאים אקטיבית נמשכת לפחות עד כ- 120 יום לאחר פריחה מלאה, תומך דגם ביטוי זה בטענה כי PaFW2.2 עשויי לפעול באופן המקביל לפעילותו של LeFW2.2 בעגבנייה, קרי, כבקר שלילי של חלוקת תאים.

במקביל, כמו כן, על פי דגם ביטוי הגן המוצג באיור 12א, בציפת הפרי נצפתה רמה יחסית גבוהה של ביטוי הגן *Pafw2.2* בפירות הקטנים לעומת הפירות הגדולים, החל מ-120 יום לאחר פריחה מלאה. על פי הספרות ותוצאות ספירת התאים שנערכה בעבודה זאת (איור מס' 5) חלוקת תאים פעילה מתרחשת עד כ120 יום לאחר פריחה מלאה (Schroeder 1953; Cowan *et al.*, 1997). לפיכך, ביטוי גבוה יחסית של *Pafw2.2* בציפת פירות קטנים, בשלב בו עדין חלה חלוקת תאים פעילה (120 DAFB) תומך לכאורה ברעיון כי PaFW2.2 פועל בדומה ל LeFW2.2. אולם, בניגוד לכך יש לציין כי בתנאים בהם עבדנו, התקבל גם כן,באופן מפתיע, ביטוי גבוה של הגן בציפת הפירות הקטנים בשלבים מאוחרים יחסית של התפתחות הפרי, בשלבים אלו קצב חלוקת התאים מואט (Schroeder, 1953), או נפסק כמעט לחלוטין (בהסתמך על ספירת התאים בציפה – איור מס' 5). השאלה המתבקשת היא מדוע בשלבים מאוחרים של התפתחות הפרי, כאשר חלוקת התאים נמוכה, נצפות רמות ביטוי גבוהות עבור *Pafw2.2* בציפת פירות קטנים. תוצאה זו עשויה אולי להצביע על תפקיד נוסף של הגן *Pafw2.2* ונותרת בשלב זה כשאלה פתוחה. מאחר ותוצאותיה של עבודה זו אינן חד משמעיות יש צורך לחזור על האנליזות שבוצעו ולנסות לכייל את המערכת לקבלת תוצאות תדירות. כמו כן

ניתן להשתמש בשיטות מקבילות כגון Real-Time RT-PCR ובשיטת היברידיזציה In-Situ אשר בעזרתה ניתן יהיה לקבל אינדיקציה נוספת לכמות ביטוי הגן ברקמה בפירות הקטנים לעומת הגדולים. כמו כן יש להראות כי רמת ביטוי גבוהה של *Pafw2.2* נמצאת בקורלציה הפוכה עם הפעילות המיטוטית בפרי. דרך אפשרית לבדיקת קשר זה הינה ע"י בדיקת הפרופיל ההתפתחותי של גנים המבקרים את מהלך חלוקת התאים בפרי כגון ציקלינים, CDKs ו - PCNA *(*Proliferating Cell Nuclear Antigen), והשוואתם לפרופיל הביטוי של *Pafw2.2.*
בנוסף, בעקבות עבודה זו ניתן לתהות מהו הגורם המבקר את העלייה בביטוי *Pafw2.2* בפרי. השאלה הנשאלת היא האם קיים קשר בין בקרת שעתוק *Pafw2.2* ובין השינוי במאזן הפחמימות ו/או מאזן ההורמונים ברקמה. אחת ההיפותזות בנוגע לאופן פעילותו של LeFW2.2 בבקרת גודל הפרי בעגבנייה טוענת כי ייתכן שתפקיד LeFW2.2 הינו להתאים את פעילות מחזור התא בפרח/פרי לתנאי הצמח הקיימים וכי ואספקת הפחמימות לפרי המתפתח עשויה, בתיווכו של LeFW2.2, לבקר את פעילות מחזור התא (Chevalier, 2007; Baldet *et al*., 2006). טענה זו, נתמכת בתוצאות מחקר השוואתי שנערך בצמחי עגבנייה מתורבתת שגודלו תחת משטרים שונים של עומס פרי. באופן מעניין, תוצאות מחקר זה הראו כי הפחתת עומס הפרי גרמה לעלייה בגודל הפרי ולוותה בעלייה במספר התאים. במקביל, דילול הפירות גרר עלייה ברמת הביטוי של גנים המבקרים את מחזור התא *CYCD3;1*, *CYCB2;1* ו- *CDKB2;1* ולווה בירידה ברמת הביטוי של ה- mRNA *Lefw2.2* (Baldet *et al*., 2006). כמצוין במבוא, מחקרים שנערכו בזן 'האס', הראו, כי בזרעי פירות קטנים חלה ירידה ברמת הסוכרוז ועלייה באחוז הגלוקוז מתוך כלל הסוכרים, כמו כן, נטען כי פירות קטנים מתאפיינים בחוסר יכולת ליצור/לצבור IAA וביצירה/צבירה גבוהה של ABA (Cowan *et al*., 2005; Richings *et al*., 2000). בנוסף, ידוע כי בעיית גודל פרי בזן 'האס' מחריפה בשנת שפע, בה התחרות על המוטמעים בין הפירות המתפתחים גדלה (Whiley and Schaffer, 1994). בהתחשב בנתונים אלו ובתוצאות שבידינו, ניתן לתהות האם ביטוי *Pafw2.2* מבוקר, או לחילופין מושפע, משינויים במאזן הסוכרים ו/או ההורמונים החלים בפרי במהלך התפתחותו. אחת הדרכים המוצעת להמשך המחקר הינה אנליזה של אזור הפרומוטור של *Pafw2.2*, אנליזה זו עשויה לחשוף אלמנטים כגון ABA response elements (ABREs) (Gómez-Porras *et al*., 2007) ו/או- glucose responsive elements (Ji *et al*., 2008) אשר עשויים לרמוז על אופן בקרת ביטוי הגן. כמובן ששלב הכרחי מקדים במחקר עתידי מצריך את השלמת ריצופו של *Pafw2.2.* הבנת מסלול האותות הקושר את FW2.2 לבקרה על מחזור חלוקת התאים מהווה עדיין שאלה ביולוגית פתוחה הנמצאת בתחילת הדרך. במידה ויימצאו חיזוקים לטענה כי PaFW2.2 פועל

באופן דומה ל- LeFW2.2 , ייתכן כי בעתיד ניתן יהיה להשתמש באבוקדו כמערכת נוספת, מלבד עגבנייה, על מנת לחקור נושא זה.

כמו כן יש לציין כי גורם אפשרי נוסף אשר יכול להשפיע על גודל הפרי הינו הגורם גנטי. נקודה זו הועלתה כבר במחקרים קודמים (Degani and Goldring, 1989) בהם נבדקה נשירה וההתפתחות פרי באבוקדו 'האס' כתלות בזהות ההורה הזכרי ('אטינגר' ו/או 'פוארטה' במקרה של האבקה זרה, לעומת 'האס' במקרה של האבקה עצמית). כפי שהוזכר במבוא, באבוקדו קיים מנגנון דיכוגמי אשר נועד להבטיח את קיומה של האבקה זרה (פרח האבוקדו הינו פרוטוגיני), אולם נמצא כי עשויה להתרחש האבקה עצמית בתוך הזן (Gazit and Degani, 2002). במחקר המוזכר לעיל נמצא כי כחודש לאחר חנטה, אחוז גבוה מבין החנטים הנבדקים היו תוצרי האבקה עצמית, ואילו לאחר פרק זמן בו חלה נשירת חנטים מסיבית, הפירות הנותרים על העץ היו ברובם תוצרי האבקה זרה (בעיקר תוצרי 'אטינגר' היברידים). מכאן, ניתן לשער כי זהות תורם הגמטות הזכריות עשויה להשפיע על התפתחות וגודל הפרי הסופי וייתכן אף באופן ישיר או עקיף על ביטוי גנים המבקרים את תהליך חלוקת התאים (בינהם *Pafw2.2*). בעתיד ניתן יהיה לבדוק האם קיים שוני בזהות ההורה הזכרי בין פירות 'האס' גדולים וקטנים, זאת באמצעות שימוש בסמנים מולקולרים של אבוקדו (Small Sequence Repeats – SSR) אשר מופו בעבודות קודמות (Sharon *et al*., 1997), ולשפוך אור על נקודה זו.

4.3. בקרת מסלול ביוסינתזת ABA במהלך התפתחות פרי.

4.3.1. אפיון מקטע גן הומולוגי ל- ABA3 ו- FLACCA באבוקדו 'האס' – תפקידו האפשרי בבקרת סינתזת ABA

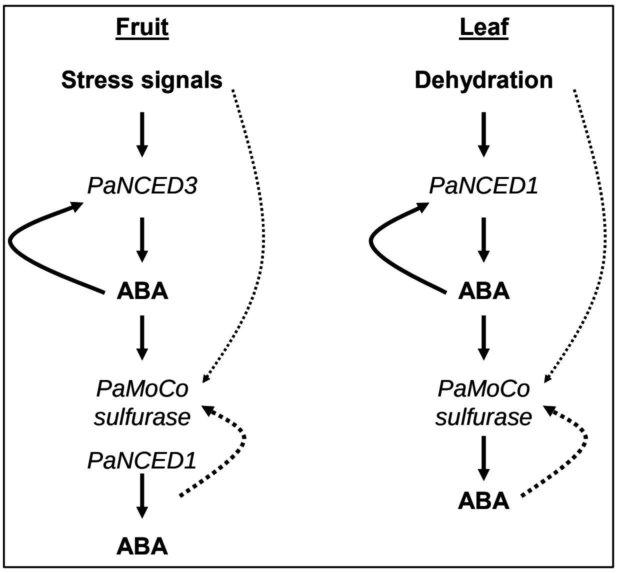
עלייה ברמת ABA, המתרחשת תחת תנאי עקה מאפשרת לצמח התמודדות עם שינויים סביבתיים קיצונים ע"י הפעלת מנגנונים תאיים שונים. עלייה זו מבוקרת ברמת השעתוק ותלויה בעלייה ברמת הביטוי של גנים המקודדים לאנזימים הפעילים בשלבים שונים של מסלול סינתזת ABA (Seo and Koshiba, 2002). מספר היבטים הקשורים בבקרת סינתזת ABA נחקרו בשנים האחרונות במערכות מודל צמחיות שונות. בעבודות אלו זוהו מספר משפחות גנים המקודדות לאנזימים המעורבים במסלול סינתזת ABA ואופיין שעתוקם ברקמות שונות ובתנאי עקה שונים (Chernys and Zeevaart, 2000; Rodrigo *et al*., 2006, Yang and Geo, 2007; Qin and Zeevaart, 1999; Iuchi *et al*., 2000; Tan *et al*., 2003; Zdunek-Zastocka *et al*., 2004). המידע הקיים לגבי סינתזת ABA בפרי האבוקדו ואופן בקרתה מצומצם. עד כה, זוהתה באבוקדו משפחת הגנים *PaNCED1-3* המקודדים לחלבונים המבקרים

שלבים מוקדמים בסינתזת ABA ‏(Chernys and Zeevaart, 2000) ונמצא כי באבוקדו, כמו במינים אחרים, בקרת ביוסינתזת ABA תלויה בעיקר בשעתוקם של גנים אלו.

MoCo sulfurase הינו אנזים המשחק תפקיד מפתח בסינתזת ABA. אנזים זה פועל כזרז המאפשר הוספת שייר גופרית לחלבונים המכילים קו-פאקטור MoCo. מודיפקציה זו, מאפשרת בין היתר, את הפעלת האנזים ABA-AO המקטלז את השלב האחרון של סינתזת ABA ‏(Seo *et al.*, 2004). עבודות קודמות הראו כי הגן *ABA3*, המקודד לאנזים MoCo sulfurase בארבידופסיס, מתבטא באופן קונסטיטוטיבי, ברמה נמוכה, בחלקי הצמח השונים- שורשים, גבעול, עלים, פרחים ובפרי, אולם רמתו עולה באופן חד ברקמות השונות כתוצאה מעקת יובש, ועקת מלח, ממצא המרמז על תפקידו הבקרתי של גן זה במסלול סינתזת ABA ‏(Xiong *et al.*, 2001; Bittner *et al.*, 2001). בהתבסס על המידע הקיים בספרות, ניתן היה להניח כי גן הומולגי לגן המקודד ל- MoCo sulfurase, קיים באבוקדו ועשוי לשחק תפקיד בבקרת סינתזת ABA.

בעבודה הנוכחית בודד מקטע גן מאבוקדו המקודד לכאורה ל- MoCo sulfurase. מקטע הגן המתורגם מקודד ל- 263 חומצות אמיניות ומראה הומולוגיה גבוהה לחלקו ה- N-טרמינלי של הגנים *FLACCA* ו- *ABA3* ‏(68.61% ו-67.93%, בהתאמה), מקטע זה כונה על ידינו *PaMoCo sulfurase*. בכדי לקבל אינדיקציה ראשונית לגבי תפקידו האפשרי של *PaMoCo sulfurase* בבקרת מסלול סינתזת ABA בחרנו לבדוק את דגם ביטוי הגן בתנאים בהם רמת ABA עולה. תוצאותינו הראו כי ביטוי מקטע הגן המקודד לכאורה ל- MoCo sulfurase עלה בעלים בתנאי עקת יובש, במקביל לעלייה בביטוי הגן *PaNCED1*. כמו כן מצאנו כי רמת ביטויו של *PaMoCo sulfurase* עלתה באופן מתון בציפת פרי במהלך הבשלתו, עלייה זו נצפתה לאחר העלייה החדה בביטוי *PaNCED3*. יש לציין כי האנליזות שביצענו לא לוו בבדיקות מקבילות של רמות ה- ABA, ויש לבצע בדיקות אלו בהמשך, אולם, מכלול תוצאותינו מורה כי ככל הנראה לגן המקודד לכאורה ל- *PaMoCo sulfurase* תפקיד בקרתי משני בבקרת יצור ABA. יתרה מזאת, באופן מפתיע, הממצאים שהתקבלו בעבודה זו מורים כי ככל הנראה בקרת סינטזת ABA בפרי ובעלה מבוקרות באופן שונה ע"י איזופרמים שונים המקודדים ל- NCED. כפי שהודגם בעבודות קודמות, באנליזות שביצענו הודגמה עלייה חדה בביטוי *PaNCED1* בעלים לאחר עקת יובש, אולם בניגוד לממצאים קודמים, הן אנליזת sq-RT-PCR והן אנליזת northern מורות כי במהלך הבשלת פרי חלה עלייה חדה בביטוי *PaNCED3*, בעוד השינויים הנצפים ברמת ביטוי *PaNCED1* הינם מינימלים. מכאן ניתן להסיק כי ככל הנראה עלייה ברמת ABA בעלה מבוקרת ברמת השעתוק ותלוייה בביטוי *PaNCED1*, ואילו עלייה ברמת ABA בפרי תלוייה בעיקר בביטוי *PaNCED3*. תפקידו הבקרתי של *PaMoCo*

sulfurase בסינתזת ABA הינו כאמור משני. ממצא זה למעשה אינו מפתיע שכן בעוד פעילות האיזופרמים NCED1-3 הינה פעילות ספציפית למסלול הסינטזה של ABA, פעילות האנזים MoCo sulfurase לא משפיעה אך ורק על סינטזת ABA (ע"י שפעול ABA-AO) אלא גם על סינטזת של תרכובות ארומטיות כגון פורינים (Purines), זאת ע"י שפעול האנזים XDH (Xanthine dehydrogenase) (Mendel and Hänsch, 2002, Mendel and Schwarz, 1999; Bittner *et al*., 2001) תוצאותינו מלמדות כי באבוקד בדומה למינים אחרים (Barrero *et al*., 2006), קיימת היררכיה ברמת בקרת השעתוק המבקרת עלייה ברמת ABA - ראה מודל היפותטי איור 18. בעתיד בכדי להמשיך ולאפיין את פעילות *PaMoCo sulfurase* יהיה צורך לסיים את ריצופו ולבדוק האם עלייה ברמתו מתרחשת במקביל לעלייה בפעילות ABA-AO, זאת לדוגמא ע"י שימוש בג'לים הבודקים פעילות ABA-AO (Zdunek-Zastocka *et al*., 2004).



איור 18- מודל היפותטי המציג את אופן בקרת סינטזת ABA באבוקדו. החצים הרציפים מייצגים בקרה חיובית על ביטוי גנים (פרט לחצים המצביעים על ABA, המייצגים השריית יצירת ABA). החיצים המקווקווים מייצגים רמת בקרה משנית על ביטוי גנים.

<u>בפרי</u> : סיגנל של עקה (כגון ירידה בריכוז המוטמעים) מוביל ליצירה מוגברת של גנים המשתתפים בביוסינתזה של ABA; ביניהם *PaNCED3* (ו- *PaMoCo sulfurase*). עלייה בביטוי גנים אלו גורמת לעלייה ברמת ה- ABA ברקמה ולמשוב חיובי המשפיע על ביטוי גנים אלו.

<u>בעלה</u> : בעקבות עקת יובש חלה עלייה בביטוי גנים המשתתפים בביוסינתזה של ABA; ביניהם *PaNCED1* ו- *PaMoCo sulfurase*. עלייה בביטוי גנים אלו גורמת לעלייה ברמת ה- ABA ברקמה ולמשוב חיובי המשפיע על ביטוי גנים אלו.

4.3.2. בקרת מסלול ביוסינתזת ABA במהלך התפתחות הפרי

כאמור, בעבודות קודמות דווח כי במהלך התפתחות הפרי, חלה עלייה חדה ברמת ABA ברקמת הציפה והזרע של פירות קטנים (Cowan *et al.*, 1997; Taylor and Cowen, 2001; Cowan *et al.*, 1999). מעקב אחר דגם הביטוי של הגנים המקודדים ל- PaNCED1, PaNCED3 ולגן המקודד לכאורה ל- PaMoCo sulfurase שערכנו הראה כי בציפה, בקליפת הזרע ובזרע של פירות קטנים חלה עלייה חדה ברמת ה- mRNA עבור *PaNCED3*, עלייה אשר החלה עם מופע פנוטיפ הפרי הקטן (88 ימים לאחר פריחה מלאה), ושיאה נצפה בשלבים מאוחרים של התפתחות הפרי. בנוסף, הודגמה ברקמות הפירות הקטנים עלייה מסוימת בביטוי הגן *PaNCED1* לקראת סוף תקופת התפתחות הפרי בעוד דגם הביטוי של הגן המקודד לכאורה ל- PaMoCo sulfurase הראה ביטוי כמעט קונסטיטוטיבי.

למרות שגם במקרה זה, האנליזות שביצענו לא לוו בבדיקות מקבילות למדידת רמת ה- ABA, בדיקות אשר מטבע הדברים נדרשות ויבוצעו בהמשך, מנתונים אלו ניתן להסיק כי העלייה ברמת ABA בפירות הקטנים אשר עליה דווח בעבר, מקורה מסינתזה *de novo* של ABA ברקמות השונות של הפרי, וכי עלייה בסינטזת ABA בפרי קטן במהלך התפתחותו מבוקרת ברמת השעתוק ותלויה בעיקר בשעתוקו של הגן המקודד לאיזופורם- NCED3.

ידוע כי ל- ABA ישנה השפעה שלילית על המעבר G1/S במחזור חלוקת התא (Swiatek *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 1998). השאלות הנשאלות הינן: האם בעקבות תנאי עקה החלים בפירות קטנים, עולה רמת ייצור ABA ברקמה הפרי וחלוקת התאים מועכבת ע"י הפעלת חלבונים המעכבים פעילות CDK או, האם לחילופין לעלייה ברמת ABA ישנה השפעה ישירה או עקיפה על ביטוי גנים המעכבים את מחזור חלוקת התא כגון *Pafw2.2*. בשלב זה, ממצאי עבודה זו מהווים נקודת התחלה. אנו מקווים כי בעתיד, הבנה מעמיקה יותר של המנגנונים המשפיעים על חלוקת התא ועל גדילת הפרי באבוקדו, עשויה לתרום לפיתוחם של פרוטוקולים אשר יאפשרו התמודדות עם תופעת הפרי הקטן באבוקדו 'האס'.

5. רשימת ספרות

חומסקי, ש. (1976). אבוקדו (הוצאת האנציקלופדיה לחקלאות). **כרך ג'**, ע"מ **230-238**.

Adato, I., Gazit, S., and Blumenfeld, A. (1976). Relationship between changes in abscisic acid and ethylene production during ripening of Avocado Fruits. J. Plant Physiology **3,** 555-558.

Baldet, P., Hernould, M., Laporte, F., Mounet, F., Just, D., Mouras, A., Chevalier, C., and Rothan, C. (2006). The expression of cell proliferation-related genes in early developing flowers is affected by a fruit load reduction in tomato plants. J. of Experimental Botany **57,** 961-970.

Barrero, J., Rodríguez, P., Quesada, V., Piqueras, P., Ponce, M., and Micol, J. (2006). Both abscisic acid (ABA)-dependent and ABA-independent pathways govern the induction of NCED3, AAO3 and ABA1 in response to salt stress. Plant, Cell and Environment **29,** 2000-2008.

Bergh, B.O. (1986). *Persea americana* (In: A.H. Halevy (Ed.) Handbook of flowering. CRC Press, Boca Raton, Florida.), pp. 253-268.

Bittner, F., Oreb, M., and Mendel, R.R. (2001). ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. J. of Biological Chemistry **276,** 40381-40384.

Blumenfeld, A., and Gazit, S. (1970). Cytokinin activity in avocado seeds during fruit development. Plant Physiology **46,** 331-333.

Burbidge, A., Grieve, T., Jackson, A., Thompson, A., McCarty, D., and Taylor, I. (1999). Characterization of the ABA-deficient tomato mutant notabilis and its relationship with maize Vp14. Plant J. **17,** 427-431.

Chang, W.T., and Lauzon, R.J. (1993). A rapid method for isolation of biologically functional RNA from colonial ascidians. Molecular Biology of the Cell **4,** 380A.

Chernys, J.T., and Zeevaart, J.A.D. (2000). Characterization of the 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado. Plant Physiology **124,** 343-353.

Chevalier, C. (2007). Cell cycle control and fruit development, in Cell cycle control and plant development, (Annual Plant reviews: D. Inzé Ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd).

Chung, C.T., and Miller, R.H. (1988). A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial-cells. Nucleic Acids Research **16,** 3580-3580.

Coleman, M.L., Marshall, C.J., and Olson, M.F. (2004). RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. Nature Reviews Molecular Cell Biology **5,** 355-366.

Cong, B., and Tanksley, S.D. (2006). FW2.2 and cell cycle control in developing tomato fruit: a possible example of gene co-option in the evolution of a novel organ. Plant Molecular Biology **62,** 867-880.

Cong, B., Liu, J., and Tanksley, S.D. (2002). Natural alleles at a tomato fruit size quantitative trait locus differ by heterochronic regulatory mutations. PNAS **99,** 13606-13611.

Cowan, A.K., Moore-Gordon, C.S., Bertling, I., and Wolstenholme, B.N. (1997). Metabolic Control of Avocado Fruit Growth (Isoprenoid Growth Regulators and the Reaction Catalyzed by 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase). Plant Physiology **114,** 511-518.

Cowan, A.K., Cairns, A.L.P., and Bartels-Rahm, B. (1999). Regulation of abscisic acid metabolism: towards a metabolic basis for abscisic acid-cytokinin antagonism. J. of Experimental Botany **50,** 595-603.

Cowan, A.K., Cripps, R.F., Richings, E.W., and Taylor, N.J. (2001). Fruit size: Towards an understanding of the metabolic control of fruit growth using avocado as a model system. Physiologia Plantarum **111,** 127-136.

Cowan, A.K., Taylor, N.J., and van Staden, J. (2005). Hormone homeostasis and induction of the small-fruit phenotype in 'Hass' avocado. Plant Growth Regulation **45,** 11-19.

Degani, H. and Goldring, A (1998). Pollen Parent Effect on Outcrossing Rate in 'Hass' and 'Fuerte' Avocado Plots during Fruit Development. J. Amer. Soc. Hort. Sci. **114**(1):106-111.

Drager, R.G. and Stern, D.B. (1998) in The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas, eds. Rochaix, J.-D., Goldschmidt-Clermont, M. and Merchant, S. (Kluwer, Dordrecht, The Netherlands), Vol. 7, pp 165-181.

Frary, A., Nesbitt, T.C., Grandillo, S., Knaap, E., Cong, B., Liu, J., Meller, J., Elber, R., Alpert, K.B., and Tanksley, S.D. (2000). fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. Science **289,** 85-88.

Gazit, S., and Degani, C. (2002). Reproductive Biology (In: Wiley T, Schafer B, Wolstenholme BN (eds) The Avocado: Botany, Production, and Uses. CABI Publishing, Wallingford Oxen, UK), pp. 101-133.

Grandillo, S., Ku, H.M., and Tanksley, S.D. (1999). Identifying the loci responsible for natural variation in fruit size and shape in tomato. Theoretical and Applied Genetics **99,** 978-987.

Guerra, B., Boldyreff, B., Sarno, S., Cesaro, L., Issinger, O.G., and Pinna, L.A. (1999). CK2: a protein kinase in need of control. Pharmacology and Therapeutics **82,** 303-313.

Gutiérrez, R., Quiroz-Figueroa, F., and Vazquez-Ramos, J.M. (2005). Maize cyclin D2 expression, associated kinase activity and effect of phytohormones during germination. Plant and Cell Physiology **46,** 166-173.

Gómez-Porras, J., Riaño-Pachón, D., Dreyer, I., Mayer, J., and Mueller-Roeber, B. (2007). Genome-wide analysis of ABA-responsive elements ABRE and CE3 reveals divergent patterns in Arabidopsis and rice. BMC Genomics **8,** 260.

Hesberg, C., Hänsch, R., Mendel, R., and Bittner, F. (2004). Tandem orientation of duplicated xanthine dehydrogenase genes from *Arabidopsis thaliana*: differential gene expression and enzyme activities. J. of Biological Chemistry **279,** 13547-13554.

Inzé, D. (2005). Green light for the cell cycle. EMBO J. **24,** 657-662.

Ish-Am, G., and Eisikowitch, D. (1998). Low attractiveness of avocado (*Persea americana Mill.*) flowers to honeybees (*Apis mellifera L.*) limits fruit set in Israel. J. of Horticultural Science and Biotechnology **73,** 195-204.

Iuchi, S., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2000). A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea. Plant Physiology **123,** 553-562.

Iuchi, S., Kobayashi, M., Taji, T., Naramoto, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. Plant J. **27,** 325-333.

Ji, Q., Wang, J., Jiang, L., Shen, S., Fan, Y., and Zhang, C. (2008). Identification of glucose-responsive elements in the promoter of UDP-L-rhamnose biosynthesis gene RHM1 in *Arabidopsis thaliana*. Chinese Journal of Biotechnology **24,** 1531-1537.

Kobayashi, T., Kato-Emori, S., Tomita, K., and Ezura, H. (2002). Detection of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase protein Cm-HMGR during fruit development in melon (*Cucumis melo L.*). Theoretical and Applied Genetics **104,** 779-785.

Koch, K. (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. Current Opinion in Plant Biology **7,** 235-246.

Lahav, E., and Gazit, S. (1994). World listing of avocado cultivars according to flowering type. Fruits **49,** 299-313.

Lefebvre, V., North, H., Frey, A., Sotta, B., Seo, M., Okamoto, M., Nambara, E., and Marion-Poll, A. (2006). Functional analysis of Arabidopsis NCED6 and NCED9 genes indicates that ABA synthesized in the endosperm is involved in the induction of seed dormancy. Plant J. **45,** 309-319.

Lewis, C.E., Morris, R., and O'Brien, K. (1978). The oil content of avocado mesocarp. J. of the Science of Food and Agriculture **29,** 943-949.

Liotenberg, S., Northa, H., and Marion-Poll, A. (1999). Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants. Plant physiology and biochemistry **37,** 341-350.

Liu, J., Cong, B., and Tanksley, S.D. (2003). Generation and analysis of an artificial gene dosage series in tomato to study the mechanisms by which the cloned quantitative trait locus fw2.2 controls fruit size. Plant Physiology **132,** 292-299.

Maniatis, G.M. (1982). Erythropoiesis: a model for differentiation. Prog Clin Biol Res **102 pt A,** 13-24.

Mendel, R.R., and Schwarz, G.R. (1999). Molybdoenzymes and molybdenum cofactor in plants. Critical Reviews in Plant Sciences **18,** 33-69.

Mendel, R.R., and Hänsch, R. (2002). Molybdoenzymes and molybdenum cofactor in plants. J. of Experimental Botany **53,** 1689-1698.

Milborrow, B.V. (2001). The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. J. of Experimental Botany **52,** 1145-1164.

Moore-Gordon, C.S., Cowan, A.K., Bertling, I., Botha, C.E.J., and Cross, R.H.M. (1998). Symplastic solute transport and avocado fruit development: A decline in cytokinin/ABA ratio is related to appearance of the 'Hass' small fruit variant. Plant and Cell Physiology **39,** 1027-1038.

Nakagawa, Y., Katagiri, T., Shinozaki, K., Qi, Z., Tatsumi, H., Furuichi, T., Kishigami, A., Sokabe, M., Kojima, I., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Iida, K., Terashima, A., Nakano, M., Ikeda, M., Yamanaka, T., and Iida, H. (2007). Arabidopsis plasma membrane protein crucial for Ca2+ influx and touch sensing in roots. PNAS **104,** 3639–3644.

Nambara, E., and Marion-Poll, A. (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. Annual Review of Plant Biology **56,** 165-185.

Narita, J.O., and Gruissem, W. (1989). Tomato hydroxymethylglutaryl-CoA reductase is required early in fruit development but not during ripening. Plant Cell **1,** 181-190.

Pines, J. (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations. Adv Cancer Res **66,** 181-212.

Qin, X., and Zeevaart, J. (1999). The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. PNAS **96,** 15354-15361.

Richings, E.W., Cripps, R.F., and Cowan, A.K. (2000). Factors affecting 'Hass' avocado fruit size: Carbohydrate, abscisic acid and isoprenoid metabolism in normal and phenotypically small fruit. Physiologia Plantarum **109,** 81-89.

Riou-Khamlichi, C., Menges, M., Healy, J.M., and Murray, J.A. (2000). Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression. Molecular and Cellular Biology **20,** 4513-4521.

Rodrigo, M.J., Alquezar, B., and Zacarías, L. (2006). Cloning and characterization of two 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis L. Osbeck*). J. of Experimental Botany **57,** 633-643.

Roe, D.J., and Morudu, T.M. (1999). Flower pruning of 'Hass' avocado when going into an "on" year in an attempt to decrease alternate bearing and increase fruit size. 'South African Avocado Growers' Association Yearbook 1999. **22,** 84-86.

Sagi, M., Scazzocchio, C., and Fluhr, R. (2002). The absence of molybdenum cofactor sulfuration is the primary cause of the flacca phenotype in tomato plants. Plant J. **31,** 305-317.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sa´nchez, M.P., Gurusinghe, S.H., Bradford, K.J., and Va´zquez-Ramos, J.M. (2005). Differential response of PCNA and Cdk-A proteins and associated kinase activities to

benzyladenine and abscisic acid during maize seed germination. J. of Experimental Botany **56**, pp. 515–523.

Schroeder, C.A. (1953). Growth and developmentof the 'Fuerte' avocado fruit. Proc. Am. Soc. Hortic. Sci. **68**, pp. 253-258.

Schwartz, S.H., Qin, X., and Zeevaart, J.A. (2003). Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. Plant Physiology **131,** 1591-1601.

Seo, M., and Koshiba, T. (2002). Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. Trends in Plant Science **7,** 41-48.

Seo, M., Aoki, H., Koiwai, H., Kamiya, Y., Nambara, E., and Koshiba, T. (2004). Comparative studies on the Arabidopsis aldehyde oxidase (AAO) gene family revealed a major role of AAO3 in ABA biosynthesis in seeds. Plant and Cell Physiology **45,** 1694-1703.

Sharon, D., Cregan, P. B., Mhameed, S., Kusharska, M., Hillel, J., Lahav E., and Lavi, U. (1997) An integrated genetic linkage map of avocado. Theor. Appl. Genet. **95**, 911-921

Swiatek, A., Lenjou, M., Van Bockstaele, D., Inzé, D., and Van Onckelen, H. (2002). Differential effect of jasmonic acid and abscisic acid on cell cycle progression in tobacco BY-2 cells. Plant Physiology **128,** 201-211.

Tan, B.C., Schwartz, S.H., Zeevaart, J.A.D., and McCarty, D.R. (1997). Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. PNAS **94,** 12235-12240.

Tan, B.C., Joseph, L.M., Deng, W.T., Liu, L., Li, Q.B., Cline, K., and McCarty, D.R. (2003). Molecular characterization of the Arabidopsis 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase gene family. Plant J. **35,** 44-56.

Tanksley, S.D. (2004). The genetic, developmental, and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. Plant Cell **16,** 181-189.

Taylor, N., and Cowan, K. (2001). Plant hormone homeostasis and the control of avocado fruit size. Plant Growth Regulation **35,** 247-255.

Verkest, A., Weinl, C., Inzé, D., De Veylder, L., and Schnittger, A. (2005). Switching the cell cycle. Kip-related proteins in plant cell cycle control. Plant Physiology **139,** 1099-1106.

Wang, H., Qi, Q., Schorr, P., Cutler, A.J., Crosby, W.L., and Fowke, L.C. (1998). ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. Plant J. **15,** 501-510.

Whiley, A.W., and and Schaffer, B. (1994). Avocado., in Handbook of environmental physiology of fruit crop (Subtropical and tropical crops., I.B.S.a.P.C.A. (eds.), CRC Press, Inc., Boca Raton: Fla.), pp. 3-35.

Whiley, A.W., Schaffer, B., and Wolstenholme, B.N. (2002). The avocado: botany, production, and uses. (Wallingford, Oxon, U.K.: CABI Publishing).

Xiong, L.M., Ishitani, M., Lee, H., and Zhu, J.K. (2001). The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. Plant Cell **13,** 2063-2083.

Yang, J., and Guo, Z. (2007). Cloning of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene (SgNCED1) from Stylosanthes guianensis and its expression in response to abiotic stresses. Plant Cell Rep **26,** 1383-1390.

Zdunek-Zastocka, E., Omarov, R., Koshiba, T., and Lips, H. (2004). Activity and protein level of AO isoforms in pea plants (*Pisum sativum L.*) during vegetative development and in response to stress conditions. J. of Experimental Botany **55,** 1361-1369.

Zeevaart, J.A.D., Heath, T.G., and Gage, D.A. (1989). Evidence for a universal pathway of abscisic acid biosynthesis in higher plants from ^{18}O incorporation patterns. Plant Physiology **91,** 1594-1601.

Zilkah, S., and Klein, I. (1987). Growth kinetics and determination of shape and size of small and large avocado fruits cultivar 'Hass' on the tree. Scientia Horticulturae **32,** 195-202

Zilkah, S., David, I., Yeselson, Y., Tamir, M., and Winer, L. (1998). Increasing 'Hass' avocado fruit size by CPPU and GA application. (Proceedings of the World Avocado Congress III), pp. 11-18.

Abstract

The 'Hass' avocado (*Persea americana* Mill.) cultivar dominates the world avocado industry. Despite its popularity, this cultivar is known to be problematic in terms of fruit size. 'Hass' trees produce two populations of fruits; normal (NF) and phenotypically small fruit (SF). Notably, a high proportion of the latter are produced, even under favorable conditions, contributing to economic losses. Anatomical studies demonstrated that the SF is limited by cell number and not by cell size, indicating that events controlling fruit cell division play a key role in fruit size determination. In addition, changes in hormone homeostasis, were shown to be linked to SF appearance. Studies performed with 'Hass' established that small sized fruit are characterized by elevated abscisic acid (ABA) levels. In addition, a recent study showed that increased ABA levels, coincide with the inability of SF seeds to produce/accumulate indole-3-acetic acid (IAA). Whereas ABA is known as a plant hormone implicated in stress-induced cell cycle arrest, it is well established that IAA is required to maintain sink strength and to positively regulate cell division. Hence, it was proposed that the inability of the seed to produce /accumulate IAA, occurring concomitantly with increased ABA levels formation/accumulation, plays a central factor in determination of final fruit size. However, despite the current state of knowledge of changes in hormonal homeostasis during 'Hass' avocado fruit development, to date, nothing is known about the molecular signals that link hormonal perception to cell cycle activity.

In tomato, *FW2.2* is one of few QTL controlling fruit size. Cloning of *FW2.2* revealed that its effect is caused by a single gene (*Lefw2.2*) encoding a transmembrane protein proposed to function as a negative regulator of fruit cell division. In the first part of this study, a partial; cDNA (*Pafw2.2*) encoding a FW2.2-like protein was isolated from 'Hass' SF mesocarp tissue. The identified *Pafw2.2* encodes a predicted 136 aa protein with two transmembrane domains, and shares 63.70% identity with LeFW2.2. sq-RT-PCR analysis revealed a strong increase in *Pafw2.2* transcript level during fruit development in SF tissues relative to NF tissues. Remarkably, during fruit development, mesocarp cell

number was significantly higher in NF, yet there were no significant differences in cell area between NF and SF. Taken together, our results suggest that *Pafw2.2* may function similarly to *Lefw2.2,* negatively regulating avocado fruit cell division. Whether up regulation of *Pafw2.2* is imposed by hormonal changes i.e. modification in IAA or ABA levels, remains at this stage as an open question.

As motioned above, elevated ABA levels are linked to 'Hass' SF phenotype and might play a role in controlling fruit cell division. The analysis of regulation of ABA biosynthesis is crucial in understanding ABA action, thus, in the second part of this work, we characterized the developmental expression profile of transcripts encoding key enzymes regulating ABA biosynthesis. Previous study from Zeevaart's lab led to isolation and characterization of an avocado *NCED* gene family, comprising three members (*PaNCED1-3*) encoding enzymes participating in an early regulatory step of ABA biosynthetic pathway. It was further shown that in dehydrated avocado leaves, were endogenous ABA levels accumulates, the expression of *PaNCED1*, but not of*PaNCED3*, was induced. To the best of our knowledge, so far, no study was performed to monitor *PaNCED1-3* expression pattern during avocado fruit development.

Another key enzyme in the ABA biosynthetic pathway is Molybdenum cofactor sulfurase. The last step of ABA synthesis is catalyzed by ABA-AO by the conversion of abscisic-aldehyde to ABA. *MoCo sulfurase* regulates the activity of molybdenum containing enzymes including ABA-AO by converting their molybdenum cofactor form into a sulfo form. In *Arabidopsis MoCo sulfurase (ABA3)* is expressed ubiquitously in different plant parts, yet its expression is induced under drought stress conditions underlying its physiological importance in plant stress responses. Using RT-PCR strategy a partial cDNA (*PaMoCo sulfurase*) encoding a ABA3-like from 'Hass' avocado was isolated. The identified *PaMoCo sulfurase* sequence encodes a predicted 263 aa protein and shares high homology to the N-terminal part of *MoCo sulfurase* from several plat species. Our sq-RT-PCR analysis reveled that while *PaNCED3* mRNA levels dramatically increases during fruit development in SF tissues relative to NF tissues, the expression level of *PaMoCo sulfurase* was constitutive and remind

mainly unchanged both in NF and SF tissues. These results thus: A. Provide evidence of SF *de novo* ABA synthesis B. Illustrate the main regulatory role of *PaNCED3* in ABA formation during SF development and C. Indicate that *PaMoCo sulfurase* plays a minor role regulating ABA synthesis during fruit development. Future exploration of ABA function in regulating avocado fruit cell division is called for.

Endogenic factors affecting 'Hass' avocado hormonal homeostasis and fruit size

M.Sc. Thesis

Submitted to the Roberts H. Smith Faculty of Agriculture,

Food and Environment

Of the Hebrew University of Jerusalem

By

Revital Akerman-Rosenfeld

Rehovot, Israel

April, 2009