

**מעקב אחר שינויים עונתיים בנשירה וביטוי גנים באתרי הניתוק של עגבניות
צ'רי באשכולות בהשפעת טיפולים לאחר הקטיפה ובמהלך האחסון**

עבודת גמר

**מוגשת לחוג העל – פקולטאי לביוטכנולוגיה
של האוניברסיטה העברית בירושלים בירושלים
לשם קבלת תואר "מוסמך בביוטכנולוגיה"**

מאת

מורן רום

עבודה זו נעשתה בהדרכתם של:

ד"ר אמנון ליכטר

המחלקה לחקר תוצרת חקלאית לאחר קטיף

מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני

ד"ר יונתן אלקינד

המכון למדעי הצמח וגנטיקה בחקלאות,

הפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה

האוניברסיטה העברית בירושלים

הבעת תודה

לד"ר אמנון ליכטר תודה מיוחדת על ההנחיה הייעוץ וההכוונה, על התמיכה והעזרה בביצוע המחקר ובכתיבת העבודה.

לד"ר יונתן אלקינד על ההנחיה הייעוץ וההכוונה במהלך עבודת המחקר ובכתיבת העבודה.

לד"ר שמעון מאיר על הייעוץ, ההכוונה והעזרה במהלך עבודת המחקר ובכתיבת העבודה.

לכל צוות המעבדה וחברי המחלקה לאחסון על היחס החם והאווירה התומכת לאורך כל הדרך, על העזרה בלימוד שיטות העבודה במהלך המחקר ועל הנכונות לסייע בכל עת.

למשפחתי היקרה, על אהבתם תמיכתם ועזרתם לכל אורך שנות הלימודים ועבודת המחקר.

לבעלי היקר, לי-רז

באהבה

תוכן העניינים

1	רשימת קיצורים.....
2	תקציר
4	1. מבוא וסקירת ספרות
4	1.1 הצגת נושא המחקר
5	1.2 רקע
5	1.3 הבשלת הפרי
6	1.3.1 השינוי בצבע –
6	1.3.2 השינוי בטעם והארומה –
6	1.3.3 השינוי במוצקות –
7	1.3.4 תפקיד אתילן בהבשלה
7	1.3.5 וויסות הבשלה דרך גורמים שבמעלה הזרם לסינתזת האתילן
8	1.4 תהליך הנשירה
9	1.4.1 רקמת הניתוק
10	1.5 בקרה הורמונלית
10	1.5.1 יחסי גומלין אוקסין-אתילן
12	1.5.2 חישת האוקסין ונתיב מעבר האותות בתא הצמחי
13	1.5.3 חישת האתילן ונתיב מעבר האותות בתא הצמחי
14	1.5.4 מעכבי פעולת אתילן
15	1.6 שינויים ביוכימיים ומולקולרים הקשורים בתהליך הנשירה
15	1.6.1 משפחת α -1,4-glucanase (EGase)
16	1.6.2 משפחת Polygalacturonases (PG)
17	1.6.3 משפחת Xyloglucan Endotransglycosylase (XET)
17	1.7 מטרות העבודה
18	2. שיטות וחומרים
18	2.1 מדדים לבדיקת איכות הפרי
18	2.1.1 מקור הפרי –
18	2.1.2 בדיקת נשירת הפרי –
18	2.1.3 בדיקת מוצקות –
18	2.1.4 בדיקת צבע –
19	2.1.5 בדיקת סוכר/TSS –
19	2.1.6 בדיקת חומצה -
19	2.1.7 בדיקת כוח הניתוק –
19	2.2 טיפולים
19	2.2.1 תנאי האחסון –
20	2.2.2 טיפול עם משטח –
20	2.2.3 טיפול עם אוקסין –
20	2.2.4 טיפול עם MCP-1 –
20	2.2.5 ניתוח סטטיסטי –
21	2.3 שיטות מולקולריות
21	2.3.1 הפקת RNA –
22	2.3.2 הפרדת RNA על גבי גיל אלקטרופורזה לבדיקת שלמות RNA –
22	2.3.3 כימות ה-RNA –
22	2.3.4 ניקוי RNA משאריות DNA –
22	2.3.5 סינתזת cDNA –
23	2.3.6 אנליזת ביטוי של גנים בשיטת Real-Time PCR –
24	2.3.7 אנליזת ביטוי של גנים בשיטת Semi-Quantitative PCR –
26	3. תוצאות
26	3.1 מהלך הנשירה של עגבניות צ'רי באשכולות במהלך האחסון

27	2.3 מדדי ההבשלה של עגבניות צ'רי באשכולות במהלך האחסון.....
28	3.3 השפעת טיפולי אוקסין ו-MCP-1 לאחר הקטיף על הנשירה במהלך האחסון.....
32	3.4 השפעת טיפולי אוקסין ו-MCP-1 שלאחר הקטיף על מדדי הבשלה של פרי עגבניית הצ'רי.....
35	3.5 דפוס הביטוי של אנזימים הידרוליטיים שונים ברקמות הניתוק של עגבניות צ'רי באשכולות.....
38	3.5.1 דגם הביטוי של הגנים השונים לאורך האחסון.....
38	3.5.2 השפעת הטיפולים עם אוקסין ובשילוב עם MCP-1 על ביטוי הגנים השונים.....
45	4. דיון.....
51	4.1 מהלך הנשירה בעגבניות צ'רי באשכולות.....
51	4.1.1 מהלך הנשירה בעגבניות צ'רי באשכולות לאורך האחסון.....
51	4.1.2 השפעת טיפולי האוקסין וה-MCP-1 לאחר הקטיף על מהלך הנשירה.....
53	4.1.3 בחינת פרמטרים שונים של מערך הניסוי.....
54	4.2 דגם ביטוי הגנים במהלך הנשירה.....
54	4.2.1 ביטוי הגנים לאורך האחסון.....
57	4.2.2 השפעת הטיפולים באוקסין וב-MCP-1 לאחר הקטיף על ביטוי הגנים.....
59	4.3 הבשלת הפרי לאורך האחסון.....
59	4.3.1 השפעת טיפולי אוקסין ו-MCP-1 לאחר הקטיף על מדדי ההבשלה.....
61	4.4 סיכום.....
62	5. רשימת ספרות.....
II	6. Abstract.....

רשימת קיצורים

גר' =	גרם
ח"מ =	חלקי מיליון
ני"ל =	נזכר לעיל
וכו' =	וכולי
טמפ' =	טמפרטורה
ל' =	ליטר
מ"ל =	מיליליטר
מ"צ =	מעלות צלזיוס
מ"מ =	מילימטר
סל"ד =	סיבובים לדקה
ק"ג =	קילוגרם

ACC = Aminocyclopropane-1-carboxylic acid

C = Control

CEL = cellulases

d = days

2,4-DP = 2,4-dichlorophenoxy propionic acid

IAA = Indole-3-Acetic Acid

J = Joint

1-MCP = 1-Methylcyclopropane

MACC = 1-(malonyl-amino)cyclopropane-1-carboxylic acid

NAA = Naphthaleneacetic Acid

P = Pedicel

PCR = Polymerase Chain Reaction

R = Receptacle

RT-PCR = Reverse Transcriptase PCR

STS = Silver Thiosulfate

TAPG = Tomato Abscission Polygalacturonase

3,5,6-TPA = 3,5,6-trichloro-2-pyridyloxyacetic acid

TSS = Total Soluble Solids

XET-BR = Xyloglucan Endotransglycosylase

תקציר

משך האחסון הפוטנציאלי של עגבניות צ'רי באשכולות תלוי בקצב ההבשלה שלהם וברגישותם לנשירה. כמו בפירות קלימקטריים אחרים, גם בעגבניות צ'רי תהליכי ההבשלה והנשירה מתווכים על-ידי אתילן ומושפעים בצורה עקיפה מההורמון אוקסין. ישנם שני אתרי נשירה פוטנציאליים של הפרי מהאשכול: אתר ניתוק העוקץ, שמצוי בין מצעית הפרי לבין אזור העוקץ (pedicel), ואתר ניתוק מפרק העוקץ באזור מפרק הגבעול (joint).

מטרות העבודה היו: (1) אפיון תהליכי הנשירה באתרי הנשירה השונים והקשר לעונות השנה. (2) בדיקת השפעות טיפולי אוקסין ו-1-MCP(1-methylcyclopropane) לאחר הקטיף על מהלך הנשירה וההבשלה של עגבניות צ'רי באשכולות בעונות שונות שבשנה. כמו כן, במהלך העבודה נערך אפיון של דגם הביטוי של שבעה גנים שונים השייכים למשפחות הגנים פוליגלקטרונאזות (polygalacturonases), צלולאזות (endo- β -1,4-glucanase) ו-קסילוגלוקן אנדוגליקוזילאז (Xyloglucan Endotransglycosylase) במהלך האחסון, הידועות זה מכבר כפעילות במהלך נשירה והבשלה של פירות רבים, ובחינת השפעת הטיפולים על ביטויים של הגנים השונים.

אשכולות עגבניות הצ'רי נקטפו בעונות שונות של השנה. לאחר הקטיף האשכולות עברו יישום של האוקסין (TPA(3,5,6-trichloro-2-pyridyloxyacetic acid) במינונים של 100-25 ח"מ והאוקסין NAA (Naphthaleneacetic Acid) במינון 50 ח"מ. מעכב פעולת האתילן, 1-MCP ניתן כגז במינון 0.5 ח"מ. האשכולות אוחסנו למשך 2-3 שבועות בטמפ' של 12°C ובלחות יחסית של 90-95%. דגימות של רקמות מפרק העוקץ, קצה העוקץ והמצעית שמייצגות את אתרי הניתוק נלקחו להפקות רנ"א. רנ"א זה שימש כתבנית לריאקציית Real-Time PCR ול-Semi-Quantitative PCR לשם מעקב אחר דגם הביטוי של הגנים לאורך האחסון ותחת הטיפולים השונים.

בדומה למחקרים קודמים, ממצאי המחקר מצביעים על נשירה בתקופת החורף שעיקרה היא ממפרק העוקץ בעוד שבקיץ עיקר הנשירה היא מקצה העוקץ. הפחתת הנשירה הכללית בעקבות יישום אוקסין או 1-MCP התקבלה במרבית מועדי הניסויים, אם כי ברמות שונות של עיכוב. נמצא כי העיכוב המירבי של הנשירה בכלל ושל נשירה מאתר ניתוק מפרק העוקץ בפרט התקבל במועדי הניסוי המייצגים את תקופת החורף. למעט מיקרים בודדים, האפקט המשולב של יישום אוקסין ו-1-MCP יחדיו לא הביא למגמת עיכוב נשירה נוספת. השפעות טיפולי אוקסין ו-1-MCP על מדדי הבשלה שונים כמו מוצקות, צבע, רמות סוכר וחומצה נבדקו גם הם במהלך האחסון של מועדי הניסויים השונים. בדומה להשפעות טיפולים אלו לגבי עיכוב הנשירה, גם כאן לא נראתה אחידות בתוצאות בין הניסויים. באופן כללי, שמירת המוצקות ועיכוב התפתחות הצבע של הפרי התקבלה כתוצאה מיישום של 1-MCP ולא הודות לטיפול אוקסין אקסוגני. לגבי השינויים ברמות החומצה וה-TSS כתוצאה מיישום אוקסין ו-1-MCP, לא נראתה מגמת השפעה אחידה של הטיפולים במועדי הניסוי השונים.

חקר ביטוי הגנים הצביע על מתאם ברור בין דגם הביטוי של הגנים *Cel5*, *Cell* ו-*Cel8* ממשפחת הצלולאזות ושל *TAPG1* ו-*TAPG2* ממשפחת הפוליגלקטרונאזות למהלך הנשירה. עלייה חדה

בביטוי חלק מהגנים (*TAPG1*, *Cel5* ו-*TAPG2*) התקבלה החל מימי האחסון המאוחרים, שבהם גם התקבלה נשירה משמעותית דרך אתר ניתוק מפרק העוקץ. להבדיל מדגם ביטוי זה, *TAPG4* והגן *XET-BR1* הופיעו כבר מתחילת האחסון ורמתם עלתה ככל שהתקדם האחסון. דגם ביטוי הגנים שהתקבל ברקמת המצעית לא היה עיקבי ורמתו הייתה נמוכה. עם זאת, יש לציין כי ביטוי הגן *Cell* ברקמת המצעית החל מיום הקטיפ והתגבר לאורך האחסון. בעבודה זו נעשתה גם השוואה של רמת הביטוי של הגנים השונים ברקמות ניתוק שעברו נשירה במהלך בדיקת הנשירה לעומת אותן רקמות בפירות שלא נשרו בעקבות הבדיקה. התוצאות מצביעות על עלייה בביטוי הגנים *CEL1* ו-*TAPG2* במועד בדיקה מוקדם יותר בהשוואה לביטוי שהתקבל במדגם הפרי שלא נשר. כמו-כן, רמת ביטוי הגנים נבדקה גם תחת השפעת טיפולי TPA ו-1-MCP וטיפול המשלב יישום של שניהם יחדיו בשני מועדי ניסוי שונים- פברואר ויולי, המייצגים את העונה הקרה והעונה החמה בשנה בהתאמה. יישום טיפולי האוקסין וה-1-MCP גרמו לעיכוב בביטוי הגנים ממשפחת הצלולאזות והפוליגלקטרונאזות בעיקר באתר ניתוק מפרק העוקץ. למרות תוצאות חיוביות אלו, בבחינת הנשירה הכללית התקבל עיכוב יחסי רק במועד פברואר לעומת יולי ולא התקבל מתאם בין עיכוב הביטוי להשפעה על נשירה דרך אתר ניתוק זה או אחר. ממצא המחזק את התאוריה שנשירה דרך אתר ניתוק קצה העוקץ, האופיינית בעיקר לתקופת הקיץ, מתרחשת כתוצאה מהתייבשות הרקמה ורגישותה לשינויים אנזימטיים מועטה. נשירה והבשלה שאינן תלויות בטיפולים עשויות להתקבל כתוצאה משיפעול גנים נוספים שלא נבדקו ממשפחות אלו ורבים אחרים שאינם ידועים כתוצאה מגורמים סביבתיים רבים כמו תנאי אחסון, תנאי גידול ועוד. מעבר לכך, טיפולי האוקסין וה-1-MCP הראו השפעת עיכוב חלקית בלבד על *TAPG4* שייתכן ועשוי להסביר את הפער בין יעילות הטיפולים בעיכוב גנים לבין ההשפעה החלקית של הטיפולים על תהליך הנשירה.

בעבודה זו הוכח באופן ברור כי נשירת הפרי בעגבנית הצ'רי מזן 1335 קשורה לגורם העונתי: עונה חמה מאופיינת בנשירה שעיקרה דרך אתר ניתוק קצה העוקץ, לעומת העונה הקרה שאופיינה בנשירה דרך מפרק העוקץ. בנוסף, נמצא כי בעוד שטיפולי אוקסין ו-1-MCP לאחר הקטיפ גורמים לעיכוב בביטוי מרבית הגנים, השפעתם על רמת הנשירה נמצאה כחיובית רק באופן חלקי ועיקר ההשפעה התקבלה בניסויים שנערכו במועדים המייצגים את עונת החורף, בה הניתוק מתרחש בעיקר במפרק העוקץ.

1. מבוא וסקירת ספרות

1.1 הצגת נושא המחקר

נשירת איברי צמחים כמו עלים, פרחים ופירות המבוססת על היפרדות תאים מהווה גורם בעל חשיבות יישומית חקלאית, הן ברמת הגידול והן ברמת אחסון התוצרת החקלאית לאחר הקטיף. השראת תהליך הניתוק במהלך הגידול ולאחר הקטיף, במהלך האחסון, של פרחים, חנטים או פירות מובילה לירידה משמעותית בכמות ובאיכות התוצרת הטרייה ולהפסדים כלכליים רבים. הפרדת הרקמות מתבצעת באמצעות פעילות אנזימים הידרוליטיים כמו פוליגלקטורנאז (polygalacturonases) וצלולאז (endo- β -1,4-glucanase) המושרים על-ידי אתילן, כאשר השראת הנשירה תלויה במאזן ההורמונלי האנדוגני של אתילן ואוקסין באזור הניתוק (Osborne, 1989; Roberts, 2000; Taylor and Whitelaw, 2001). תהליך הנשירה, באופן כללי, חל כאשר רמת האוקסין ברקמת הניתוק בצמח יורדת ורמת האתילן ורגישות החישה אליו עולה (Abeles et al., 1992). הגישות העיקריות להפחתת הנשירה המושרית על-ידי אתילן מבוססות בעיקרן על טיפולים המעכבים את ייצור האתילן (AOA(aminooxyacetic), AVG(aminoethoxyvinylglycine) או את פעילותו (1-MCP(1-methylcyclopropene), STS(silver thiosulfate) (Osborne, 1989; Sexton et al., 2000; Hoeberichts et al., 2002). טיפולים להעלאת רמות האוקסין ברקמת הניתוק ויישום אוקסין חיצוני נעשו בגידולים שונים למניעת ועיכוב נשירה (van Doorn and Stead, 1997; Dhanalakshmi et al., 2003; Meir et al., 2003), אך הבנת המנגנון המולקולרי שבאמצעותו אוקסין מפחית את רגישות הרקמה לאתילן ומונע את תחילת תהליך הנשירה טרם הובן.

עגבניות הן פרי קלימקטרי הממשיך את מהלך ההבשלה גם לאחר הקטיף. כתוצאה מכך ישנן בעיות רבות בוויסות שיווק הפרי ובאחסונו. הבעיות העיקריות באיכות פרי העגבנייה לאחר הקטיף הן: א. הבשלת יתר המתבטאת בצבע הפרי והתרככותו, הגורמת לקיצור חיי המדף של הפרי ולפגיעה באיכות המוצר. ב. ירידה בעמידות הטבעית של הפרי ורגישות לריקבון. ג. נשירת פירות בעגבניות צ'רי באשכולות המהווה את הגורם העיקרי המגביל את חיי המדף של המוצר. ברמה המסחרית, העגבניות נקטפות בשלבי הבשלה מוקדמים יותר, כאשר שני הפירות הקיצוניים עדיין בצבע ירוק, זאת על מנת להגיע לשווקי היעד עם פרי בשל ולאפשר מרחב תמרון שיווקי. מצב זה יוצר בעיה שיווקית, מאחר ודרגת ההבשלה של הפרי באשכול אינה אחידה והנשירה של הפרי מהאשכול לאחר הקטיף עשויה לקצר את משך האחסון הפוטנציאלי של הפרי.

העבודה המוצגת להלן מהווה המשך לעבודה קודמת (Lichter et al., 2006) שבוצעה על נשירת הפרי בעגבניות צ'רי באשכולות בזן 1335 (שירן), ובה נבחנו השפעות טיפולי אתילן, מתיל ג'יסמונט, חומצה אבציסית ומעכב פעולת האתילן, 1-MCP, על מהלך הנשירה ואיכות הפרי. כמו-כן, נבדקה השפעת עקת חום לאחר הקטיף והלחות היחסית במהלך האחסון על מהלך הנשירה מאתרי ניתוק שונים, ונבחנה השפעת חלק מהתכשירים על ביטויים של שני גנים המקודדים לצלולאזות, *Cel5* ו-*Cel8*. תוצאות העבודה המחישו את החשיבות הרבה של תנאי הגידול ועונת הקטיף על מהלך הנשירה ואפיון סוג הנשירה משני אתרי ניתוק שקיימים באשכול. נמצא כי קטיפים במועדי חורף

מאופיינים בנשירה שעיקרה מתרחשת דרך אתר ניתוק מפרק העוקץ, בעוד שנשירה במועדי קיץ מתרחשת בעיקר דרך אתר ניתוק קצה העוקץ. להבדיל ממחקר קודם שנעשה בזן Beno-) R-819 (Moualem et al., 2004), לא התקבלה השפעה עיקבית של הטיפולים על הנשירה. במחקר הנוכחי נבחנו השפעת יישום אוקסינים אקסוגניים ו-1-MCP על מהלך הנשירה וההבשלה במועדי קטיף שונים של השנה. נמשך האפיון המולקולרי של גנים השייכים למשפחת הצלולאזות endo-(β -1,4-glucanase) ובנוסף נבדק גם דגם הביטוי של גנים השייכים למשפחות הגנים פוליגלקטרונאזות (polygalacturonases) ו-קסילוגלוקן אנדוגליקוזילאז (Xyloglucanase) Endotransglycosylase) במהלך האחסון, ובחינת השפעת הטיפולים על ביטויים של גנים אלו.

1.2 רקע

העגבניה (*Solanum esculantum*) שייכת למשפחת הסולניים, המכילה כ-2800 מינים ומקורה כנראה ביבשת אמריקה. המשפחה מהווה מקור חשוב לאדם בצריכת מזון, תבלינים ותרופות. עם זאת חלק מהצמחים מכילים אלקלואידים בעלי פעילות ביולוגית, העשויים להפכם לרעילים עבור בני אדם ובעלי חיים החל מגרימת גירוי ועד לקטלניות (Davies and Hobson, 1981). פירות המשפחה הם לעתים ענבה, כמו העגבנייה, או "קפסולה" הנבקעת או נסדקת בעת שיבשה, ומשחררת מתוכה את זרעיה, בדומה לפלפלת הצ'ילי. בתוך הסוג *Lycopersicon* ישנה חלוקה של המינים לשתי קבוצות על-פי צבע הפרי – פירות המשתייכים ל-*Eulycopersicon* לרוב בעלי צבע אדום או צהוב בהבשלה, כדוגמת זן פרי העגבניה התרבותית (*S. esculantum*) ופירות הנשארים בצבע ירוק או סגול-ירוק במהלך התפתחותם, כמו החציל, נקראים *Eriopersicon*. **עגבניות הצ'רי** (*S. esculantum* var. *cerasiforme*) הן כנראה הצורה הקדמונית של זן העגבניה התרבותית הידוע כיום (*L. esculantum* Mill) (Davies and Hobson, 1981). כיום, גידולן נעשה בעיקר בחממות ובתי רשת עם הדלייה. קטיף העגבניות נעשה, לרוב, כקטיף של פירות בודדים, אך שיווק העגבניות באשכולות מהווה מספר יתרונות: הפירות המשווקים זוכים למראה רענן וטרי וישנו חסכון הן מבחינת הזמן והן מבחינה כספית בקטיף מסוג זה. האשכול מורכב מגבעול ראשי שממנו מסתעפים כ-12-16 פירות הנישאים על גבי עוקצים. עם זאת, יתרונות אלו הופכים לחסרון כתוצאה מנשירת הפרי והתייבשות של השיזרה ועלי הגביע המקצרים את זמן חיי המדף של האשכול (Lichter, Kagan-Zur and Mizrahi, 1993; Beno-Moualem et al., 2004; et al., 2006).

1.3 הבשלת הפרי

פנוטיפ ההבשלה המתקבל בפרי העגבניה הוא סיכום של שינויים ביוכימיים ופיזיולוגיים המתרחשים בשלב הסופי של התפתחות הפרי, ההופך את הפרי לאכיל ומושך בפני בעלי-חיים. שינויים אלו לרוב כוללים מודיפיקציות במבנה דופן התא והמרקם, הפיכת עמילן לסוכרים, שינויים בביוסינתזה וצבירת הפיגמנטים, בעיקר של ליקופן וקרוטן, והגברת רמות הטעם והארומה הנדיפים (Rhodes, 1980; Seymour, 1993; Giovannoni, 2001).

1.3.1 השינוי בצבע –

שינויי הצבע המתרחשים במהלך הבשלת הפרי נובעים מתהליך של חשיפת הפיגמנטים הקיימים כתוצאה מההרס של הכלורופיל ופירוק המערכות הפוטוסינתטיות, ועקב סינתזת סוגים שונים של פיגמנטים. הצבע האדום נובע בעיקר מהקרטנואיד ליקופן, המצטבר בכמויות הרבות ביותר מבין הפיגמנטים בפרי הבשל. בנוסף, ישנה צבירה של קרוטנואידים נוספים, קסנטופילים ואנתוציאנינים שנצברים בווקואולות. צבע הפרי מושפע בעיקר מתנאי הסביבה כמו עוצמת הארה וטמפרטורה, אך גם גורמים נוספים כמו תחלואה או הזנה לקויה יכולים להשפיע על צבע הפרי (Davies and Hobson, 1981; Heuvelink, 2005; Prasanna et al., 2007).

1.3.2 השינוי בטעם והארומה –

העלייה במתיקות הפרי היא כתוצאה מהעלייה בגלוקונאוגונה, הידרוליזה של פולי-סכרידים, בייחוד של עמילן, ירידה בחומציות וצבירה של סוכרים וחומצות אורגניות (Prasanna et al., 2007). הטעם בעגבנייה מושפע בעיקר מהשינוי בריכוז החומצות, בעיקר של החומצה הציטרית, מאשר השינוי בריכוז הסוכר (Atherton and Rudich, 1986). גוטיפים שונים של עגבנייה מאופיינים במגוון רחב של חומצות ו-pH. עגבנייה בשלה היא חומצית וערכי ה-pH הם בטווח של 4.1-4.8 (Heuvelink, 2005). השינוי בטעם והארומה מתקבל כתוצאה מהיווצרותם של תרכובות נדיפות כמו ocimene ו-myrcene ודגרדציה של פלבנואידים וטאנינים.

1.3.3 השינוי במוצקות –

רוב השינויים המבניים שמאפשרים התרככות של הפרי הם כתוצאה ממודיפיקציות במבנה ובהרכב דופן התא המתווכת על-ידי פעילות אנזימטית, התמוססות מלאה או חלקית של פוליסכרידים בדפנות התאים כמו פקטין, צלולוז והמיצלולוז, והידרוליזה של עמילן ותרכובות אגירה אחרות. השינויים בהרכב דופן התא הם כתוצאה מפעילות של אנזימים הידרוליטיים של קרבוהידרטים כמו פוליגלקטרונאזות, פקטינאזות, פקטינמתילאסטרנאזות, אקספנסינים וקרבוסקילמתילצלולאזות (Heuvelink, 2005). רוב אנזימים אלו מצויים ברמות נמוכות, ובמהלך ההבשלה פעילותם עולה, בייחוד של הידרוליזות דפנות התאים, עד לקבלת שיא בפעילות בשלב הקלימקטרי. אחד האנזימים החשובים בהבשלת הפרי הוא הפוליגלקטרונאז (PG) שאחראי על פירוק הפקטין, המרכיב השכיח בדופן התא הראשוני ובלמלת הביניים, ורמת פעילותו עולה עם התחלת תהליך ההבשלה. למרות זאת, נמצא על-ידי עבודת מחקר עם עגבניות טרנסגניות שהאנזים לבדו אינו מספיק בקבלת התרככות הפרי ושינוי המרקם (Prasanna et al., 2007). אנזים נוסף המעורב במטבוליזם של דופן התא הוא פקטין-מתילאסטרנאז (PME) שרמת פעילותו עולה במעבר פרי העגבנייה משלב 'ירוק-בוגר' (mature green) עד לקבלת פרי אדום, אנזים זה אחראי לפירוק קבוצות מתיל-אסטר בפקטין, ועל-ידי כך חושף את הפקטין לפעילות ה-PG. ייתכן ופעילותו מהווה דרישת-קדם לפעילות הפוליגלקטרונאז. דיכוי רמת האנזים גרם לעלייה בתכולת המוצקים ולירידה בפירוק הפקטין, אך לא לשינוי מהותי במאפייני ההבשלה, כולל התרככות. כמו כן, נמצא כי פעילות אנזימי הצלולאזות עולה גם היא במהלך ההבשלה, אך מאחר ולא התקבלה

השפעה על פנוטיפ ההבשלה כתוצאה מדיכויים ההשערה היא כי הם מתפקדים כחלק מתהליכים מטבוליים מורכבים או שפעילותם חופפת (redundancy) (Giovannoni, 2001; Prasanna et al., 2007).

1.3.4 תפקיד אתילן בהבשלה

פירות בשרניים ממוינים על-פי היותם קלימקטריים או לאו, לשם הבדלתם על-בסיס קצבי הנשימה וייצור האתילן. פרי קלימקטרי כמו העגבניה מראה על עלייה בקצב הנשימה וסינתזת האתילן בהבשלה בהשוואה לפרי לא קלימקטרי כמו תפוז, שיכול להגיב לאתילן אך איננו הכרחי בתהליך ההבשלה. ההורמון הגזי אתילן ממלא תפקיד מפתח בבקרת תהליכי ההבשלה של פירות רבים (Giovannoni, 2001; Barry and Giovannoni, 2007). המאפיינים הביוכימיים של מסלול הביוסינתזה של אתילן בצמחים עילאיים ידועים זה מכבר וניתן לחלקו לשלושה שלבים עיקריים: (1) הפיכת מתיונין ל-S-adenosyl-L-methionine (SAM) על-ידי האנזים SAM סינתאז (2) קבלת ACC aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) דרך פעילות ACC סינתאז (ACS) (3) הפיכת ACC לאתילן על-ידי ACC אוקסידאז (ACO). קצב ייצור האתילן נקבע על-ידי שני השלבים האחרונים במסלול ועל-ידי האנזים ACS (Kende, 1993; Barry and Giovannoni, 2007).

התפקיד הקריטי של אתילן בתיאום ההבשלה הקלימקטרית ברמה המולקולרית אובחן לראשונה דרך אפיון אחד המוטנטים הראשונים - "Never Ripe" (Nr) המבשיל באיטיות רבה יותר מהרגיל, כתוצאה מנוכחות אלל דומיננטי הפוגעת ברצפטור לאתילן (LeETR1) (Davies and Hobson, 1981; Giovannoni, 2001). תאור מעבר האותות במסלול האתילן ואפשרויות עיכוב השפעתו על-ידי תכשירים שונים יינתן בהמשך בהקשר לתהליך הנשירה.

1.3.5 וויסות הבשלה דרך גורמים שבמעלה הזרם לסינתזת האתילן

בעגבנייה, תוארו שלושה מוטנטים שונים: "ripening inhibitor" (*rin*), "nonripening" (*nor*) ו-"Colorless non-ripening" (*Cnr*) הפגועים במהלך ההבשלה שכולל את סינתזת האתילן, עלייה בנשימה, צבירת קרטנואידים, התרככות, וייצור ארומה. בשלושת המוטנטים אלו ייצור האתילן הקשור בהבשלה חסום בעקבות הבקרה הלא תקינה של ביטוי ACS. מחקרים עם המוטנטים *rin* ו-*nor* הראו שייצור אתילן הקשור לפגיעה נשמר בפירות אלו, מה שמצביע על כך שהמוטציות אינן קשורות לחסימה כללית בייצור אתילן. בנוסף, יישום של אתילן חיזוני אינו משקם את פנוטיפ ההבשלה, אם כי הוא מסוגל לשקם באופן חלקי את ביטויים של גנים המווסתים על-ידי אתילן. ולכן מוטנטים אלו כנראה ופגועים בפקטורים המצויים במעלה הזרם לאתילן שמשפיעים על יכולת ההבשלה (Barry and Giovannoni, 2007). גן ה-RIN שייך למשפחת פקטורי השיעתוק מסוג MADS-box, המעורבים במספר היבטים התפתחותיים של הצמח כמו זמן הפריחה, הבשלה, מבנה השורשים ועוד (Causier et al., 2002; Vrebalov et al., 2002). מוטציית ה-*cnr*

מתרחשת בגן SBP, שמקודד לחלבוני SBP-box המבקרים ביטוי גנים מקבוצת ה- MADS-box (Barry and Giovannoni, 2007).

1.4 תהליך הנשירה

נשירת איברים שונים כגון עלים, פרחים או פירות מצמח-האם הינה תוצאה של תהליך מורכב שבסיומו מושגות אחת משתי מטרות- האחת מסייעת לתהליך הרבייה/הפצה על-ידי השרה פעילה של פירות או מבנים שונים בצמח כמו ניצנים, המסוגלים לבסס עצמם לפרטים חדשים עצמאיים. המטרה השנייה היא השרה פעילה של איבר שהגיע לסיום תפקידו על-גבי הצמח. נשירה זו לרוב קשורה בקשר הדוק עם ההזדקנות של אותם איברים כמו עלים, פרחים, עלי-גביע וכדומה. נשירת הפרי, באופן כללי, דומה לנשירת עלים בכך שהנשירה מתבצעת בסיום הבשלת (הזדקנות) הפרי, אך היא שונה מנשירה זו מאחר והפרי הנושר תורם לפעילות ההורשה בכך שהוא מכיל בתוכו את זרעים ועוברים מריסטמטיים, שהם הערובה לקיום הדור הבא של הצמח (Osborne, 1989). השראת הנשירה תלויה בהשפעה הדדית מורכבת בין ריכוזי ההורמונים הצמחיים ובין הגורמים הסביבתיים והתפתחותיים, כגון הזדקנות, החשיפה לאור, עקת מים, פציעה וכו' המשנים את היענות או רגישות הרקמות השונות בצמח לאותם הורמונים (Whitelaw et al., 2002). בעוד ששלב התפתחותי או גורם סביבתי כזה או אחר יכול להשפיע על זמן התרחשות הנשירה, התהליך עצמו קורה כמו בכל איבר בצמח – על-ידי תוכנית התפתחותית קבועה מראש של הפרדת תאים (Osborne, 1989; Whitelaw et al., 2002).

במהלך תהליך הניתוק ישנה היפרדות של תאים המתאפשרת הודות לפירוק דופן התא ולמלת-הביניים, העשירה בפקטין. שחרור זה של התאחיה (adhesion) יחד עם הלחץ הנוצר כתוצאה מהתרחבות התאים והפעילות האנדוממברנלית שלהם, הינו מספיק להפרעת קשרי הפלסמדמטה (plasmadesmata) שבין התאים. לאחר מכן, תאי אזור הניתוק מתעגלים כנראה לשם יצירת לחץ הידראולי הגורם לקטיעת רקמת צינורות ההובלה, שהיא הרקמה היחידה שאינה עוברת פירוק דופן עד קבלת הנשירה. לאחר הנשירה, מגוון אירועי חלוקת תאים מתרחשים יחד עם התעצות (lignification) או שיעום (suberization) של דפנות התאים באיזור הנשירה לקבלת שכבת מגן (Osborne, 1989; Roberts et al., 2002). שיאו של תהליך הנשירה הוא ההיפרדות הפיזית, ולכן נעשו הרבה עבודות בהבנת תהליך פירוק דפנות התאים באזור הניתוק. למרות שמגוון גורמים כמו שינויים בריכוזי סידן ו-pH, נחשבים כתורמים להיחלשות דופן התא, רוב המחקרים גורסים כי ישנה עלייה בפעילותם של אנזימים הידרוליטיים שונים כמו *endo-β-1,4-glucanase*, *Polygalacturonases*, ו-*Xyloglucan Endotransglycosylase* עליהם ידובר בהמשך, ושל החלבון *Expansin* שקשור בשינוי גמישות דפנות התאים במהלך גדילתם וההבשלה (Gonzalez-Carranza et al., 2002). למעשה, חלבון זה גורם להפרעת קשרי המימן שקיימים בין סיבי הצלולוז ל-*xyloglucan*, ולאחרונה פורסם מחקר על פרי הסמבוק (*Sambucus nigra*) המראה קשר בין *Expansin* לבין תהליך הנשירה כתוצאה מעלייה בפעילותו באזורי נשירה של עלעלים המטופלים באתילן (Gonzalez-Carranza et al., 2002; Belfield et al., 2005). בעגבניה אין עדיין עדות למעורבות של *Expansin* בנשירה אך ידוע שהגנים מתבטאים במהלך הבשלת הפרי,

ודיכוי Expansin ספציפי (Exp1) גרם לירידה בהתרככות הפירות בעוד שביטוי ביתר שלו גרם לעלייה בהתרככות, גם של פרי ירוק בוגר (Giovannoni, 2001) בנוסף לכך, ישנה היפותיזה הטוענת כי בתהליך הנשירה יש גם מעורבות של תהליכי מוות מתוכנת של תאים (PCD). במחקר שפורסם נראתה עלייה בביטוי ופעילות של ריבונוקלאז (RNase) ספציפי, LX, באזור הניתוק של עלי עגבניה, הקשור בין השאר בפעילות של הזדקנות, תגובות לאתילן ולתהליכי אפופטוזיס בצמח (Lers et al., 2006).

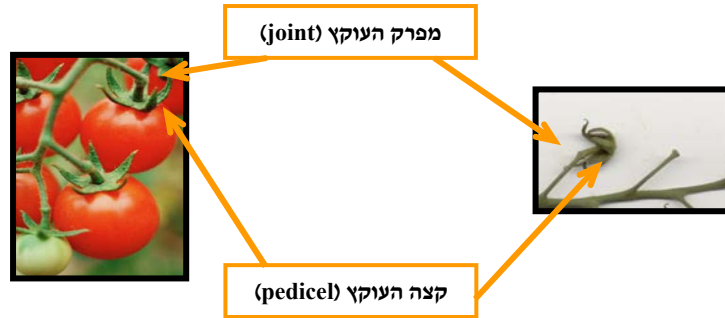
1.4.1 רקמת הניתוק

כאמור, נשירת איברים אינה התרחשות אקראית, אלא היא מאפיינת תאים מסויימים המרכיבים את איזורי הניתוק. איזורים אלו עוברים התפלגות מדוייקת שיכולה להתרחש כמעט בכל שלב התפתחות הצמח (Osborne, 1989). אף על-פי שהאיזורים העיקריים בהם נשירה מתרחשת הינם קבועים מראש, תחת תנאים מסויימים תהליכים דומים עשויים לקרות באזורים שבהם באופן נורמלי אין נשירה (Gonzalez-Carranza et al., 2002). אזורי נשירה משניים אלו תועדו בעיקר בעבודות עם רקמות מנותקות, אך הם נוצרים גם בסביבה טבעית.

בזמן התפתחות הפרחים של עגבניה ישנה התארכות של קצה הגבעול (pedicles) מציר הגבעול (axis), ובין הפרח והגבעול נוצרת רקמת ניתוק, שניתן לזהותה ע"י השתנות זוויתית של הגבעול והתנפחות של הרקמה באזור הניתוק העתידי (Davies and Hobson, 1981). באזור הניתוק נוצר חריץ לאורך היקף הגבעול אשר הינו צר יותר בעובי הרדיאלי של הקורטקס.

איזור הניתוק מורכב משכבות תאים העוברות שינויים מורפולוגיים ניכרים לפני תחילת תהליך הנשירה (Taylor and Whitelaw, 2001; Gonzalez-Carranza et al., 2002). הם, על-פי רוב, תאים קטנים ובעלי צורה מרובעת, המכילים ציטופלסמה דחוסה ודופן תא דקה, שכוללת כמות קטנה של סוברין וליגנין. תאים אלו, בניגוד לתאים הסובבים אותם, איבדו את היכולת לגדול ולהפוך לבעלי ווקואולות גדולות כפי שקורה בתהליך גדילה נורמלי, אף על פי שהם גדלים בזמן תהליך הנשירה (Osborne, 1989; Taylor and Whitelaw, 2001). תהליך ההתנתקות מתרחש בין שתי שכבות נפרדות של תאים הנקראים תאי המטרה של אזור הניתוק. תאים אלו, הגדלים בתגובה לאתילן אך לא לאוקסין סווגו כתאי מטרה TypeII והם נבדלים מרוב תאי הצמח - TypeI, אשר גדלים אורכית כתגובה לאוקסין אך לא לאתילן ורוחבית במקרה של יישום אתילן (Osborne, 1989; Taylor and Whitelaw, 2001). ישנם גם תאי TypeIII הגדלים בתגובה לשני ההורמונים, הן אוקסין והן לאתילן (Whitelaw et al., 2002).

בפרי העגבניה ישנה רקמת ניתוק (תמונה 1) בין מצעית הפרי לבין אזור העוקץ (pedicel), ורקמת ניתוק נוספת באזור מפרק הגבעול (joint) (Taylor and Whitelaw, 2001; Gonzalez-Carranza et al., 2002).



תמונה 1 – אתרי הניתוק של עגבניית צ'רי באשכול עם פרי ולאחר הניתוק.

1.5 בקרה הורמונלית

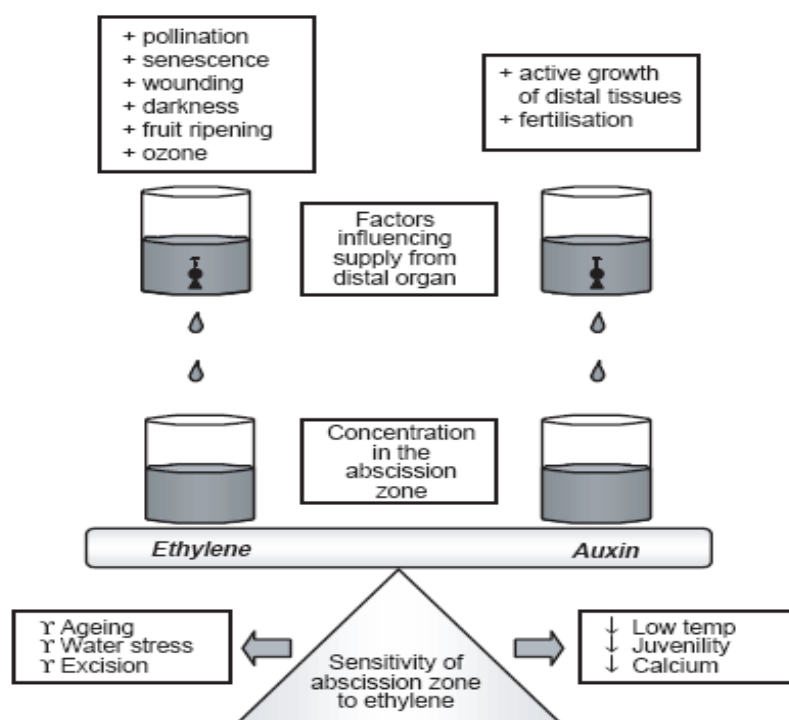
פיטוהורמונים (phytohormone) אחראים למגוון רחב של תופעות בהתפתחות וגדילת צמחים, שלעיתים אינן קשורות האחת לשנייה (Klee, 2002; Klee, 2004). לדוגמא, הורמון האתילן בעגבניה הינו מרכיב הכרחי בהזדקנות פרחים, נשירה, השרשה, והבשלת פירות (Klee and Tieman, 2002). הורמון זה מיוצר גם תחת מצבי עקה ביוטיים וא-ביוטיים שונים (Klee, 2002). המערך הרחב של תגובות הצמח לאותות פנימיים וחיצוניים מתווך על-ידי פעולת גומלין שבין ההורמונים השונים וסימנים (signals) אחרים. למרות שבספרות קיימות דוגמאות רבות ליחסי-הגומלין שבין ההורמונים, מעט ידוע על המכניזם המולקולרי שמאפשר השפעה הדדית זו (Stepanova et al., 2007).

תגובת הנשירה היא מכלול של גורמים הורמונליים, הכוללים ירידה בביוסינתזה ובתנועת ההורמונים מעכבי-הנשירה כמו אוקסין וציטוקינין, החופפת לעלייה ברמות אתילן ו-ABA, שקשורים בדרך-כלל לעיכוב גדילה והזדקנות (Taylor and Whitelaw, 2001).

1.5.1 יחסי גומלין אוקסין-אתילן

יחסי הגומלין שבין אתילן ואוקסין ידועה מזה שנים רבות הן ברמה הפיזיולוגית והן ברמה המולקולרית. ההשפעות הסינרגיסטיות של שני הורמונים אלו בבקרת יצירת שערות השורש, התארכות וגדילה שורשים בצמח הארבידופסיס (*Arabidopsis thaliana*) בניגוד להשפעות האנטגוניסטיות שלהם בנשירת פירות ופרחים, מדגישים את מורכבות יחסי הגומלין שבין שני הורמונים אלו (Stepanova et al., 2007). עבודות עם מוטנטים, בעיקר בארבידופסיס, חשפו רבדים נוספים במורכבות ההשפעה ההדדית של אוקסין ואתילן בתהליכים ושלבים במחזור החיים של הצמח. לדוגמה, בנבטים אתילונטים (etiolated) של ארבידופסיס נראה כי אתילן ואוקסין מבקרים התארכות היפוקוטיל באופן עצמאי (Collett et al., 2000), בעוד שפעולת עיכוב גדילת שורשים על-ידי אתילן תחת אותם תנאים כנראה ונוקת להימצאות אוקסין (Swarup et al., 2002; Stepanova et al., 2007). בדוגמה אחרת, מוטציות בנשאים AUX1 ו-AtPIN2, האחראים לזרימה פנימה והחוצה של אוקסין, גרמו לשינויים בהתארכות השורש כתגובה לשני ההורמונים (Pickett et al., 1990; Muller et al., 1998), וההשערה היא כי אתילן נחוץ לזרימה תקינה של אוקסין על מנת לעכב את גדילת השורשים.

תהליך הנשירה, כפי שצוין קודם לכן, הינו תהליך מאורגן ומבוקר היטב וניתן לחלקו, למעשה, לשתי פאזות: הפאזה הראשונה מאופיינת באי-היענות או היענות נמוכה מאד לרמות לא-גבוהות של אתילן, ומשכה נקבע כנראה לפי רמות האוקסין העוברות או מצויות באזור הניתוק. כאשר רמות האוקסין יורדות מעבר לסף מסויים ועל-פי רמות האתילן המצויות באזור הניתוק, מתחילה הפאזה השנייה שמעוררת את תהליכי הניתוק (Osborne, 1989; Gonzalez-Carranza et al., 1998). המאזן בין שני הורמונים אלו הוא כנראה גורם המפתח שמוסרת את זמן תחילת התהליך.



תמונה 2- מודל המאזן של אוקסין ואתילן בצמח בזמן הנשירה (Taylor and Whitelaw, 2001)

למרות הידע המוגבל לגבי מנגנון פעולת IAA בהקשר לאי-תגובת התאים באזור הניתוק לאתילן, ידוע כי מצב האוקסין באזור זה שולט ברגישות לאתילן. לכן כל גורם שיפריע באספקת האוקסין לתאים באזור הניתוק למעשה ישפיע על הרגישות לאתילן, וכתוצאה מכך על הנשירה. מצד שני, אוקסין עצמו מעודד ייצור של אתילן, המהווה מעכב פוטנציאלי של תנועת אוקסין ויכול להגביר את רגישות אזור הניתוק לעצמו על-ידי הפרעה ביצירת IAA חופשי ובמעבר אוקסין (Taylor and Whitelaw, 2001; Roberts et al., 2002). ידוע זה מכבר כי הרגישות לאתילן נמצאת ביחס הפוך למספר הרצפטורים שלו על גבי התאים (Klee, 2002). לכן, ייתכן כי השינויים ברמות האוקסין ברקמת הניתוק משפיעות על רגישות הרקמה לאתילן דרך הורדת ריכוז הקולטנים או דרך הבקרה של פעולת גורמים אחרים במורד הזרם של מסלול העברת האות של אתילן (Meir et al., 2003; Meir et al., 2006a; Kevany et al., 2007).

1.5.2 חישת האוקסין ונתיב מעבר האותות בתא הצמחי

מאפיין בולט המבדיל בין אוקסין לשאר הפיטוהורמונים הוא הניידות הרבה של הורמון זה לאורך הצמח הודות למנגנון מולקולרי ייחודי. הובלה זו, שהינה מכוונת ומבוקרת, קרויה הובלת אוקסין פולרית (polar auxin transport (PAT) (Hardtke et al., 2007). התאים התורמים יכולים להתרוקן מאוקסין או לאו, תלוי באם הם מחדשים את המלאי על-ידי סינתזה מחדש או כתוצאה מזרימה פנימה של אוקסין מתאים סמוכים אחרים. זרימת האוקסין פנימה או החוצה מהתא הינה תלויה בפעילות המשולבת של נשאים שונים כדוגמת *AUX1* ו-*PIN* (Rechenmann and Napier, 2005). ידועים כיום מספר חלבונים קושרי אוקסין כדוגמת *ABPI*, זהו חלבון מסיס המעורב באירועי התפתחות שונים של הצמח כמו התארכות וחלוקת תאים (Taylor and Whitelaw, 2001; Rechenmann and Napier, 2005; Teale et al., 2006). הרצפטור לאוקסין *TIR1*, זוהה רק לאחרונה והוא חלבון מסוג F-box שמהווה חלק ממערכת הסימון הפרוטאוזומלית (SCF). חלבון זה אחראי באופן ספציפי על סימון חלבוני *Aux/IAA* על-ידי Ubiquitins ושליחתם לדגרדציה בפרוטאוזום (Taylor and Whitelaw, 2001; Rechenmann and Napier, 2005; Chow and McCourt, 2006). משפחת *Aux/IAA* הינם רפרטוריום, המדכאים ביטוי מספר רב של גנים, הממוקמים בגרעין (Teale et al., 2006; Kepinski, 2007). חלבוני *Aux/IAA* יוצרים הומודימרים והטרודימרים האחד עם השני וגם עם משפחת חלבונים נוספת, הנקראת *ARF*. בנוכחות אוקסין, יש קישור בין ההורמון לרצפטור *TIR1* המעודד כתוצאה מכך את קישור חלבוני ה-*Aux/IAA* גם הם לקומפלקס המתהווה *SCF^{TIR1}-auxin*, ועל-ידי כך למעשה מסמנם לדגרדציה. היחס של הטרודימר *Aux/IAA-ARF* יורד ומאפשר תעתוק גנים דרך תיווך של *ARE* (auxin-responsive element) והוצאה לפועל של תגובת אוקסין (Teale et al., 2006; Kepinski, 2007).

אוקסין משמש כשם כללי למגוון תרכובות בצמח. מולקולות בעלי פעילות דמויית-אוקסין יכולות להימצא גם ביונקים ומיקרואורגניזמים. למרות ההבדלים הקיימים בין מבני התרכובות, כולן גורמות להשפעות הדומות לתגובה המתקבלת על-ידי *IAA*, שמהווה את האוקסין הטבעי של הצמח (Teale et al., 2006; Kepinski, 2007). מאז גילוי תרכובת האוקסין זוהו מספר תרכובות סינתטיות כמו 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D), 3,5,6-trichloro-2-pyridyloxyacetic acid (3,5,6-TPA) ו-1-naphthalene acetic acid (1-NAA), שבעזרתם התקבל ידע רב ובעל ערך בניסויים שונים והתאפשרו טיפולים לשיפור התוצרת המסחרית (T. Addicott, 1982), הודות לעובדת היות האוקסינים הסינתטיים, בניגוד ל-*IAA*, עמידים יחסית כנגד פעילות אנזימי הצמח (Peter H. Raven, 1981). ההשפעות של האוקסינים הסינתטיים משתנות על-פי הרקמה, זמן יישומו, ובין הזנים השונים. כמו בתרכובות פיזיולוגיות רבות, אוקסין הינו רעיל לצמח בריכוזים מאד גבוהים, 2,4-D לדוגמה ידוע כאחד מקוטלי העשבים שבשימוש.

1.5.3 חישת האתילן ונתיב מעבר האותות בתא הצמחי

מידת היענות הרקמה לאתילן הינה תלויה הן בריכוז ההורמון הגזי, המיוצר על-ידי הרקמות הצמודות לאזורי הניתוק או על-ידי האטמוספירה החיצונית כתוצאה מצבירת חומרים מזהמים או כתוצאה מסינתזה של על-ידי צמחים/מיקרואורגניזמים שכנים, והן ברמות הרצפטורים של (Sexton, 1997; Gonzalez-Carranza et al., 1998; Klee and Tieman, 2002). במודל בקרת הקולטנים מקובל להציע שיש מתאם הפוך בין רמות הקולטן לבין רגישות הרקמה לאתילן. כך למשל נמצא כי בנוכחות אתילן יש פירוק של שני חברים ממשפחת הגנים של הרצפטורים LeETR4 ו-LeETR6, דבר הגורם לקבלת פנוטיפ הבשלה מוקדם (Kevany et al., 2007).

בעגבניה, משפחת הגנים של הרצפטורים לאתילן מכילה שישה חברים במספר, LeETR1-6. החלבונים המקודדים על-ידי גנים אלו שונים מבחינת המבנה וחולקים זהות של פחות מ- 50% ברצף בקיצונים (Klee and Tieman, 2002; Klee, 2004).

ביטוי הרצפטורים השונים לאתילן משתנה במהלך ההתפתחות וכתגובה לאות חיצוני. הרצפטורים LeETR1 ו-LeETR2 מתבטאים באופן קונסטיטוטיבי בכל הרקמות במהלך ההתפתחות. בניגוד להם, ביטוי ארבעת הגנים האחרים הינו מבוקר היטב. למשל, בזמן התפתחות הפרי, ביטוי NR עולה בשחלות, יורד לאחר מכן ועולה שוב במהלך ההבשלה. הגנים LeETR4-6 מתבטאים בשפע בפרחים ופירות, אך כמותם פחותה ברקמות וגטיביות. אופן ביטוי זה של הרצפטורים מתאים לתוצאות מחקרים בעגבניות שהראו כי פירות בוסר אינם מבשילים בתגובה לאתילן חיצוני, למרות שהם חשים בנוכחותו, כפי שהוכח על-ידי קבלת אקטיבציה של גנים מושרי-אתילן, כמו ACC oxidase.

המבנה הפיזי-כימי הייחודי של אתילן מאפשר לו לעבור דיפוזיה בחופשיות דרך הממברנות והציטופלסמה של התא עד ל-ER, שם ממוקמים הרצפטורים לאתילן (Alonso and Stepanova, 2004). קישור האתילן אל הרצפטור גורם להפסקת פעילותו, ולשחרור LeCTR1 הקשור אליו. כתוצאה מכך, כנראה על-ידי חלבוני MAPK יש מעבר של אות לדיכוי מולקולת הרפרסור LeEIN2 ולעידוד היווצרותם של פקטורי שיעתוק שונים הגורמים לקבלת התגובה לאתילן (Alonso and Stepanova, 2004; Klee, 2004). מעבר אותות שכזה למעשה מייצג בקרה שלילית, ומצביע על יחס הפוך בין כמות הרצפטורים על-גבי הרקמה לרגישות לאתילן. ברגע שאחוז סף מסויים מהרצפטורים תפוס על-ידי מולקולת האתילן, כלומר הופך ללא-פעיל, נראית התגובה להורמון. בנוסף, נמצא כי זמן מחצית החיים של הרצפטור ארוך יחסית כך שברגע שהרצפטור נקשר לאתילן, הוא לא יכול לגרום לדיכוי הגנים שהופעלו כתוצאה מנוכחותו לזמן ארוך מאד, אם בכלל. כאשר מדובר בתגובות סופיות, בלתי הפיכות כמו נשירה, הבשלת פרי או הזדקנות אין צורך בהפיכת התהליך, אך אתילן מתווך תגובות נוספות, כמו עקות למיניהן ואז יש צורך בהיפוכו של התהליך ולכן אחת הדרכים לביטול תגובת האתילן היא על-ידי ייצור מחדש של הרצפטורים (Klee and Tieman, 2002; Klee, 2004).

1.5.4 מעכבי פעולת אתילן

התהליכים המתווכים על-ידי אתילן יכולים להיות תחת שליטה ובקרה בעזרת השימוש בתרכובות החוסמות את סינתזת או פעילות מולקלת גז זו (Abeles et al., 1992; Sexton, 1997). שני המעכבים ששימשו רבות במחקרים להבנת פעילות אתילן הם AVG (aminoethoxyvinylglycine) ו-AOA (aminooxyacetic), שנמצאו כמעכבים את האנזים ACC synthase שמעורב בייצור האנדוגני של אתילן. שתי תרכובות אלו גורמות לירידה בייצור אתילן, אך לא לביטולו המוחלט. שימוש בתרכובות אלו גרם לירידה בתגובה לאתילן בצמחים שונים, כמו ירידה בנשירת הפרי בתפוחים, עיכוב בהבשלת פירות קיווי, איחור פריחה במשפחת הברומליים.

לאורך היסטוריית מחקר פעילות האתילן, דווח על מספר מעכבי חישת אתילן כדוגמת CO_2 , שרמות גבוהות שלו יכולות לעכב תגובה לאתילן (Abeles et al., 1992). מנגנון פעולתו אינו ידוע לגמרי ויש גרסאות התומכות בכך שהוא מעכב תחרותי לאתילן על אזור הקישור ברצפטור. מאידך ישנו פרסום בו מדווח כי רמות גבוהות של CO_2 גרמו לעיכוב ייצור אתילן גם כאשר הרצפטורים היו תפוסים, כביכול, על-ידי מעכב אחר שידוע שהוא נקשר ישירות לאתר הפעיל ברצפטור (Wild, 2003). וישנם מחקרים המראים עלייה בייצור אתילן כתוצאה מיישום CO_2 (Philosoph-hadas et al., 1986; Kenigsbuch et al., 2007). במקרים מסוימים נמצא שעכוב על-ידי CO_2 לא היה יעיל או רעיל. מעכבי חישת נוספים ידועים הם NBD (2,5-Norbornadiene), שמעכב תהליכי הזדקנות והבשלה תלויי אתילן, אך אינו בשימוש כתוצאה מדרישת נוכחות מתמשכת שלו על מנת לקבל עיכוב משמעותי וכתוצאה מפעילות מסרטנת אפשרית, ו-STs (silver thiosulfate), המכיל יוני כסף שכנראה מתחרים עם יוני הנחושת על הקישור ברצפטור לאתילן ועל-כן מפחית את רגישות הרקמה לאתילן אנדוגני וחיצוני. השימוש בהם נעשה בעיקר בתוצרת לא-אכילה, כמו הארכת חיי המדף של פרחים, כתוצאה מרעילותו לסביבה ולבעלי-חיים. ועל-כן, השימוש ב-STs מצריך נוהל קפדני לסילוק שאריותיו ולמרות יעילות פעילותו מתקיים חיפוש אחר חומרים יעילים ולא-מזהמים אחרים (Abeles et al., 1992; Sexton, 1997; Binder and Bleeker, 2003; Lichter et al., 2006).

אחד ממעכבי חישת אתילן הנפוצים כיום הוא 1-MCP (1-methylcyclopropene), מבנהו דומה למבנה מולקולת האתילן ועל-כן הוא מעכב תחרותי על הקישור לרצפטור של אתילן. השימוש בו אטרקטיבי במיוחד הודות להיותו חומר נדיף לא-רעיל שלא משאיר שאריות, פעילותו לאורך זמן מתקבלת גם במתן ריכוזים נמוכים. השפעת פעילותו משתנה בין היבולים השונים, הן מבחינת זמן נתינת החומר וריכוזו והן מבחינת משך ההשפעה והתגובה הרצויה. 1-MCP נקשר לרצפטור של אתילן ומונע ממנו לעבור שינוי למצבו הלא-פעיל, כך שתגובת אתילן מעוכבת ובנוסף נמנעת האינטראקציה בין הרצפטור לליגנד הטבעי שלו, לאתילן אנדוגני או חיצוני (Binder and Bleeker, 2003). תחת תנאי טמפ' ולחץ סטנדרטיים, אפיניות הקישור של 1-MCP אל הרצפטור הוא פי 10 יותר גבוהה בהשוואה לאתילן (Serek, 1995; Blankenship and Dole, 2003), ובטמפ' נמוכות יותר יש צורך במתן ריכוזים גבוהים יותר של 1-MCP ובמשך זמן חשיפה ארוך

יותר כתוצאה מהירידה באפיניות הקשירה. בפירות העגבניה, טיפול עם 1-MCP גרם להאטה בהבשלה, לעיכוב בייצור אתילן, לירידה בפעילותם של אנזימים הידרוליטיים שונים כמו PG וצלולאזות, להאטה בהתרככות הפרי ולקבלת תוצאות פחות חיוביות מבחינה מסחרית כמו פגיעה בייצור הארומה, עלייה בחומציות והסוכר ועלייה ברגישות לתקיפת פתוגנים. הטיפול עם 1-MCP בתוצרת חקלאית שלאחר הקטיף צריך להינתן יחד עם ההתחשבות במטרה לקבלת הבשלה טובה ואחידה, ולכן יש לשים דגש במתן הטיפול על מצב ההבשלה של הפרי (ידוע שישנם הבדלים מבחינת ההשפעה של 1-MCP בין פרי ירוק של עגבניה לפרי אדום), זמן נתינת הטיפול וטמפי הסביבה בו הוא מתרחש (Blankenship and Dole, 2003).

1.6 שינויים ביוכימיים ומולקולרים הקשורים בתהליך הנשירה

תהליך הנשירה מלווה במגוון רחב של שינויים בביטוי ובפעילות של מספר אנזימים הידרוליטיים הקשורים להפרדת התאים באזור הניתוק כמו אנדוגלוקאז, פוליגלקטורונאז, חלבוני הגנה מפני תקיפת פתוגנים, אקספנסיין (Osborne, 1989; Roberts et al., 2002). בעבודה זו אתמקד בדגם הביטוי של מספר גנים המשתייכים לשלוש משפחות שונות: endo- β -1,4-glucanase (EGase), Polygalacturonases (PG) ו-Xyloglucan Endotransglycosylase (XET).

1.6.1 משפחת endo- β -1,4-glucanase (EGase)

אחת מקבוצות האנזימים הקשורה להשתנות הקסילוגלוקון היא משפחת ה-endo- β -1,4-glucanase (Brummell et al., 1997). אנזימים אלו, הקרויים גם צלולאזות (cellulases) מזרזים את האנדו-הידרוליזה של הקשרים β -1,4-glucan. אף על-פי שהסובסטרטאט(ים) של אנזימים אלו אינם מוגדרים בוודאות, מועמד אפשרי הוא השלד β -1,4-glucan של xyloglucan. פעילות זו יכולה לתרום להרפיית דופן התא במהלך הארכת התאים ולדגרדציה הקשורה בתהליכים פיזיולוגיים שונים כמו נשירת איבר ווהתרככות במהלך הבשלת פירות. בעגבנייה, משפחת אנזימים זו מקודדת על-ידי שמונה גנים, אשר חלקם מבוקרים היטב ומתאפיינים בביטוי ספציפי לרקמה. עם זאת, הפעילות הספציפית של כל איזופורם מהצלולאזות השונות אינו ידוע מעבר למיקומו ברקמה או באיבר המסויים בצמח (Catala et al., 1997; Rose et al., 1997). ה-cDNA של Cel1 ו-Cel2 שובט לראשונה מספריית cDNA מפרי עגבנייה בשל (Lashbrook et al., 1994; Rose et al., 1997). למרות ששתי הצלולאזות בעלות משקל מולקולרי דומה ולשתיהן יחידות חוזרות שמורות (דומיינים) של חומצות אמינו בצמחים וב-EGases מיקרוביאליים, ישנה זהות של 50% בלבד מבחינת חומצות אמינו בין Cel1 ו-Cel2 (Lashbrook et al., 1994). בניגוד לצורת הביטוי הדומיננטית של EGase מסויים באזורי הניתוק של פירות האבוקדו והשעועית, בפירות מבשילים ואזורי ניתוק של עגבניה יש צבירה הן של Cel1 והן של Cel2 (Lashbrook et al., 1994). ביטוי הצלולאזות במהלך התפתחות פרי העגבניה הינו ארעי, מאחר ורמת Cel1 יורדת במהלך ההבשלה בעוד שרמת הביטוי של Cel2 עולה, אך ישנה חפיפה בצבירת

Lashbrook et al., 1994; Rose et al.,) שניהם בזמן התפרצות ייצור האתילן בתחילת ההבשלה (1997). דיכוי ביטויים על-ידי רצף antisense לא גרם להשפעה כלשהי בהבשלת והתרככות הפרי, מה שהוביל למסקנה שתפקידם חופף ו/או הם מהווים חלק ממערכת מטבולית מורכבת יותר (Giovannoni, 2001). בנוסף, דיכויים בעוקצי עלי עגבנייה לא השפיע על כושר ההתנתקות של העלים (Jiang CZ, 2008). עיקר ביטוי Cel3 הוא ברקמות הווגטיביות של הצמח הגדלות במהירות, אך אינו תלוי בקרת הורמונים שונים כמו אוקסין, אתילן או גיברלין. הצלולאז Cel4 מבוטא ברמות גבוהות במהלך שלבי ההתפתחות של עמוד העלי, באזורי ההארכה של היפוקוטילים ובעלים צעירים. רמות נמוכות שלו נמצאו גם בפירות צעירים גדלים והיעדר ביטוי בלט במהלך התפתחות הפרי והבשלתו (Brummell et al., 1997a; Rose et al., 1997). ביטוי Cel5 אובחן בעיקר בהקשר לנשירת פרחים, אך נראתה גם רמת ביטוי מסויימת באזור ניתוק של עלים ופירות, ורמתו מבוקרת בהתאם לטיפול אוקסין (Del Campillo and Bennett, 1996;) Cel6 מתבטא בעיקר בפרחים לפני הנשירה, ביטוי עולה מעט במהלך ההיחלשות של דופן התא ויורד בזמן תהליך הנשירה (Del Campillo and Bennett, 1996;) Cel7 מתבטא בייחוד ברקמות ווגטיביות ובשלבי גדילה מוקדמים של הפרי, אך ביטוי לא נראה במהלך ההתפתחות, שבירת הצבע והבשלת פרי העגבנייה (Catala et al., 1997; Rose et al., 1997; Catala et al., 2000). הוא מכיל אזור C-טרמינל הדומה לאתרי קשירת פחמימות בבקטריות, ובעבודות *in vitro*, הוא היחידי במשפחה זו שתועד כנקשר לצלולוז גבישי (Urbanowicz et al., 2007).

1.6.2 משפחת (PG) Polygalacturonases

במקביל לצלולאזות, משפחת אנזימים זו מהווה את אחד משלבי המפתח בפירוק והיפרדות התאים, ותפקידה הוא בפירוק הפקטין בלמלת הביניים (Taylor and Whitelaw, 2001). אך בניגוד לפעילות ה-EGases, שמפוזרים לאורך כל אזור הניתוק, פעילות ה-PG מוגבלת לחלק הדיסטלי של אזור הניתוק (Hadfield and Bennett, 1998). פעילותם נראתה ברקמות שונות בצמח – פירות מבשילים, שורשים ראשוניים, אזורי נשירה של עלים, פרחים ופירות, אזורי התבקעות תרמילים, וברקמות נגועות בפתוגן (Hong and Tucker, 1998). על-פי עבודות קודמות ידוע שישנם PGs הספיציפיים לתהליך הנשירה (TAPG) הנבדלים מאותם PGs הקשורים לאירועי היפרדות תאים אחרים בצמח, כמו הבשלת פירות (Hong and Tucker, 1998; Taylor and Whitelaw, 2001). ישנם 3 איזופורמים שונים של TAPG הקשורים לנשירה בעגבנייה, TAPG1, TAPG2 ו-TAPG4 עם הומולוגיה גבוהה ביניהם (80-90% ברמת הנוקלאוטידים) כאשר התעתיקים שלהם קצרים יותר בהשוואה לאנזימים הקיימים בפרי וחולקים זהות של 50% בלבד מבחינת הרצף (Gonzalez-Carranza et al., 2002). תעתיקי איזופורמים אלו מצטברים באזורי נשירה של פרחים ועלים, אך לא נראתה הצטברות שכזו בגבעולים, עוקצי העלים, מאבקים או הפרי בשל (Kalaitzis et al., 1997a; Hong and Tucker, 1998). ביטוי TAPGs השונים מצביע

על פרופיל ביטוי נפרד הן מבחינת הזמן והן מרחבית, מאחר והצטברות ההעתקים של TAPG4 ו-1 TAPG2 באזור הנשירה מתרחשת הרבה יותר מוקדם בהשוואה להצטברותו של TAPG1. כמו-כן גם ביטוי זה התאפשר על-ידי טיפול אתילן ועוכב כתוצאה מחשיפה לאוקסין (Hong and Tucker, 1998; Gonzalez-Carranza et al., 2002). השתקת הגנים על-ידי שימוש בשיטת Virus Induced Gene Silencing (VIGS) בעלים של עגבנייה גרמה לעיכוב תהליך הנשירה ולהגדלת כוח הניתוק הנדרש באקספלנטים שטופלו על-ידי אתילן (Jiang CZ, 2008).

1.6.3 משפחת Xyloglucan Endotransglycosylase (XET)

תפקידה של משפחת אנזימים זו היא בהחשת החיתוך של הפולימר xyloglucan וחיבור הקצה המחזר, שנוצר כתוצאה מחיתוך זה, למולקולת xyloglucan אחרת. על-כן, XET מהווה אמצעי פוטנציאלי לשחרור מבוקר של דפנות התאים במהלך גידולם על-ידי סידור מחדש של הקשרים בין ה-xyloglucan שבין סיבי הצלולוז. האנזים כנראה גם מזרז ריאקציות הרכבה (grafting) מולקולריות הדרושות להחדרת מולקולות של xyloglucan לתוך דופן תא קיימת, ובכך מתחזק ושומר על עובי ושלמות הדופן. פעילותו נראתה ברקמות הגדלות במהירות כמו עלים וגבעולים, אך גם ברקמות ווגטטיביות ופירות מבשילים. גנים מסויימים שלו נמצאו משופעלים בתגובה להורמונים אוקסין, גיברלין ו-Brassinosteroids (BRs). בעגבנייה אופיינו עד כה חמישה גנים השייכים למשפחה זו: tXET-B1 ו-tXET-B2, בעלי הומולוגיה גבוהה ומתבטאים בפרי מבשיל; Le-BR1, המבוקר על-ידי ההורמון BR; LeEXT(EXT3) המתבטא באפידרמיס האפיקלי של ההיפוקוטיל ונוצר בעקבות רמות אוקסין גבוהות; LeXET2 המתבטא באזורים הלא-מתארכים של ההיפוקוטיל ורמתו יורדת בתגובה למתן אוקסין (Catala et al., 2001; Chanliaud et al., 2004). עלייה בביטוי הגן XET-BR1 נראתה באזור ניתוק מפרק העוקץ של פרחי עגבנייה מספר שעות לאחר הסרת מקור האוקסין (הסרת הפרחים) ונמנעה כתוצאה מיישום 1-MCP (Meir et al., submitted).

1.7 מטרת העבודה

מטרת העבודה העיקרית הייתה מעקב אחר שינויים עונתיים בנשירה וביטוי של גנים באתרי הניתוק של עגבניות צ'רי באשכולות בהשפעת טיפולים לאחר הקטיף ובמהלך האחסון לשם כך נבחנו המטרות הספציפיות הבאות:

1. השפעת שינויים עונתיים על הנשירה ואפיון סוג הנשירה לפי אתרי הניתוק.
2. בחינת ההשפעה של טיפולי האוקסינים ושל מעכב פעולת האתילן 1-MCP לאחר הקטיף על נשירת הפרי ואיכותו.
3. הבנת דגם הביטוי של שבעה גנים השייכים למשפחות האנזימים ההידרוליטיים פוליגלקטרונאזות, צלולאזות ו-קסילוגלוקן אנדוגליקוזילאז הכולל: אנליזת ביטוי לזיהוי ספציפיות לסוג רקמת הניתוק, אפיון קינטי של ביטויים כתוצאה משינויים עונתיים וביטויים כתגובה ליישום אוקסין ו-1-MCP.

2. שיטות וחומרים

2.1 מדדים לבדיקת איכות הפרי

2.1.1 מקור הפרי –

הניסויים השונים נערכו בעגבניות צירי אשכולות מזן 1335 (שירן, הזרע גינטיקס, ישראל), אשר גודלו בבתי רשת בשלושה משקים שונים: משק דורון שבתאי ממושב שדה משה, משק יפתח גיל מכמהין (שתיל מורכב), ומשק יונתן רותם ממושב עין יהב. האשכולות נקטפו כחלק מקטיף מסחרי באיכות יצוא, כאשר כל אשכול הכיל מינימום 6 פירות וממוצע של 9 פירות. האשכולות האופייניים היו בעלי פירות דיסטלים (מרוחקים ממרכז השזירה) בגוון ירוק, פירות מרכזיים בגוון כתום ופירות פרוקסימליים (מקורבים למרכז הגבעול) בגוון אדום בהיר. לאחר הקטיף הפרי הובל במכונת מסחרית ממוזגת בארגזים של 7-14 ק"ג למעבדה במכון וולקני. לפני האחסון, הוסרו פירות ירוקים, סדוקים ורקובים. הפרי נארז כמפורט בכל ניסוי.

2.1.2 בדיקת נשירת הפרי –

בדיקת נשירת הפירות התבצעה ביום הקטיף ובמהלך האחסון כל 6-7 ימים (ניסויים 2, 5) או כל 2-3 יום (ניסוי 6). הבדיקה נערכה על-ידי ניעור ידני של אשכולות הפרי במאונך למשטח העבודה. במהלך הבדיקה נספרו סך הפירות על כל אשכול, סך הפירות שנשרו וסיווג הנשירה על-פי איזור הניתוק ממנו הפרי נשר, כאשר הסימון באות J (joint) ניתן לנשירה מאזור מפרק העוקץ, בעוד שנשירה מאזור העוקץ סומנה באות P (pedicel). בנוסף, צוינו הפירות הנגועים בריקבון ופירות סדוקים.

2.1.3 בדיקת מוצקות –

התקדמות הבשלת הפרי והשפעת הטיפולים השונים על מהלך התרככות הפרי במהלך האחסון נבדקה על מדגם של 20 פירות. הבדיקה התבצעה באמצעות מכשיר ה-FirmtechII (BioWorks U.S.A Ins.), אשר מפעיל כוח דחיסה רציף על הפרי הבודד עד להתנגדות מקסימלית של 350 גר', תוך כדי מדידת קוטר הפרי ביחידות של מ"מ. נתוני המוצקות מתקבלים ביחידות של gr/mm.

2.1.4 בדיקת צבע –

השתנות צבע הפרי במהלך האחסון וכתוצאה מהשפעת הטיפולים השונים נמדדה ביום הקטיף ובסיום הניסוי (ניסויים 2, 5) או לאחר 8 ימי אחסון ו-14 ימי אחסון (ניסוי 6) על מדגם אקראי של כ-20 פירות מכל טיפול. בדיקת צבע הפרי נעשתה ע"י כרומה-מטר (Minolta CR-300 Japan) בערכים של זווית הצבע (h°) של הפרי בסקאלת LCh° כאשר פרי ירוק מתאפיין בזווית צבע גבוהה מ- 100° בעוד פרי אדום מצוי בטווח של 40° - 50° .

2.1.5 בדיקת TSS (סוכר) –

אחוז הסוכר המיוצג על ידי בדיקת כלל המוצקים המומסים בפרי נמדד על ידי רפרקטומטר דיגיטלי (Atago PR-1, Japan). בדיקת הסוכר התבצעה על מדגם של 15 פירות לחזרה, סך הכל 3 חזרות לטיפול כאשר זמן הבדיקה היה ביום הקטיפה בלבד (ניסוי 2) או ביום הקטיפה ולאחר 8 ימי אחסון ו-14 ימי אחסון (ניסוי 6). בניסוי 5 בדיקת הסוכר נעשתה במתכונת של 2 אשכולות שלמים כמדגם לחזרה, סך הכל 3 חזרות לטיפול כאשר זמן הבדיקה היה ביום הקטיפה ובסיום הטיפול. מדגם הפירות הוכנס לשקית שהכילה שקית סינון פנימית (Seward Stomacher 400) ונכתשה על-ידי מכשיר הסטומכר (Circulator 400 Lab System) במשך 60 שניות ב-260 סל"ד הבדיקה נעשתה על ידי הנחת טיפת מיץ מסונן על עינית המכשיר לאחר כיוולו עם מים מזוקקים.

2.1.6 בדיקת חומצה -

בדיקת החומצה נעשתה במקביל לבדיקות הסוכר. לשם ביצוע בדיקת החומצה, נלקחה כמות של 1 מ"ל מתסנין מיץ העגבניות של המדגם והתווספה לכמות של 40 מ"ל מים מזוקקים. אחוז החומצה מתקבל על-ידי ביצוע טיטרציה אוטומטית בנוכחות NaOH (0.1 N) עד ל-pH 8.2 (Processor 678 EP/KF Metrohm). אחוז החומצה חושב כאקויוולנטים של חומצה ציטרית על פי הנוסחה הבאה:

$$V \times F \times Mw / 100 = \text{חומצה (\%)}$$

V - מייצג את נפח NaOH 0.1N (מ"ל) שמטטר את הדגימה עד pH=8.2.

F - פקטור קליברציה של המכשיר (0.8883).

Mw - משקל מולקולרי של חומצה ציטרית 192.13 gr/M.

100 – 2 מ"ל תסנין מיץ העגבניות.

2.1.7 בדיקת כוח הניתוק –

חוזק כוח הניתוק של הפרי משיזרת האשכול נבדק על דגימת 2 פירות מרכזיים מ-15 אשכולות אקראיים ביום הקטיפה. הערך המקסימלי שהתקבל במהלך הבדיקה במכשיר ה-Digital Force Gauge (Lutron FG-5000A, Taiwan) נרשם ביחידות של ניוטון (N).

2.2 טיפולים

2.2.1 תנאי האחסון –

הפרי אוחסן בטמפ' של 12°C ובלחות יחסית בטווח של 90-95%, כמפורט בכל ניסוי. כל טיפול כלל 3 נספים שהכיל 2 ק"ג פרי, אלא אם צוין אחרת, אשר סודרו אקראית בתוך ארגזי פלסטיק מאווררים בתוך חדר האחסון האחד על-גבי השני. נתוני הטמפרטורה והלחות היחסית בחדרי האחסון נרשמו ע"י אוגר נתונים (Hygrolog, Rotronic AG, Bassersdorf, Switzerland).

2.2.2 טיפול עם משטח –

יעילות הריסוס באוקסינים הוגברה באמצעות המשטח TRITON X-100 (SIGMA), אשר התווסף בריכוז של 0.025% לליטר מים. הריסוס נעשה על-גבי השזרות ועלי הגביע של כל אשכול ואשכול, כשמספרם משתנה לפי כל ניסוי. לאחר ייבוש באוויר האשכולות נארזו לתוך נספקים של 2 ק"ג והועברו לאחסון.

2.2.3 טיפול עם אוקסין –

טיפול עם האוקסין TPA נעשה באמצעות התכשיר MAXIM® (Chimac-Agriphar S.A., Belgium), אשר טבלית אחת של 10 גר' מכילה 1 גר' חומר פעיל (10%) TPA-3,5,6-TPA, שריכוזו הסופי השתנה בין 25, 50 ו-100 ח"מ בהתאם לטיפולים השונים הוכן מתמיסת אס אשכול ואשכול, כשמספרם משתנה לפי כל ניסוי. לאחר ייבוש באוויר האשכולות נארזו לתוך נספקים של 2 ק"ג והועברו לאחסון.

טיפול עם האוקסין NAA, (Alphatop® Fine Agrochemicals, England), הוכן כתמיסה בריכוז סופי של 50 ח"מ ובתוספת משטח TRITON התבצע ריסוס על שיזרות ועלי הגביע של כ- האשכולות השונים, כשמספרם משתנה לפי כל ניסוי. לאחר ייבוש באוויר האשכולות נארזו והועברו לאחסון.

2.2.4 טיפול עם 1-MCP –

1-MCP (SmartFresh™, Rohm and Hass Co., Philadelphia, PA), מסופק ע"י רימי, ישראל) ניתן בריכוז סופי של 0.5 ח"מ לתוך מכל אטום בנפח של 200 ל'. התכשיר האבקתי הומס במים חמים (40 מ"צ) במבחנה אשר הונחה בתחתית המיכל בנוכחות מיני-מאוורר לשם פיזור אחיד, והמכל נאטם מייד עם פתיחת המבחנה. ריכוזו של החומר במיכל נמדד על-ידי גז כרומטוגרף בדגימות אוויר של כ- 10 מ"ל שנלקחו במזרק לאחר 19-22 שעות ממתן הטיפול. הגז כרומטוגרף מסוג Varian 3300 (Polo Alto, CA) מצויד בגלאי יוניזצית להבה (FID) וקולונה stainless steal, packed with 20% Carbowax 20M, 80-100 mesh, הגז הנושא היה הליום. ריכוז 1-MCP חושב בהשוואה לסטנדרט של 1 ח"מ. לאחר כ- 22 ש' מזמן סגירת המיכלים, הם נפתחו והפרי עבר לאחסון בארזי פלסטיק, כאמור בסעיף (סעיף תנאי האחסון).

2.2.5 ניתוח סטטיסטי –

ניתוח התוצאות בוצע על ידי תוכנת JMP® 5.1. חישוב המובהקות הסטטיסטית נעשה בעזרת Student's t-test וגם בעזרת ניתוח שונות דו-גורמי. על מנת לבחון את תוצאות מבחן השונות, בוצע post-hoc test מסוג Tukey-Kramer HSD. רמת המובהקות בכל המבחנים ה"ל הייתה 95%. בפרק התוצאות מתוארת המובהקות של תוצאות הניסויים ב- Tukey-Kramer HSD, אלא אם כן מצוין אחרת.

2.3 שיטות מולקולריות

2.3.1 הפקת RNA –

הפקת RNA נעשתה על פי Chomeczynski and Sacchi (1987), שהותאמה למקטעי גבעול באשכולות עגבניות צירי על-ידי Beno-Mualem et. al. (2004). דגימות נלקחו ביום הקטיף ובמועדים שונים במהלך האחסון ב-12 מ"צ. אתרי הניתוק במפרק העוקץ או קצה העוקץ נחתכו באמצעות סקלפל כשני מ"מ משני צידי אזור הניתוק. בניסויים 5,6 נלקחה גם דגימה מרקמת המצעית שעל הפרי. כל דגימה למיצוי RNA הכילה 10 מקטעים שנלקחו אקראית מאשכולות שונים של כל קבוצת טיפול וביקורת. המקטעים הוכנסו למבחנות אפנדורף של 2 מ"ל, שהוקפאו בחנקן נוזלי והוחזקו ב-80°C עד להפקת ה-RNA. כל דגימה למיצוי הושמה בתוך נייר כסף וריסוק ראשוני של הרקמה נעשה בעזרת פטיש. לאחר מכן הרקמה נכתשה בתוספת חנקן נוזלי בעזרת עלי ומכתש עד לקבלת אבקה אחידה. האבקה הורחפה במבחנה שהכילה 3-5 (v/w) תמיסת דנטורציה (שהוכנה מסי' שעות לפני ההפקה) והורכבה מסודיום ציטראט (25 mM, pH 7.0), גואנידיום תיוציאנט (4M), סרקוזיל (0.5%) ובטא-מרקפטואתנול (1%). לאחר מכן, הוספו בשלבים סודיום אצטט (0.1V of 2M, pH 4.0), פנול (Amresco®) רווי בנפח אחד של 50 mM חומצה ציטרית, pH 6.6, וכלורופורם:איזואמילאלכוהול (0.2V of 24:1, v:v) לאחר כל שלב בוצע טלטול במכשיר הוורטקס. לאחר סרכוז בצנטריפוגה מקוררת (4°C) ב-5,000 g למשך 15 דקות. למקטע העליון בוצע מיצוי חוזר על ידי הוספת סודיום אצטט, פנול, וכלורופורם:איזואמילאלכוהול באותם נפחים וריכוזים כפי שצויין לעיל מלבד בדוגמאות מסויימות*. לאחר הפרדה של המקטע העליון הוסף לו נפח שווה של כלורופורם:איזואמיל אלכוהול. בוצע שוב טלטול בוורטקס וסרכוז בצנטריפוגה כמצויין לעיל. המקטע העליון הועבר למבחנה חדשה, שלה הוסף נפח אחד של איזופרופנול קר ולאחר אינקובציה בקרח למשך 15 דקות הדגימות סרכוזו בצנטריפוגה מקוררת ב-10,000 g למשך 15 דקות. המשקע הורחף במים (0.5 v/w) ולתרחיף התווסף ליתיום כלוריד (1/3V, 8M). הדגימות הושמו בתוך קרח לאינקובציה לילית במקרר. למחרת הדגימות סרכוזו בצנטריפוגה מקוררת ב-10,000 g למשך 15 דקות. המשקע, לאחר ייבוש באמצעות זרם אוויר, נשטף ב-0.5 מ"ל ליתיום כלוריד (2M), והועבר סרכוז בצנטריפוגה מקוררת ב-10,000 g למשך 5 דקות, שלאחריו המשקע שעבר ייבוש נוסף נשטף באתנול (75%). לאחר מכן, המשקע עבר ייבוש בשלישית למשך מספר דקות והומס ב-50 µl מים DEPC מעוקרים (Diethyl Pyrocarbonate). הדוגמאות נשמרו בטמפי' של 80°- מ"צ עד השימוש.

* הדוגמאות שבהם לא בוצע מיצוי חוזר הינן: רקמת מפרק העוקץ לאחר 6 ימי אחסון (חזרה 2) רקמת העוקץ לאחר 13 ימי אחסון (חזרה 1), בטיפול MCP, והטיפול המשולב (אוקסין+MCP). רקמת העוקץ (חזרה 2): זמן אפס, 6 ימי אחסון (הביקורת, MCP, TPA, MCP+TPA).

2.3.2 הפרדת RNA על גבי ג'ל אלקטרופורזה לבדיקת שלמות RNA –

הפרדת RNA נעשתה באמצעות אלקטרופורזה על גבי ג'ל 1% אגרוז, שהכיל-

1 גר' אגרוז מומס בתוך 100 מ"ל של TAE X 0.5, אשר הרכבו הוא כדלקמן – 100 מ"ל מים מזוקקים פעמיים + 1 מ"ל TAE X 50). מכל מבחנה נלקחה דגימת RNA בנפח של 4 μ l לתוך מבחנת אפנדורף של 0.5 מ"ל והוספו לה 2 μ l של בופר הטענה (6x Loading Dye Solution, MBI, Fermentas). לאחר אינקובציה ב-65 מ"צ למשך 10 דק' התבצעה הרצת הג'ל במתח קבוע של 100 mV למשך כ-25 דקות. בגמר ההרצה הג'ל הועבר לאמבט עם אתידיום ברומיד (EtBr) (הוכן ע"י תוספת של 2.5 μ l מתמיסת אם של 10 mM לתוך אמבט של 200 מ"ל מים מזוקקים) למשך 10 דקות. לאחר מכן, הג'ל נשטף במים סטריליים במשך מספר שניות. הג'ל צולם במכשיר Imagemaster VDS (Pharmacia Biotech).

2.3.3 כימות ה-RNA –

לאחר הפקת ה-RNA נלקחה דוגמא של 6 μ l ונמהלה ב-600 μ l מים (DEPC) למדידת ריכוז ה-RNA (μ g/ μ l). הדוגמה הועברה לקיווטת קוורץ ונקראה בספקטרופוטומטר (UV/Visible spectrophotometer, Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, Biochrom Ltd., Cambridge, England). באורכי גל של 260/280 nm. ריכוז ה-RNA הממוצע להפקה היה 1.0 μ g/ μ l והיחס הממוצע של ה-O.D. ב-260/280 nm היה 1.5. אך, הכימות ברובו נעשה באמצעות מכשיר ה-NanoDrop (NanoDrop3.0.0 USA) Technologies Inc. קריאת הנתונים נעשתה על-ידי הנחת 1 μ l מכל דוגמה על עינית המכשיר, לאחר כיוולו על-פי 1 μ l ממים DEPC מעוקרים (Diethyl Pyrocarbonate).

2.3.4 ניקוי RNA משאריות DNA –

לאחר ביצוע כימות ה-RNA, עברו הדוגמאות השונות ניקוי משאריות DNA, על-מנת להבטיח רמת ניקיון גבוהה להמשך האנליזה Real-Time PCR, בעזרת הקיט - (Cat. No. #9pim610, RQ1 RNase-Free DNase (Promega) לפי הוראות היצרן.

2.3.5 סינתזת cDNA –

לצורך הכנת cDNA נלקח 1 μ g מדוגמת ה-RNA הנקייה משאריות DNA. הריאקציה נעשתה בעזרת הקיט EZ-first strand cDNA synthesis (Biological Industries, Bet Haemek, Israel) יחד עם תערובת הפריימרים Oligo(dT)₂₀ primer : random primers (v:v) 1:1 על-פי הוראות היצרן. הדוגמאות נשמרו בטמפי של 20- מ"צ עד השימוש.

2.3.6 אנליזת ביטוי של גנים בשיטת Real-Time PCR –

קביעה כמותית של רמת הביטוי של הגנים *Cel5* ו-*Cel8* בטיפולים שונים נעשתה ע"י שימוש בשיטת ה-Real Time PCR. ה-cDNA שסונתז מכל דוגמא שימש כתבנית לריאקציה. ריאקציות Real Time PCR עבור הניסויים שבחנו את השפעת הטיפולים השונים על הנשירה נעשו במכשיר Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia). נבחר זוג תחלים (רצפים בטבלה 2) שאינו יוצר קיפול וצימוד ביניהם (Primer dimer). הריאקציה נעשתה במבחנות של 0.1 מ"ל (Thin-Wall tube strips, Corbett Research, AUS) שכללו 2 μ l של דגימת cDNA, 5 μ l של תערובת ריאקציה (Absolute QPCR Syber-green Amplification Kit, ABgene, Surrey, UK), תחלים בריכוז סופי של 2.5 μ M ומים מזוקקים פעמיים סטריליים להשלמת הנפח ל-10 μ l. הערכה הנ"ל מכילה את אנזים ההגברה (Amplification), נוקליאוטידים וכן את החומר הפלורוסנטי Syber-green הנקשר ל-DNA דו-גדילי שנוצר במהלך הריאקציה ומאפשר לבחון את קצב היווצרות ה-DNA במערכת. כגן נרמול שימש rRNA (18S) עם cDNA מהול ביחס של 1:5,000 וריכוז תחלים של 50 μ M אשר בו מתקבל תוצר אחד אשר אינו מגביל את קצב הריאקציה.

חישובי ערכי RQ (Relative Quantification) במכשיר Corbett Research נעשו לפי שיטת $\Delta\Delta C_T$ המפורטת באתר <http://www.gene-quantification.info>. ערך ה- C_T חושב על סמך הצבת הסף (Threshold) לערך קבוע של 0.05. לכל ריאקציה נבחרה דוגמא מכיילת (Calibrator), שהיא הדוגמא שלא עברה כל טיפול או זמן אחסון כזה או אחר. בניסויים שערכנו נבחרו הדוגמאות שמייצגות את הרקמות השונות ביום הקטיף (Time 0). ערך ה- ΔC_T חושב ע"י החסרת ערך ה- C_T של הגן הנבדק (GOI) מערך ה- C_T של גן הביקורת (rRNA (18S) Normalizer) לכל דוגמא. מתוצאות ה- ΔC_T של הדוגמאות הוחסרה תוצאת ה- ΔC_T של הדוגמא המכיילת (Calibrator) (חישוב $\Delta\Delta C_T$). ה- $\Delta\Delta C_T$ של הדוגמא המכיילת קיבל את הערך 0. הביטוי היחסי של כלל הדוגמאות חושב לפי הנוסחה $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ כאשר הדוגמא המכיילת (Calibrator) קיבלה את הערך 1. התוצאות מוצגות כ- $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ Relative Concentration, והן מייצגות את רמת הביטוי של הגן הנבדק ברקמות השונות יחסית לביטוי של הדוגמא המכיילת (טבלה 2). יעילות הריאקציה נבדקה לפני תחילת הניסויים ובמהלך הניסויים הן ע"י עקומת כיוול שהראתה יעילות של 1 (Efficiency) ושיפוע של -3.3 (slope) והן ע"י הרצת דוגמא אשר שימשה כביקורת ונתנה את אותם ערכי C_T . כל ריאקציות Real-Time PCR נערכו ב-3 חזרות כאשר הנתונים המוצגים הם ממוצע של 3 החזרות הללו. בכל ניסוי יש 2 חזרות שמייצגות 2 הפקות RNA שנעשו בזמנים שונים על אותן דוגמאות.

טבלה 1: דוגמת חישוב ערכי RQ (Relative Quantification) לפי שיטת $\Delta\Delta C_T$ לתוצאות של ניסוי ב- Real Time PCR בשלוש רקמות שונות בזמן 0.

Treatment	C_T GOI	C_T Norm.	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{(-\Delta\Delta C_T)}$
Joint t= 0*	26.63	18.83	7.79	0	1
Joint t=2	24.64	18.67	5.97	-1.82	3.54
Joint t=16	15.53	18.14	-2.61	-10.40	1351.18

Norm (Normalizer gene), GOI (Gene Of Interest)

* הדוגמא בשורה הראשונה שימשה כ- Calibrator להשוואת הביטוי היחסי.

2.3.7 אנליזת ביטוי של גנים בשיטת Semi-Quantitative PCR

קביעה יחסית של רמת הביטוי של הגנים CEL1, TAPG4, TAPG2, TAPG1 ו- XET-BR בטיפולים שונים נעשתה על-ידי שימוש בשיטת ה-Semi-Quantitative PCR. ה- cDNA שסונתז מכל דוגמא שימש כתבנית לריאקציה. הריאקציות בוצעו במכשיר T-Gradient (Biometra) בעזרת זוג תחלים נבחר (רצפים בטבלה 2) שאינו יוצר קיפול ו/או צימוד ביניהם (Primer dimer).

התחלים לכל רצף גן מבין הגנים TAPG תוכננו בעזרת תוכנת Primer3 ונבדקו בתוכנת OligoAnalyzer 3.0 שנמצאת באתר <http://www.idtdna.com>. רצף ה-XET-BR תוכנן בתוכנת OligoAnalyzer (Premier Biosoft International) AlleleID 4.0 ונבדקו בתוכנת Primer3 ו- OligoAnalyzer 3.0. הריאקציה התבצעה במבחנות דקות דופן של 0.2 מ"ל (ABgene, UK) וכללה 1 μ l של דגימת cDNA, 10 μ l של תערובת ריאקציה (ReddyMix™ PCR Master Mix, ABgene), פריימרים בריכוז סופי של 2.5 μ M ומים מזוקקים פעמיים סטריליים להשלמת נפח ל-20 μ l. תערובת הריאקציה הכילה את אנזים ההגברה (Thermoprime Plus DNA Polymerase), נוקלאוטידים וצבען אדום ReddyRUN למעקב אלקטרופורטי. גם באנליזה זו גן הנרמול היה rRNA (18S) עם cDNA מהול ביחס של 1:5000. התוכנית במכשיר ה-PCR כללה שלב התחלתי של דנטורציה ראשונית של 5 דק' ב- 95 מ"צ, לאחר מכן 3 שלבים שחזרו על עצמם בין 30-36 מחזורים כאשר בתחילה היה שלב דנטורציה של 30 שניות ב- 94 מ"צ, שלב צימוד הפריימרים (annealing) של 30 שניות בטמפ' של 60-63 מ"צ, בהתאם לכל גן וגן, ובשלב השלישי הייתה הארכת תוצר שאורכה היה 90 שניות ב- 72 מ"צ. בסופה של התוכנית היה שלב הארכה (elongation) סופי שנמשך 5 דק' ב- 72 מ"צ. תוצרי ה-PCR הופרדו על גבי ג'ל אלקטרופורזה של 2% אגרוז (Hispanagar, Spain). אימות קבלת תוצר ה-PCR של הגן XET-BR נעשה על-ידי ריצוף ה-DNA במכון וייצמן לאחר ניקוי מהגיל בעזרת הקיט Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, USA) כאשר אנליזת הריצוף בוצעה על-ידי התוכנה BioEdit Sequence Alignment Editor Version 7.0.5.3.

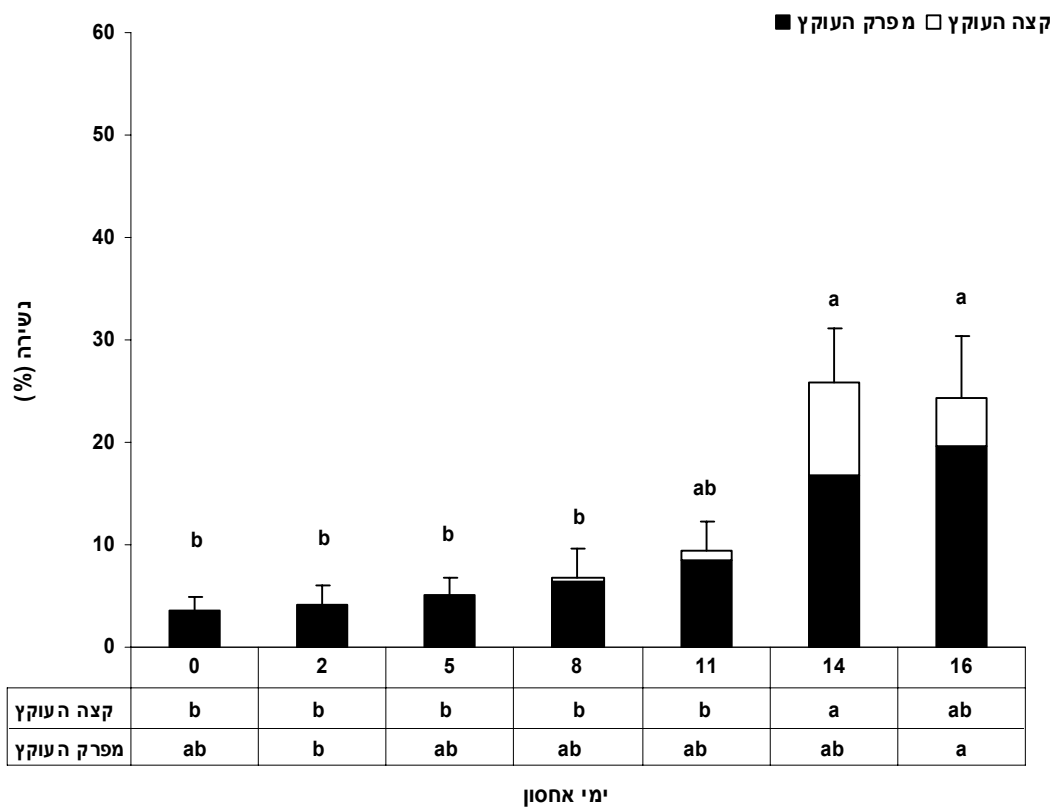
טבלה 2 : רצפי הפריימרים ששימשו בעבודה. כיווני הפריימרים מ- 5' ל-3'. הפריימרים הוכנו על ידי חברת סינתזה (Syntezza Bioscience Ltd.) ונקו ע"ג קולונה HPRP. הפריימרים נמהלו במים סטריליים לריכוז של 50 pmole/μl ונשמרו ב-80°C.

Reverse primer	Forward primer	הגן
CCTAGGAAACCACCAAGGAATTC	GTATGGTCCCGTGGTAGCTCAA	<i>Cel5</i>
CCTCCGACTTCTCCACATTATCA	GCAAGTCCCTTTCATCGTTTCT	<i>Cel8</i>
TCCGGAATCGAACCTAATTC	GCGACGCATCATTCAAATTC	rRNA (18S)
GCAGCAGCTTGACCATCAAAGG	ATGGGCAGCAGCCTGTGCTT	<i>TAPG1</i>
AGTGTTATGCCGCTGCACGGATTAGT	GAAAGTTGTCCTCATCAGGGTTCTGGT	<i>TAPG2</i>
ACCAGAAGCTCTTCCTCCAGCATT	TGGAACATCAGCTACAGAAATCGCGG	<i>TAPG4</i>
GCTCTTGTACCCCTGCCTTGG	AAACTCGTTGCTGGAAACTCTGC	<i>XET-BR</i>
GCACCGACATGTGTGTTAGG	CTTGAGGCAGCTGGAATAGG	<i>Cell</i>

3. תוצאות

3.1 מהלך הנשירה של עגבניות צ'רי באשכולות במהלך האחסון

מהלך הנשירה נבדק במהלך האחסון של פרי מקטיפ פברואר שאוחסן ב-12 מ"צ במתכונת של שלושה בלוקים המכילים 7 אשכולות כל אחד. מהתוצאות (איור 1) ניתן להבחין שהייתה עלייה משמעותית בנשירה לאחר 14 יום באחסון, וכי עד ליום 11 של האחסון הנשירה הייתה בעיקר דרך אתר ניתוק מפרק העוקץ והחל מהיום ה-14 לאחסון התגברה הנשירה דרך אתר ניתוק קצה העוקץ.



איור 1: מהלך הנשירה הכללית בקטיפ פברואר. ממוצע אחוז הנשירה לפי אזורי הניתוק לאורך ימי האחסון נבדק במהלך אחסון ב-12 מ"צ. ניתוח סטטיסטי דו-גורמי נעשה לפי מבחן Tukey-Kramer HSD בין ימי האחסון השונים על-פי כל סוג נשירה בנפרד, כאשר האותיות (a,b) על הגרף מציינות את המובהקות הסטטיסטית של הנשירה הכללית ואלו שבטבלה מייצגות את המובהקות הסטטיסטית של נשירת קצה העוקץ ומפרק העוקץ.

טבלה 1: ניתוח השונות לממוצע אחוז הנשירה על-פי סוג הנשירה.

מקור השונות	ד"ח	נשירה כללית		נשירת מפרק העוקץ		נשירת קצה העוקץ	
		סר"ס	P(F)	סר"ס	P(F)	סר"ס	P(F)
ימים	5	2.36	<0.0001	1.06	0.0176	0.63	<0.0001
חזרות	2	0.12	0.4554	0.04	0.7597	0.12	0.0409
ימים*חזרות	10	1.53	0.0311	1.01	0.2056	0.40	0.0193
שגיאה	108	7.87		7.99		1.93	

3.2 מדדי ההבשלה של עגבניות צ'רי באשכולות במהלך האחסון

מוצקות הפרי –

בדיקת המוצקות נעשתה על 20 פירות ביום הקטיף ולאחר 8 ו-14 ימים באחסון בטמפי של 12°C ובלחות יחסית של 95%. בבחינת מוצקות הפרי (טבלה 2A), מבחינים במגמת ירידה במוצקות הכללית של הפרי, כאשר מובהקות סטטיסטית מתקבלת רק בין תוצאות המוצקות של יום הקטיף ולאחר 14 ימי אחסון.

צבע הפרי –

בדיקת השתנות זוית הצבע (h°) לאורך האחסון נעשתה על 20 פירות בכל חזרה בכל נקודת זמן. בבחינת השתנות הצבע לאורך האחסון נראית מגמת ירידה בממוצע השתנות הצבע לאורך האחסון, אם כי אין מובהקות סטטיסטית.

חומצה / TSS –

הבדיקה התבצעה על תסנין ממדגם של 15 פירות לכל חזרה לכל נקודת זמן, החל מיום הקטיף ולאחר 8 ו-14 ימי אחסון בחדר הקירור בטמפי של 12°C ובלחות יחסית של 95%. אחוז הסוכר נמוך יותר לאחר 8 ימי אחסון בהשוואה ליום הקטיף, בעיקר בגלל אחת החזרות שיתכן והכילה אחוז גבוה יחסית של פרי בדרגת הבשלה מוקדמת יותר (תוצאות לא הוצגו) ולאחר 14 ימי אחסון נראית עלייה באחוז הסוכר בהשוואה ליום הקטיף. לגבי החומצה נראתה עלייה באחוז החומצה בפרי לאחר 8 ימי אחסון ורמה זו נשמרה גם לאחר 14 ימי אחסון. עם זאת, מובהקות סטטיסטית לא התקבלה הן בתוצאות ה-TSS והן בתוצאות החומצה.

טבלה 2: (A) מבחן תחום מרובה של ממוצעי מדדי ההבשלה של פרי מקטיף פברואר במהלך האחסון. הבדיקות התבצעו ביום הקטיף ולאחר שבוע או שבועיים של אחסון ב-12 מ"צ ובלחות יחסית של 95%. (B) ניתוח השונות למדדי ההבשלה השונים.

חומצה (%)		TSS	צבע (h°)		מוצקות (gr/mm)				יום הקטיף		
0.72	a	8.27	a	48.5	a	417	a		A		
0.77	a	8.03	a	46.3	a	384	ab	לאחר 8 ימי אחסון			
0.77	a	8.37	a	45.7	a	369	b	לאחר 14 ימי אחסון			
P(F)	ס"ס	P(F)	ס"ס	ד"ח	P(F)	ס"ס	P(F)	ס"ס	ד"ח	מקור השונות	B
0.3634	0.004	0.7910	0.2	2	0.6082	9	0.2397	6097	1	ימים	
					0.0156	307	0.0091	42713	2	חזרות	
					0.1615	132	0.2402	12605	2	ימים*חזרות	
	0.010		2.2	6		4058		497540	114	שגיאה	

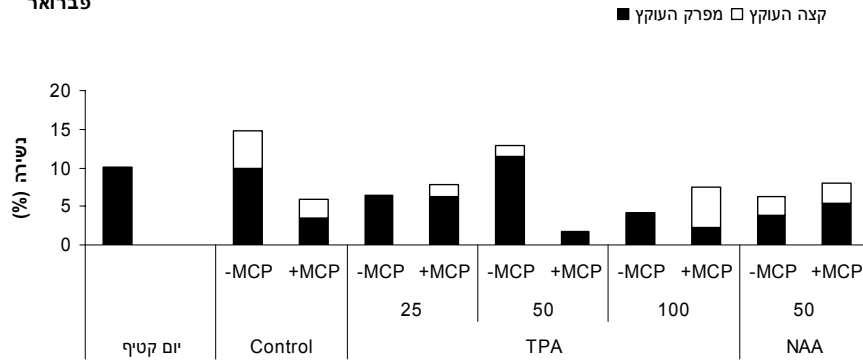
* ניתוח סטטיסטי דו-גורמי נעשה לפי מבחן Tukey-Kramer HSD בין ימי האחסון השונים למדדי המוצקות והצבע.

3.3 השפעת טיפולי אוקסין ו-1-MCP לאחר הקטיפה על הנשירה במהלך האחסון

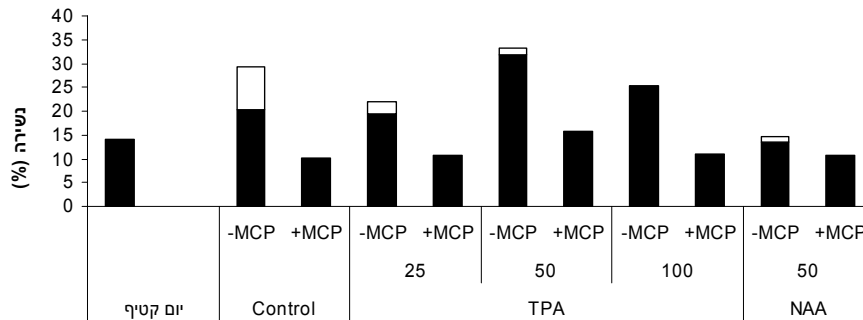
השפעת מתן אוקסין אקסוגני בלבד ובשילוב עם 1-MCP נבדקה על נשירת הפרי בזן 1335 במהלך תקופות שונות של השנה (איור 2). אשכולות עגבניות הצירי רוססו לאחר הקטיפה בכמויות משתנות שבין 25-100 ח"מ TPA או 50 ח"מ NAA. הטיפול המשולב עם 1-MCP היה במינון של 0.5 ח"מ למשך כ-22 שעות. בדיקת הנשירה הייתה לאחר 14 ימי אחסון (ניסויי פברואר, מרץ ויולי) ולאחר 21 ימי אחסון (ניסוי מאי). למרות שאין עקביות גבוהה בתוצאות, אפשר להבחין בהפחתת הנשירה לאחר יישום של 25 ח"מ TPA בכל 4 הניסויים, בהשפעה פחותה יותר של מינון ה-TPA הבינוני, ובהשפעה משמעותית יותר של מינון ה-TPA הגבוה בשניים מהניסויים, מועדי פברואר ומאי. יחד עם זאת, לא התקבלה מובהקות סטטיסטית (טבלה 3) לתוצאות אלו באף אחד מהניסויים. ההשפעה של NAA במינון של 50 ח"מ על הנשירה הייתה גבוהה יותר בשני מועדי הניסוי הראשונים, אך גם במקרה זה לא נראתה מובהקות סטטיסטית כתוצאה מיישום של NAA בהשוואה ליישום TPA ולביקורת. הטיפול ב-1-MCP לבדו הפחית את הנשירה לרמה של כ-40% מהביקורת ב-3 הניסויים הראשונים, כאשר בניסויי פברואר-מרץ השפעה זו הייתה מובהקת. לא נראה שהטיפול של 1-MCP בשילוב עם אוקסין יצר השפעה סינרגיסטית. כאשר משווים את השפעת האוקסינים השונים על הנשירה, לא מתקבלת מגמה ברורה הן בהשוואת הכמויות המשתנות של ה-TPA והן בהשוואת הטיפול עם האוקסין NAA לעומת הטיפול עם TPA.

בהשוואת הנשירה באזורי הניתוק השונים בין מועדי הניסויים השונים, ניתן לראות כי הנשירה ברובה התבצעה באזור מפרק העוקץ בחודשי פברואר מרץ, ובזמן חודשי האביב והקיץ יש מעבר לנשירה שעיקרה היא באתר ניתוק קצה העוקץ. ניתן גם לראות כי טיפולי האוקסין האקסוגני בעלי השפעה מועטה אם בכלל על הנשירה הכללית ועל הסטת הנשירה מאתר ניתוק זה לאחר, בעוד שהשפעת הטיפול המשלב גם חשיפה ל-1-MCP הינה בעלת אפקט רב יותר הנראה בעיקר במועד מרץ (איור 2) וחלקית במועד מאי. השפעת עיכוב זו של 1-MCP באתר ניתוק מפרק העוקץ מראה מובהקות סטטיסטית בטיפול האוקסין של 50 ו-100 ח"מ TPA, אך השפעתו בעיכוב הנשירה באתר ניתוק קצה העוקץ חסרת משמעות מבחינה סטטיסטית.

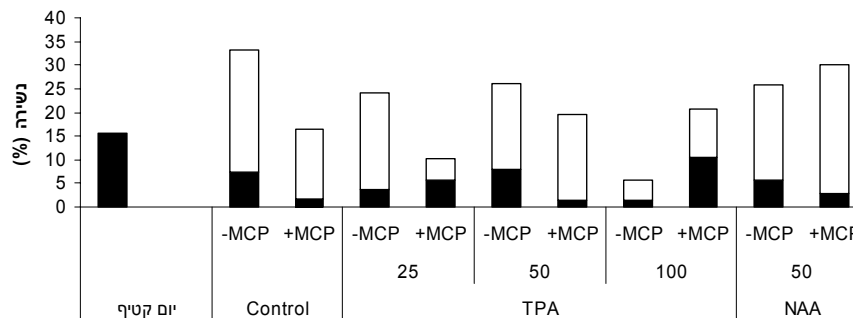
פברואר



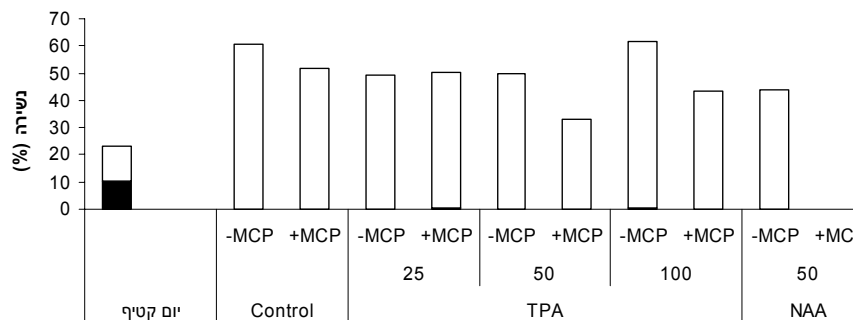
מרץ



מאי



יולי



טיפול

איור 2: השפעת טיפולים באוקסין וטיפול משולב של אוקסין ו-1-MCP לאחר הקטיף על אחוזי הנשירה הכוללים ממפרק העוקץ ומקצה העוקץ. הניסויים נערכו על פרי שנקטף בפברואר, במרץ, במאי, וביוולי. בדיקת הנשירה התבצעה ביום הקטיף ולאחר 14 יום (ניסויים פברואר, מרץ ויולי) או 21 יום (ניסוי מאי) באחסון. יש לשים לב כי הסקלה של צירי ה-Y משתנה בין הגרפים.

טבלה 3: (A) מבחן תחום מרובה של ממוצעי הנשירה לפי יישום האוקסינים השונים ובהיעדר או נוכחות 1-MCP. (B) ניתוח השונות על-פי סוג הנשירה כתוצאה מיישום אוקסין ו-1-MCP. לאחר הקטיף במועדי קטיף שונים.

נשירת קצה העוקץ		נשירת מפרק העוקץ		נשירה כללית		סוג טיפול	פברואר
-MCP	+MCP	-MCP	+MCP	-MCP	+MCP		
4.9 a y	2.4 a y	9.8 a z	3.4 a y	14.8 a z	5.8 a y	Control	A
0.0 a y	1.7 a y	6.4 a y	6.2 a y	6.4 a y	7.9 a y	25 TPA	
1.4 a y	0.0 a y	11.4 a z	1.8 a y	12.8 a z	1.8 a y	50 TPA	
0.0 a y	5.3 a y	4.2 a y	2.2 a y	4.2 a y	7.6 a y	100 TPA	
2.4 a y	2.6 a y	3.8 a y	5.4 a y	6.2 a y	7.9 a y	50 NAA	
P(F)	סר"ס	P(F)	סר"ס	P(F)	סר"ס	ד"ח	מקור השונות
0.40	0.02	0.42	0.03	0.60	0.03	4	Auxin
0.57	0.00	0.02	0.04	0.14	0.03	1	1-MCP
0.21	0.03	0.07	0.06	0.02	0.14	4	Auxin*1-MCP
	0.64		0.99		1.59	139	Error

נשירת קצה העוקץ		נשירת מפרק העוקץ		נשירה כללית		סוג טיפול	מרץ
-MCP	+MCP	-MCP	+MCP	-MCP	+MCP		
8.9 a z	0.0 a y	20.4 a y	10.2 a y	29.3 a z	10.2 a y	Control	A
2.5 ab y	0.0 a y	19.4 a y	10.8 a y	21.9 a y	10.8 a y	25 TPA	
1.4 b y	0.0 a y	31.8 a z	15.8 a y	33.2 a z	15.8 a y	50 TPA	
0.0 b y	0.0 a y	25.5 a z	11.1 a y	25.5 a y	11.1 a y	100 TPA	
1.2 b y	0.0 a y	13.5 a y	10.8 a y	14.7 a y	10.8 a y	50 NAA	
P(F)	סר"ס	P(F)	סר"ס	P(F)	סר"ס	ד"ח	מקור השונות
0.0338	0.04	0.1898	0.25	0.2697	0.23	4	Auxin
0.0043	0.03	0.0013	0.41	0.0002	0.66	1	1-MCP
0.0338	0.04	0.7011	0.08	0.6474	0.11	4	Auxin*1-MCP
	0.50		5.29		6.07	139	Error

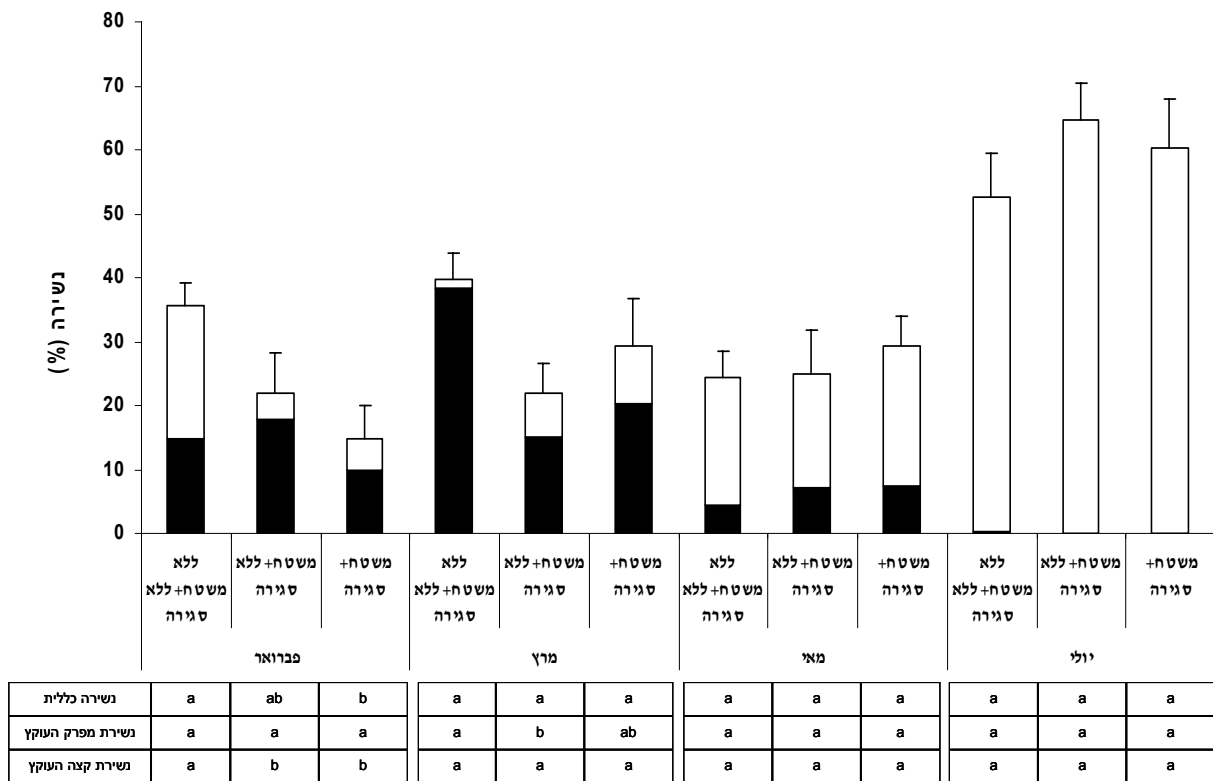
נשירת קצה העוקץ		נשירת מפרק העוקץ		נשירה כללית		סוג טיפול	מאי
-MCP	+MCP	-MCP	+MCP	-MCP	+MCP		
25.6 a y	14.8 a y	7.5 a y	1.6 a y	33.1 a y	16.4 a y	Control	A
20.4 a y	4.7 a y	3.6 a y	5.6 a y	24.0 a y	10.3 a y	25 TPA	
18.3 a y	18.2 a y	7.9 a y	1.4 a y	26.2 a y	19.6 a y	50 TPA	
4.2 a y	10.4 a y	1.4 a z	10.4 a y	5.6 a y	20.8 a y	100 TPA	
20.2 a y	27.1 a y	5.6 a y	2.9 a y	25.7 a y	30.1 a y	50 NAA	
P(F)	סר"ס	P(F)	סר"ס	P(F)	סר"ס	ד"ח	מקור השונות
0.08	0.35	0.97	0.004	0.26	0.29	4	Auxin
0.51	0.02	0.66	0.001	0.46	0.03	1	1-MCP
0.26	0.21	0.02	0.085	0.17	0.36	4	Auxin*1-MCP
	3.67		0.658		4.99	139	Error

נשירת קצה העוקץ		נשירת מפרק העוקץ		נשירה כללית		סוג טיפול	יולי
-MCP	+MCP	-MCP	+MCP	-MCP	+MCP		
60.4 a y	51.6 a y	0.0 a y	0.0 a y	60.4 a y	51.6 a y	Control	A
49.4 a y	49.9 a y	0.0 a y	0.5 a y	49.4 a y	50.5 a y	25 TPA	
49.9 a y	33.1 a y	0.0 a y	0.0 a y	49.9 a y	33.1 a y	50 TPA	
61.3 a y	43.1 a y	0.4 a y	0.0 a y	61.6 a y	43.1 a y	100 TPA	
43.6 a		0.0 a		43.6 a		50 NAA	
P(F)	סר"ס	P(F)	סר"ס	P(F)	סר"ס	ד"ח	מקור השונות
0.23	0.47	0.58	0.000195	0.23	0.48	3	Auxin
0.04	0.48	0.88	0.000002	0.04	0.47	1	1-MCP
0.56	0.23	0.27	0.000388	0.52	0.24	3	Auxin*1-MCP
	17.08		0.015619		17.04	158	Error

* המובהקות הסטטיסטית נעשתה בין טיפולי האוקסינים השונים בכל קבוצה (אותיות a,b) לפי מבחן Tukey- Kramer HSD ובין טיפול 1-MCP (אותיות x,y) לפי מבחן Student's t-test.

בהשוואת טיפולי ביקורת של הניסויים במועדים שונים של השנה לא נראית מגמה אחידה. ניתן לראות על-פי הגרף (איור 3) שבחודשים פברואר-מרץ ישנה השפעה של ריסוס על-ידי המשטח על אחוז הנשירה הממוצע לעומת החודשים מאי-יולי, שבהם לא נראית ירידה באחוזי הנשירה כתוצאה מריסוס עם משטח. כמו כן, לא נראית השפעה אחידה של סגירת האשכולות במיכל למשך כ-22 שעות על הנשירה. הבדלי הנשירה כתוצאה מטיפול הביקורת השונים אינם משמעותיים מבחינה סטטיסטית (איור 3, טבלה 4). בבחינת השפעת טיפולי הביקורת על הנשירה על-פי אתרי הניתוק, ניתן לראות כי בחודשים מאי-יולי אופי הנשירה אינו מושפע כתוצאה מהריסוס על-ידי משטח או כתוצאה מהסגירה במיכל למשך 22 שעות. בקטף פברואר נראה כי המשטח גרם לירידה מובהקת בנשירת קצה העוקץ והסגירה במיכל השפיעה בעיקר על הנשירה המתרחשת דרך מפרק העוקץ, אך לא התקבלה מובהקות סטטיסטית. לעומת זאת במרץ, הריסוס על-ידי המשטח גרם לירידה מובהקת בנשירת מפרק העוקץ וסגירת מארזי האשכולות לא השפיעה.

קצה העוקץ □ מפרק העוקץ ■



מועדי ניסוי

איור 3: השפעת סוגי ביקורת שונים לאחר הקטיף על אחוז הנשירה. הגרף מתאר את ממוצע אחוז הנשירה על-פי אתרי הניתוק כתוצאה מטיפול עם משטח – טבילה ב-Triton X-100, סגירה - אחסון במיכל סגור של 200 ליטר למשך כ-22 שעות. בדיקת הנשירה נעשתה לאחר 14 ימי אחסון (ניסויים פברואר, מרץ ויולי) ו-21 ימי אחסון (ניסוי מאי). ניתוח סטטיסטי דו-גורמי נעשה בין מועדי הקטיף וסוג הביקורת לפי מבחן Tukey-Kramer HSD על-פי כל סוג נשירה בנפרד.

טבלה 4: ניתוח השונות של ממוצעי אחוז הנשירה על-פי סוג הנשירה.

נשירת קצה עוקץ		נשירת מפרק עוקץ		נשירה כללית		ד"ח	מקור השונות	
P(F)	סר"ס	P(F)	סר"ס	P(F)	סר"ס			
0.005	0.26	0.50	0.05	0.03	0.32	2	סוג ביקורת	פברואר
	0.86		1.52		1.71	41	Error	
0.142	0.05	0.01	0.44	0.15	0.24	2	סוג ביקורת	מרץ
	0.48		1.92		2.53	42	Error	
0.105	0.2	0.70	0.01	0.10	0.26	2	סוג ביקורת	מאי
	1.13		0.21		1.40	28	Error	
0.416	0.17	0.40	0.00	0.40	0.16	2	סוג ביקורת	יולי
	5.60		0.00		5.65	59	Error	

* המובהקות הסטטיסטית נעשתה בין סוגי הביקורת בכל קבוצת סוג נשירה (אותיות a,b לפי מבחן Tukey Kramer HSD).

3.4 השפעת טיפולי אוקסין ו-1-MCP שלאחר הקטיפה על מדדי הבשלה של פרי עגבניית הצ'רי מוצקות הפרי –

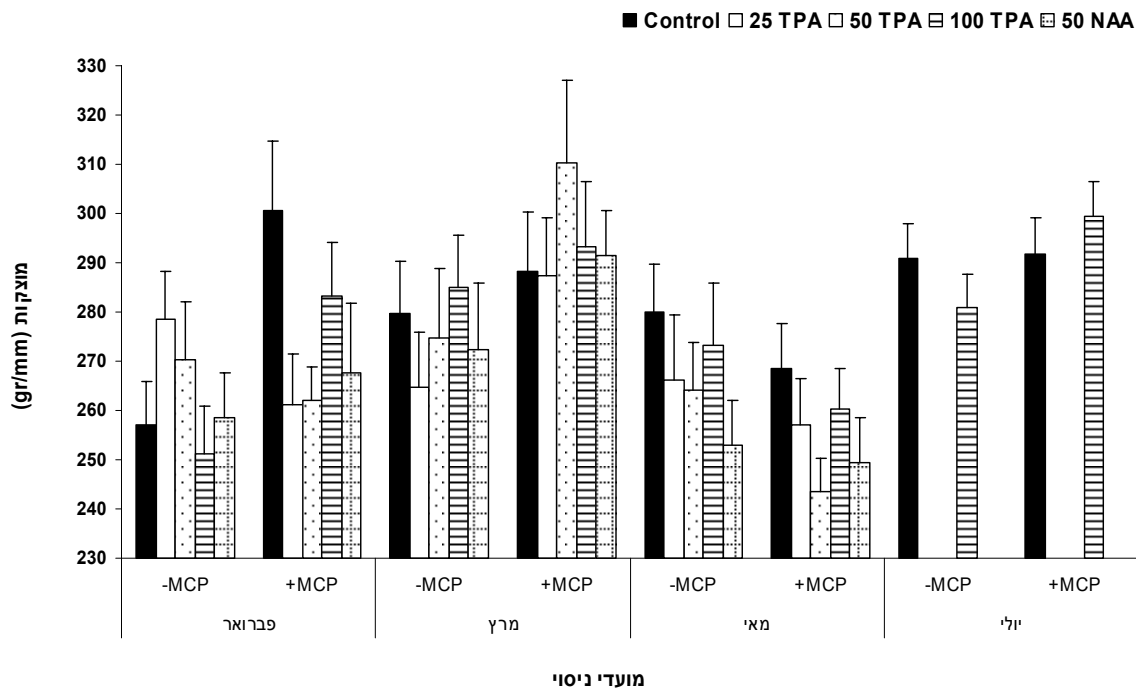
השפעת מתן אוקסין אקסוגני במינונים שונים וחשיפה למעכב חישת האתילן 1-MCP על מוצקות הפרי במהלך האחסון נבדקה על-ידי בחינת מוצקות של כ-20 פירות בכל קבוצת טיפול. על-פי התוצאות (איור 4, טבלה 6) לא נראית השפעה חד-משמעית של מינוני האוקסין השונים לעומת קבוצת הביקורת. ביישום 1-MCP, התקבלה מובהקות סטטיסטית בשמירת המוצקות רק בביקורת ובקבוצת הטיפול של 100 ח"מ TPA במועד פברואר ובמועד מרץ בקבוצת הטיפול של 50 ח"מ TPA. מוצקות הפרי ביום הקטיפה (טבלה 5) בשלושה מתוך ארבעת הניסויים הייתה גבוהה מאד בהשוואה לנתוני המוצקות, אשר התקבלו לאחר 14 או 21 ימי אחסון.

טבלה 5: בדיקת מוצקות וצבע ביום הקטיפה של פרי במועדים שונים של השנה.

צבע (h ¹)	מוצקות (gr/mm) ¹	
66.9 ± 4.4	391 ± 26	פברואר
60.9 ± 1.7	414 ± 17	מרץ
ל.ג.	270 ± 6	מאי
53.9 ± 1.2	400 ± 13	יולי

ל.ג. = לא נבדק

¹התוצאות הן ממוצע וסטיית תקן (S.E.) של 20 פירות.



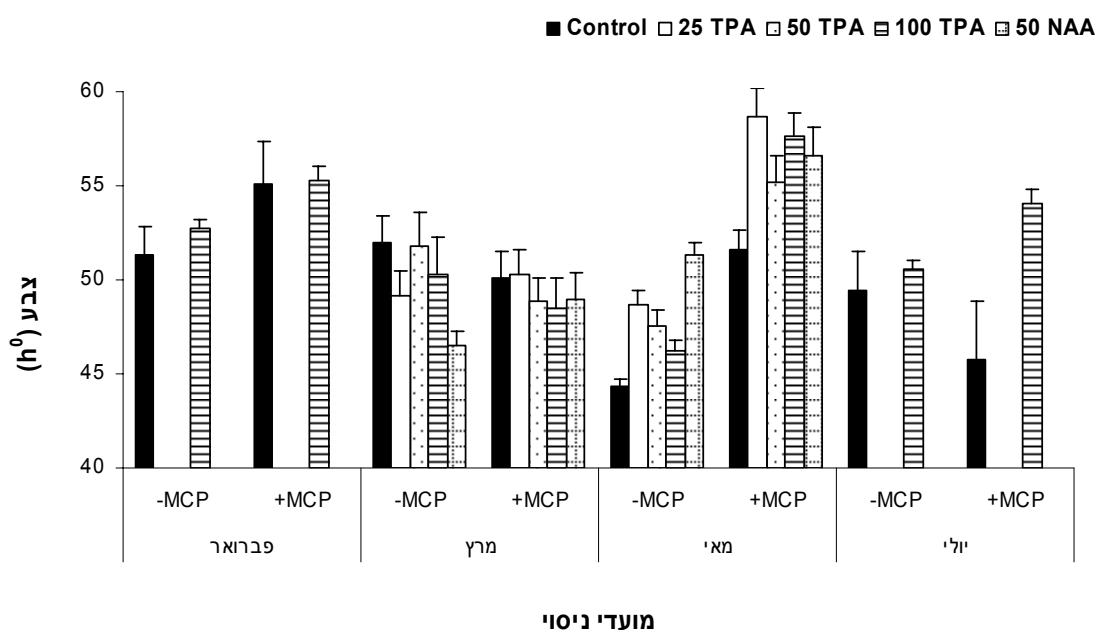
איור 4: השפעת טיפולים באוקסין וטיפול משולב של אוקסין ו-1-MCP לאחר הקטיף על מוצקות הפרי במועדים שונים. בדיקת המוצקות נעשתה על 20 פירות מכל קבוצת טיפול לאחר 14 (ניסויים פברואר, מרץ ויולי) ו-20 (ניסוי מאי) יום באחסון ב-12°C ולחות יחסית של 95%.

טבלה 6: (A) מבחן תחום מרובה של ממוצעי המוצקות לפי יישום האוקסינים השונים ובהיעדר או נוכחות 1-MCP לאחר הקטיף במועדים שונים. (B) ניתוח השונות לפי מועד הקטיף.

יולי		מאי		מרץ		פברואר		A		
-MCP	+MCP	-MCP	+MCP	-MCP	+MCP	-MCP	+MCP	סוג טיפול		
291 a y	291 a y	280 a y	269 a y	280 a y	288 a y	257 a y	301 a x	Control		
		266 a y	257 a y	265 a y	287 a y	279 a y	261 a y	25 TPA		
		264 a y	243 a y	275 a y	310 a x	270 a y	262 a y	50 TPA		
281 a y	300 a y	273 a y	260 a y	285 a y	293 a y	251 a y	283 a x	100 TPA		
		253 a y	249 a y	272 a y	291 a y	258 a y	268 a y	50 NAA		
B										
P(F)	סר"ס	ד"ח	P(F)	סר"ס	P(F)	סר"ס	P(F)	סר"ס	ד"ח	מקור השונות
0.9	61	1	0.12	14280	0.72	6547	0.65	5778	4	Auxin
0.2	5048	1	0.06	6725	0.02	17707	0.08	7024	1	1-MCP
0.2	4532	1	0.94	1495	0.80	5109	0.02	26757	4	Auxin*1-MCP
	751330	243		370242		591534		441739	190	Error

* המובהקות הסטטיסטית נעשתה בין טיפולי האוקסינים השונים בכל קבוצה (אותיות a,b) לפי מבחן Tukey-Kramer HSD ובין היעדר/נוכחות 1-MCP (אותיות x,y) לפי מבחן Student's t-test.

צבע הפרי – בחינת הצבע של פירות עגבניות הצ'רי באשכולות נעשה על-פי רוב על מדגם של כ-20 פירות ביום הקטיף וכ-14 יום (ניסויים פברואר, מרץ ו-יולי) ו-21 יום (ניסוי מאי) לאחר שהייה באחסון. כאשר בוחנים את השפעת מתן האוקסין בניסוי מרץ, עפ"ר אין השפעה של הטיפולים על צבע הפרי (איור 5). לעומת זאת, בניסוי מאי לטיפול ב-1-MCP הייתה השפעה מעכבת מובהקת (טבלה 7) על התפתחות הצבע ולטיפול המשולב של אוקסין ו-1-MCP הייתה השפעת עיכוב נוספת ביחס לביקורת, בהשוואה לטיפולים המקבילים ללא 1-MCP. ניתן להבחין כי באופן כללי מתן אוקסין גרם לעיכוב התפתחות צבע כפי שזה התבטא בזווית הצבע, אך בבחינת השפעת מתן מינונים שונים של אוקסין והשפעת היישום של שני סוגי האוקסין לא מתקבלת השפעה עקבית. בהשוואה בין קבוצת הטיפולים שנחשפה ל-1-MCP לקבוצת הטיפולים שלא נחשפה לתכשיר, נראית השפעה רבה יותר מבחינת עיכוב השתנות זוית הצבע לעומת הקבוצה שטופלה רק בריסוס על-ידי אוקסין.



איור 5: השפעת טיפולי האוקסינים השונים והטיפול המשולב של אוקסין-1-MCP לאחר הקטיף על השתנות זוית הצבע (h⁰) של הפירות במועדים שונים. בדיקת השתנות הצבע נעשתה לאחר 14 ימי אחסון (ניסוי פברואר, מרץ ויולי) ולאחר 21 ימי אחסון (ניסוי מאי) ב-12°C ולחות יחסית של 95%.

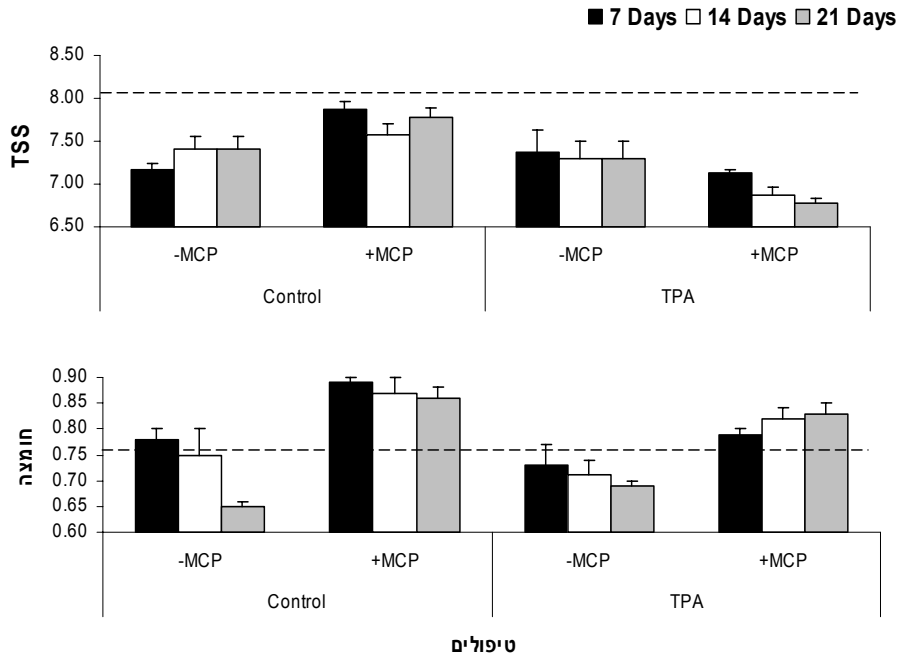
טבלה 7: (A) מבחן תחום מרובה של ממוצעי צבע הפרי לפי יישום האוקסינים השונים ובהיעדר או נוכחות 1-MCP לאחר הקטיף במועדים שונים. (B) ניתוח השונות של צבע הפרי.

יולי		מאי		מרץ		פברואר		A				
-MCP	+MCP	-MCP	+MCP	-MCP	+MCP	-MCP	+MCP	סוג טיפול				
49.44 a y	45.71 a x	44.3 a y	51.65 b x	51.97 a y	50.08 a y	51.31 a y	55.11 a y	Control				
		48.71 ab y	58.68 a x	49.11 a y	50.25 a y			25 TPA				
		47.53 ab y	55.16 ab x	51.78 a y	48.87 a y			50 TPA				
50.52 a y	54.09 b x	46.25 a y	57.64 a x	50.26 a y	48.48 a y	52.72 a y	55.25 a y	100 TPA				
		51.33 b y	56.62 a x	46.56 a y	48.97 a y			50 NAA				
B												
P(F)	סר"ס	ד"ח	P(F)	סר"ס	ד"ח	P(F)	סר"ס	ד"ח	P(F)	סר"ס	ד"ח	מקור השונות
<0.0001	1404	1	<0.0001	929	4	0.25	239	4	0.7	12	1	Auxin
0.7280	3	1	<0.0001	3466	1	0.52	18	1	0.2	201	1	1-MCP
<0.0001	869	1	0.0420	227	4	0.32	205	4	0.8	8	1	Auxin*1-MCP
	6386	245		4271	190		8290	190		8265	76	Error

* המובהקות הסטטיסטית נעשתה בין טיפולי האוקסינים השונים בכל קבוצה (אותיות a,b) לפי מבחן Tukey- Kramer HSD ובין היעדר/נוכחות 1-MCP (אותיות x,y) לפי מבחן Student's t-test.

חומצה / TSS –

הבדיקה התבצעה על תסנין ממדגם של 15 פירות לכל חזרה, כאשר היו 3 חזרות שונות לכל נקודת זמן, החל מיום הקטיף ולאחר 7, 14 ו-21 ימי אחסון בחדר הקירור בטמפי של 12°C ובלחות יחסית של 95%. מהתוצאות ניתן לראות מגמה של ירידה באחוז הסוכר (TSS) במהלך האחסון בקטיף מאי (איור 6) בהשוואה ליום הקטיף. הטיפול ב-1-MCP שמר על רמה גבוהה של אחוז הסוכר בפרי יחסית לביקורת, אך הטיפול המשלב מתן TPA ו-1-MCP יחדיו הביא לירידה חדה באחוז הסוכר בהשוואה להשפעת כל אחד מהטיפולים בנפרד. להבדיל מתוצאות מאי, בחודש יולי (איור 7) נראית מגמת עלייה ברמות ה-TSS בהשוואה ליום הקטיף, אך הרמות הכלליות בחודש זה הינן נמוכות בהשוואה לתוצאות שהתקבלו במאי. בבחינת השפעת הטיפולים השונים בקטיף יולי, ניתן לראות כי מתקבלת עלייה ברמות אחוז הסוכר כתוצאה ממתן האוקסין והחשיפה ל-1-MCP, אך גם במועד זה הטיפול המשולב גרם לירידה ברמות ה-TSS בהשוואה לביקורת (Control). בניגוד למועד מאי (טבלה 8), תוצאות מועד יולי (טבלה 9) לא הראו מובהקות סטטיסטית. כאשר בוחנים את השפעת הטיפולים על אחוז החומצה ניתן לראות כי בקטיף מאי ישנה ירידה באחוז החומצה במהלך האחסון הן בביקורת הלא מטופלת והן בטיפול ה-TPA בהשוואה ליום הקטיף, אם כי לא מובהקת. הטיפול ב-1-MCP לבדו גרם לעליה משמעותית באחוז החומצה ואילו הטיפול המשולב עם האוקסין מיתן את השפעת ה-1-MCP. אחוז החומצה בניסוי מקטיף יולי היה נמוך בהשוואה לקטיף מאי ולא נראה שלטיפולים הייתה השפעה משמעותית על מדד זה.



איור 6: השתנות ה-TSS (A) והחומצה (B) לאורך האחסון בניסוי מאי כתוצאה מהשפעת הטיפול באוקסין (TPA) ו-1-MCP. טיפול האוקסין התבצע על-ידי ריסוס האשכולות בריכוז של 100 ח"מ TPA. הטיפול על-ידי 1-MCP התבצע על ידי הכנסת אשכולות עגבניות הצירי למיכל אטום ויישום של החומר בריכוז של 0.5 ח"מ למשך כ-22 שעות. בדיקת ה-TSS והחומצה התבצעה על מדגם של 15 פירות לחזרה, במתכונת של 3 חזרות לכל נקודת זמן. הקו המקווקו מייצג את ערך מדד ההבשלה ביום הקטיפ.

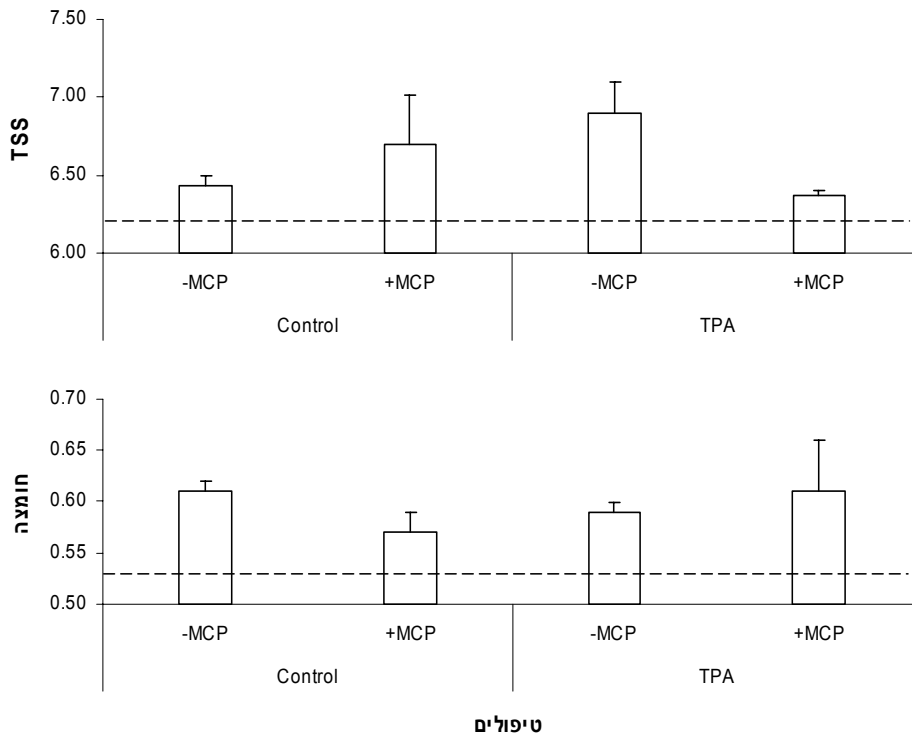
טבלה 8: (A) מבחן תחום מרובה של ממוצעי מדדי TSS וחומצה לפי יישום האוקסינים השונים ובהיעדר או נוכחות 1-MCP לאחר הקטיפ במאי בזמני בדיקה שונים. (B) ניתוח השונות של מדדי TSS וחומצה במאי לפי זמני בדיקה שונים.

לאחר 21 ימי אחסון		לאחר 14 ימי אחסון		לאחר 7 ימי אחסון		סוג טיפול	A
-MCP	+MCP	-MCP	+MCP	-MCP	+MCP		
7.40 a y	7.77 a y	7.40 a y	7.57 a y	7.17 a y	7.87 a x	Control	TSS
7.30 a y	6.77 b x	7.30 a y	6.87 b y	7.37 a y	7.13 b y	100 TPA	
0.65 a y	0.69 a x	0.75 a y	0.71 a x	0.78 a y	0.73 a x	Control	חומצה
0.86 a y	0.83 b y	0.87 a y	0.82 a x	0.89 a y	0.79 a x	100 TPA	

P(F)	סר"ס	P(F)	סר"ס	P(F)	סר"ס	ד"ח	מקור השונות	B
0.005	0.91	0.03	0.48	0.09	0.21	1	Auxin	TSS
0.577	0.02	0.40	0.05	0.14	0.16	1	1-MCP	
0.014	0.61	0.08	0.27	0.01	0.65	1	Auxin*1-MCP	
	0.49		0.53		0.49	8	Error	
0.9065	0.000008	0.248	0.00563	0.017	0.017	1	Auxin	חומצה
<0.0001	0.091875	0.009	0.04320	0.009	0.022	1	1-MCP	
0.0501	0.003008	0.926	0.00003	0.289	0.002	1	Auxin*1-MCP	
	0.004533		0.02900		0.015	8	Error	

* המובהקות הסטטיסטית נעשתה בין טיפולי האוקסינים בכל קבוצה (אותיות a,b) ובין היעדר/נוכחות 1-

MCP (אותיות x,y) לפי מבחן Student's t-test.



איור 7: השתנות ה-TSS (A) והחומצה (B) בניסוי יולי כתוצאה מהשפעת הטיפול באוקסין (TPA) ו-1-MCP. טיפול האוקסין התבצע על-ידי ריסוס האשכולות בריכוז של 100 ח"מ TPA. הטיפול על-ידי 1-MCP התבצע על ידי הכנסת אשכולות עגבניות הצירי למיכל אטום ויישום של החומר בריכוז של 0.5 ח"מ למשך כ-22 שעות. בדיקת ה-TSS והחומצה התבצעה לאחר 14 ימי אחסון על מדגם של 15 פירות לחזרה, במתכונת של 3 חזרות לכל נקודת זמן. הקו המקווקו מייצג את ערך מדד ההבשלה ביום הקטיפה.

טבלה 9: (A) מבחן תחום מרובה של ממוצעי מדדי TSS וחומצה לפי יישום האוקסינים השונים ובהיעדר או נוכחות 1-MCP לאחר הקטיפה ביולי לאחר 14 ימי אחסון. (B) ניתוח השונות של מדדי TSS וחומצה במאי לפי זמני בדיקה שונים.

לאחר 14 ימי אחסון		סוג טיפול	A
<u>-MCP</u>	<u>+MCP</u>	Control	TSS
6.43 a	6.70 a	100 TPA	
6.90 a	6.37 a	Control	חומצה
0.61 a	0.57 a	100 TPA	
0.59 a	0.61 a		
<hr/>			
<u>P(F)</u>	<u>סר"ס</u>	<u>ד"ח</u>	<u>מקור השונות</u>
0.73	0.01	1	Auxin
0.49	0.05	1	1-MCP
0.06	0.48	1	Auxin*1-MCP
	0.83	8	Error
0.7	0.0003	1	Auxin
0.8	0.0001	1	1-MCP
0.3	0.0027	1	Auxin*1-MCP
	0.0157	8	Error

* המובהקות הסטטיסטית נעשתה בין טיפולי האוקסינים בכל קבוצה (אותיות a,b) ובין היעדר/נוכחות 1-

MCP (אותיות x,y) לפי מבחן Student's t-test.

3.5 דפוס הביטוי של אנזימים הידרוליטיים שונים ברקמות הניתוק של עגבניות צ'רי באשכולות
אנזימים האחראיים לעיבוד דפנות תאים ידועים כמעורבים בתהליכי ניתוק של אברי הצמח השונים. לכן, חקר דגם הביטוי של גנים מקבוצות אלו, עשוי להסביר חלק מתהליך הבקרה של הנשירה. בתוצאות המוצגות להלן נחקרו דגמי הביטוי של שבעה גנים: שלושה גנים ממשפחת הצלולאזות (endo- β -1,4-glucanase) שלושה גנים המשתייכים למשפחת הפוליגלקטרונאזות (polygalacturonases) וגן ממשפחת הקסילוגלוקן אנדוגליקוזילאז (Xyloglucan Endotransglycosylase).

אנליזת הביטוי נערכה ברקמות הניתוק של מפרק העוקץ (Joint), קצה העוקץ (Pedicel) ולמעט ניסוי פברואר, במצעית הפרי (Receptacle). הגנים *Cel5* ו-*Cel8* שלהם הייתה מערכת ביטוי כמותית מכוילת, נבדקו באנליזת PCR כמותי. הביטוי של שאר הגנים נבדק באמצעות PCR 'כמותי-מקורב' (Semi-Quantitative).

3.5.1 דגם הביטוי של הגנים השונים לאורך האחסון

רמת הביטוי של הגנים *Cell*, *Cel5*, ו-*Cel8* ממשפחת הצלולאזות, *TAPG1*, *TAPG2*, *TAPG4* השייכים למשפחת הפוליגלקטרונאזות ושל הגן *XET-BR1* מהקסילוגלוקאן אנדו-טרנסגליקוזילאז נבדקה באזורי הניתוק השונים של דוגמאות פרי שנשרו לעומת רמת הביטוי שהתקבלה בדגימות המייצגות פרי שלא נשר לאורך האחסון בניסוי שנערך בתחילת פברואר.

בבחינת תוצאות רמות הביטוי היחסיות של הגן *Cel5* (איור 8), ניתן לראות כי רמות הביטוי המתקבלות באתר ניתוק מפרק העוקץ גבוהות במספר סדרי גודל בהשוואה לרמות הביטוי המתקבלות באתר הניתוק המורכב מקצה העוקץ ומצעית הפרי. ניתן להבחין כי רמות הביטוי המתקבלות בזמני האחסון המוקדמים הן נמוכות ביותר ולמעשה הביטוי עולה באופן משמעותי רק ביום ה-11 של האחסון בשלושת הרקמות השונות, מלבד במקרה של הביטוי המתקבל במדגם של הפרי שנשר באזור ניתוק מפרק העוקץ שמצביע על רמה גבוהה כבר ביום השמיני לאחסון. בקצה העוקץ, רמת הביטוי של *Cel5* עלתה בעיקר ביום ה-16 לאחסון במדגם הפרי שנשר. במצעית הפרי, הביטוי הכללי היה נמוך ועפ"ר הוא היה גבוה יותר בפרי שלא נשר לעומת הביטוי שהתקבל במדגם הפירות שנשרו.

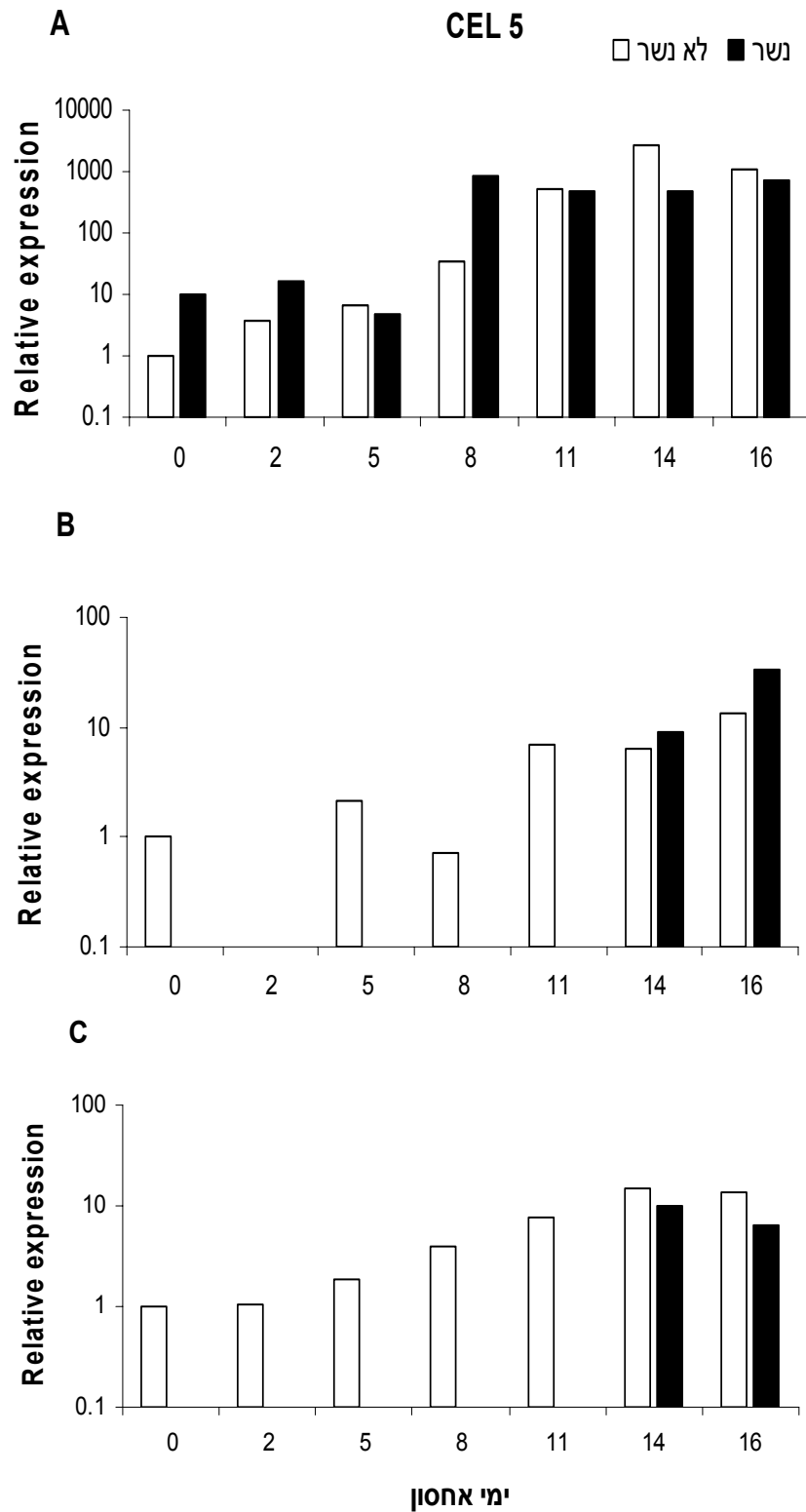
בבחינת תוצאות רמות הביטוי היחסיות של הגן *Cel8* (איור 9), ניתן לראות כי עפ"ר דגם הביטוי של הגן היה דומה לזה של *Cel5* אך רמת הביטוי הייתה נמוכה.

טבלה 10: (A) מבחן תחום מרובה של ביטוי הגנים *CEL 5* ו- *CEL 8* נעשה בין ימי האחסון השונים לפי הרקמות השונות. (B) ניתוח השונות בכל רקמה.

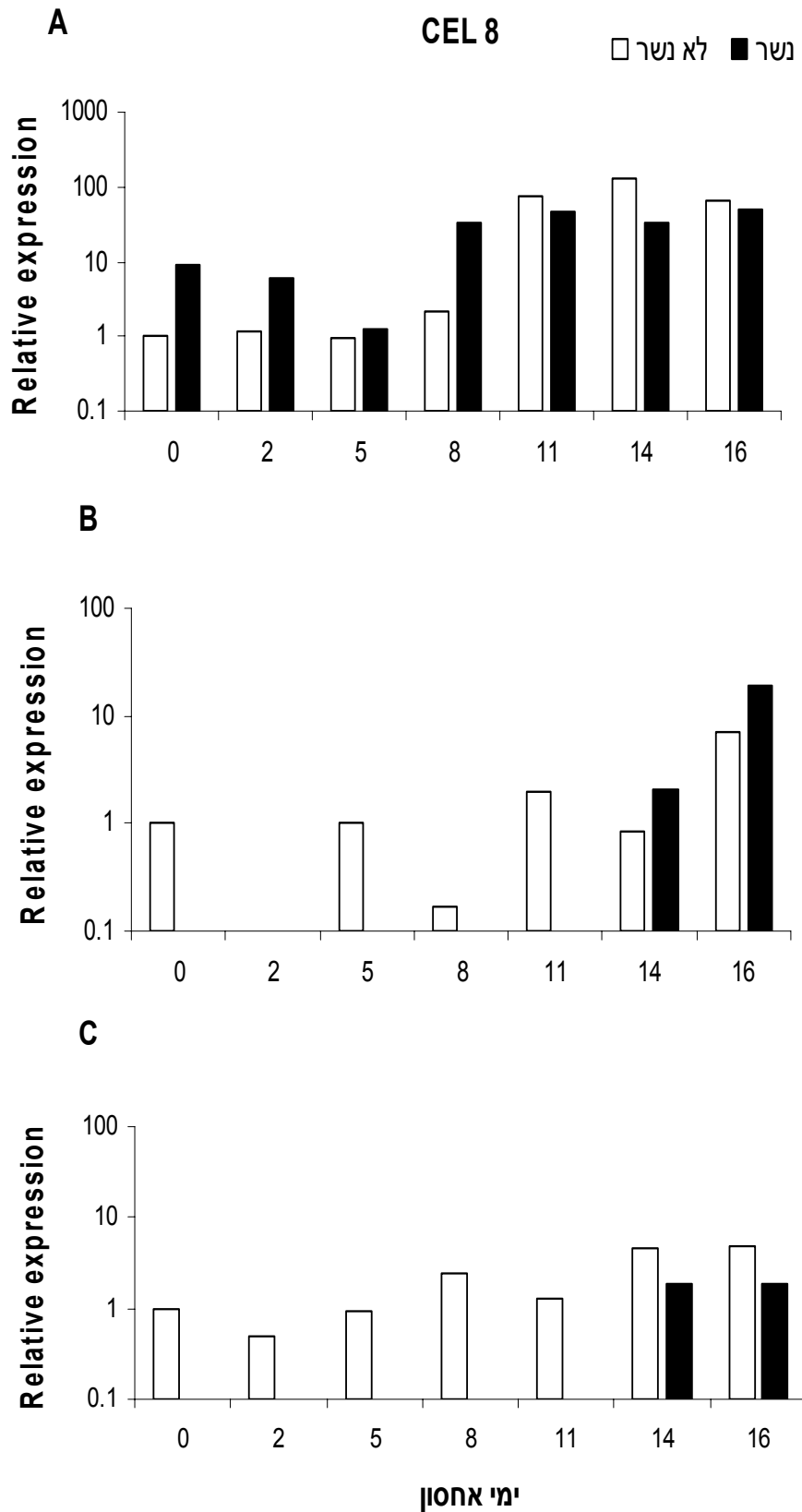
							A	
מצעית	קצה העוקץ	מפרק העוקץ	ימים באחסון					
a	abc	a	0				CEL5	
a	a	ab	2					
a	bc	ab	5					
a	ab	abc	8					
a	bc	bc	11					
a	bc	c	14					
a	c	bc	16					
<hr/>							CEL8	
a	ab	a	0					
a	a	ab	2					
a	ab	a	5					
a	ab	ab	8					
a	ab	ab	11					
a	ab	b	14					
a	b	ab	16					
<hr/>							B	
P(F)	סר"ס	P(F)	סר"ס	P(F)	סר"ס	ד"ח	מקור השונות	
0.04	33.1	0.003	78.2	0.007	234.9	6	ימי אחסון	CEL5
0.01	14.6	0.044	6.6	0.558	1.5	1	חזרות	
	6.9		6.1		23.8	6	Error	
<hr/>							CEL8	
0.19	18.9	0.03	70.5	0.01	131.5	6		ימי אחסון
0.02	14.7	0.05	12.5	0.15	7.6	1		חזרות
	8.9		12.4		16.5	6	Error	

* המובהקות הסטטיסטית נעשתה בין ימי האחסון השונים לפי הרקמה הרלוונטית (אותיות a,b) על-פי מבחן

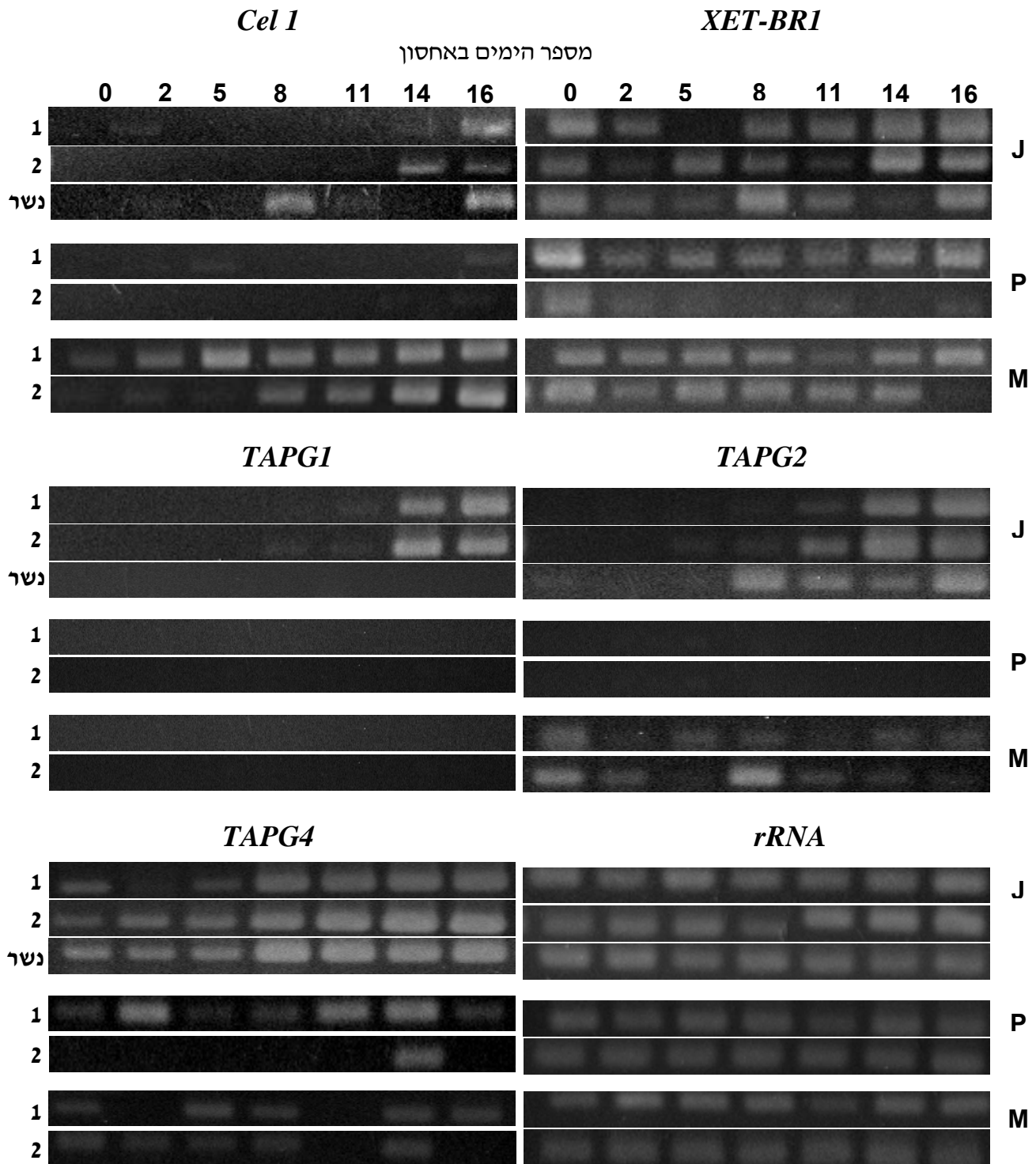
.Tukey-Kramer HSD



איור 8: רמת הביטוי של הגן *Cel5* במפרק העוקץ (A), קצה העוקץ (B), והמצעית (C) בדגימות של פרי שנשר לעומת דגימות של פרי שלא נשר לאורך האחסון. התוצאות הן ממוצע של שתי חזרות, למעט המיקרים בהם לא היתה כמות מספקת של דגימות להפקת רנ"א (בעיקר בדגימות של פירות שנשרו במהלך הימים המוקדמים של האחסון).



איור 9: רמת הביטוי של הגן *Cel8* במפרק העוקץ (A), קצה העוקץ (B), והמצעית (C) בדגימות של פרי שנשר לעומת דגימות של פרי שלא נשר לאורך האחסון. התוצאות הן ממוצע של שתי חזרות, למעט המיקרים בהם לא היתה כמות מספקת של דגימות להפקת רני"א (בעיקר בדגימות של פירות שנשרו במהלך הימים המוקדמים של האחסון).



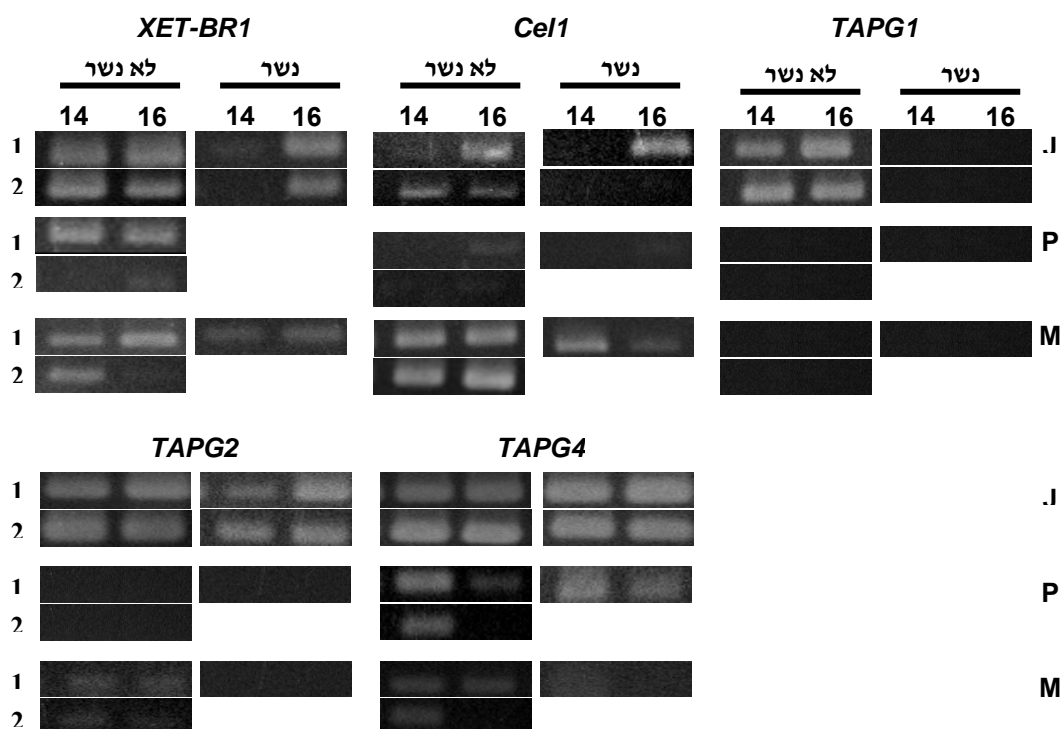
איור 10: רמת הביטוי של הגנים *Cell*, *XET-BR1*, *TAPG1*, *TAPG2*, *TAPG4* ו-*rRNA* במפרק העוקץ (J), קצה העוקץ (P), והמצעית (M). דגימות מרקמת מפרק העוקץ היו מפרי שלא נשר או נשר במהלך האחסון והניסוי נערך בסוף ינואר- תחילת פברואר. מהלך הנשירה של ניסוי זה מתואר באיור 1. תוצאות ה-RT-PCR מייצגות שתי חזרות של הפקת רני"א, למעט המיקרים בהם לא היה מספיק חומר צמחי להפקת חזרה נוספת ו/או אי-קבלת נשירה בימי אחסון מוקדמים ועל-כן מדגם הפרי שנשר הינו חלקי.

על-פי תוצאות אנליזת ה-RT-PCR (איור 10) ניתן לראות כי דגם הביטוי של ה-*rRNA* לא השתנה לאורך ימי האחסון ברקמות השונות. במפרק העוקץ ביטוי *Cell* עלה רק בזמני הבדיקה המאוחרים בימים 14 ו-16. ברקמת קצה העוקץ הביטוי היה חלש מאד יחסית למפרק העוקץ. לעומת זאת, במצעית הפרי הביטוי עלה באחת החזרות כבר עם תחילת האחסון. בפרי שנשר לא היה דגם ביטוי עקבי, אך נראתה עלייה בביטוי הגן כבר ביום ה-8 לאחסון.

לגבי הגן *XET-BR1* ניתן לראות ביטוי מתחילת האחסון בכל רקמות הניתוק השונות, למרות היעדר עיקביות בביטוי מבחינת החזרות וזמני הדגימה. למרות זאת, אפשר להבחין בביטוי חזק יותר במפרק העוקץ בזמני הדגימה המאוחרים.

בבחינת דגם הביטוי של הגנים השייכים למשפחת הפוליגלקטרונאזות, ניתן לראות כי יש הבדל בדגם ביטוי הגן *TAPG4* לשני הגנים האחרים *TAPG1* ו-*TAPG2*. בגנים הללו, הביטוי באתר מפרק העוקץ התקיים לאחר אחסון של 14 ו-16 יום. ביטוי של *TAPG2* התקבל גם בפרי שנשר כעבור 8 ימים באחסון. בקצה העוקץ גנים אלו לא באו לידי ביטוי ואילו במצעית הפרי לא היה ביטוי של *TAPG1* והביטוי של *TAPG2* היה לא עקבי.

רמת הביטוי של הגן *TAPG4* הייתה גבוהה יותר בהשוואה לשני הגנים האחרים מאותה המשפחה וניתן גם להבחין כי במפרק העוקץ ביטוי עלה כבר בתקופת האחסון המוקדמת. בקצה העוקץ ובמצעית הפרי, דגם הביטוי לא היה עקבי ובמצעית הפרי הביטוי היה חלש יחסית למפרק העוקץ.



איור 11: השוואה של רמת הביטוי של הגנים *XET-BR1*, *Cell1*, *TAPG1*, *TAPG2* ו-*TAPG4* ברקמות מפרק העוקץ (J), קצה העוקץ (P), והמצעית (M) שעברו ניתוק לעומת הרקמות שטרם עברו ניתוק. הניסוי נערך בתחילת פברואר. תוצאות ה-RT-PCR מייצגות שתי חזרות של הפקת

רנייא, למעט המיקרים בהם לא היה מספיק חומר צמחי להפקת חזרה נוספת ו/או אי-קבלת נשירה בימי אחסון מוקדמים ועל-כן מדגם הפרי שנשר הינו חלקי.

בחירת השוואת ביטוי הגנים רק בימים 14 ו-16 של האחסון של פרי שנשר לעומת פרי שלא נשר נעשתה מהסיבה שבתחילת האחסון לא התקבלה נשירה משמעותית במרבית רקמות הניתוק לשם איסוף חומר צמחי למטרת הפקת הרנא ובחינת ביטוי הגנים השונים. למעט הביטוי של *TAPG1*, לא התקבל הבדל מהותי בין דגם הביטוי במדגם הפרי שנשר בהשוואה למדגם הפרי שלא נשר.

בבחינת ההבדלים בין מדגמי הפרי שנשר למדגמי הפרי שלא נשר, ניתן לראות כי ביטוי *XET-BRI* (איור 11) במדגם הפרי שלא נשר עולה כבר ב-14 ימי אחסון בכל הרקמות, למרות היעדר העיקביות בין החזרות. במדגם הפרי שנשר נראה ביטוי בעיקר לאחר 16 ימים באחסון במפרק העוקץ, ובמצעית יש ביטוי גם לאחר 14 יום אם כי חלש.

לגבי הגן *Cell* ניתן לראות ביטוי במפרק העוקץ כבר ביום ה-14 לאחסון בפרי שלא נשר בעוד שבמדגם הפרי שנשר הביטוי עולה רק ביום ה-16 לאחסון ורק באחת מהחזרות. ברקמת קצה העוקץ לא ניתן לראות כלל ביטוי אך במצעית הפרי ביטוי הגן חזק בפרי שלא נשר, ובמדגם הפרי שנשר יש ביטוי ב-14 יום ודעיכה של הביטוי ביום ה-16 לאחסון, אך לא הייתה חזרה 2 שתאשר תוצאה זו.

בבחינת דגם הביטוי של הגנים השייכים למשפחת הפוליגלקטרונאזות, ניתן לראות גם כאן כי יש הבדל בדגם ביטוי הגן *TAPG4* לשני הגנים האחרים *TAPG2* ו-*TAPG1*. ביטוי של *TAPG1* התקבל רק במפרק העוקץ בפרי שלא נשר, לעומת ביטוי *TAPG2* נראה גם במדגם הפרי שנשר, ובנוסף נראה ביטוי חלש מאד במצעית באחת החזרות של מדגם הפרי שלא נשר.

רמת הביטוי של הגן *TAPG4* הייתה גבוהה יותר בהשוואה לשני הגנים האחרים מאותה משפחה וניתן להבחין שרמת ביטוי זו מתקבלת הן במדגם הפרי שנשר והן במדגם הפרי שלא נשר. לגבי רקמת קצה העוקץ בפרי שלא נשר מתקבל ביטוי ביום ה-14 לאחסון וביום ה-16 לא נראה ביטוי או שמתקבל ביטוי חלש מאד באחת החזרות, להבדיל ממדגם הפרי שנשר שיש ביטוי גם ביום ה-14 וגם ב-16 לאחסון. ברקמת המצעית נראה ביטוי חלש מאד בפרי שלא נשר לאחר 14 ימי אחסון ובאחת מהחזרות הביטוי נעלם ביום ה-16 לאחסון.

3.5.2 השפעת הטיפולים עם אוקסין ובשילוב עם 1-MCP על ביטוי הגנים השונים

רמות הביטוי של *Cel5* שהתקבלו במפרק העוקץ (איור A12) היו גבוהות במספר סדרי גודל בהשוואה לרמות הביטוי שהתקבלו ברקמת ניתוק קצה העוקץ (איור B12) ובהשוואה לביטוי של *Cel8* (איור B13). מהתוצאות ניתן לראות כי לאחר 7 ימי אחסון TPA גרם לאינדוקציה מסוימת של הביטוי בניסוי פברואר, אך לא בניסוי יולי. לאחר 14 יום באחסון הייתה עלייה חזקה מאד בביטוי של *Cel5* בביקורת הלא מטופלת. הטיפול ב-1-MCP הצליח לדכא את הביטוי של הגן באופן חלקי בניסוי פברואר, לעומת ניסוי יולי שבו הייתה הפחתה חזקה של הביטוי. בשני הניסויים, ובעיקר בניסוי יולי לאוקסין TPA הייתה השפעה מדכאת חזקה על ביטוי הגן. דגם הביטוי של *Cel8* (איור 13) במפרק העוקץ היה דומה בעקרון לדגם הביטוי שהתקבל ב-*Cel5*, אך כמו בדומה לאיור 9, רמת הביטוי הייתה נמוכה במספר בסדרי גודל בהשוואה ל-*Cel5*. כאשר בוחנים את ביטוי הגנים באתר ניתוק קצה העוקץ, ניתן לראות כי הביטוי של שני גנים אלו היה נמוך בהשוואה לביטוי במפרק העוקץ, אך באופן יחסי, הביטוי בביקורת הלא מטופלת לאחר 14 יום באחסון היה גבוה יותר. דגם הביטוי במצעית (איור C12,13) נבדק רק בניסוי שנערך ביולי והוא לא היה שונה באופן מהותי מביטוי הגנים בקצה העוקץ.

טבלה 11: (A) מבחן תחום מרובה של השפעות אוקסין ו-1-MCP על ביטוי הגן CEL 5 ברקמות השונות במועדי פברואר ויולי. (B) ניתוח השונות בכל רקמה לפי מועד הקטיפ.

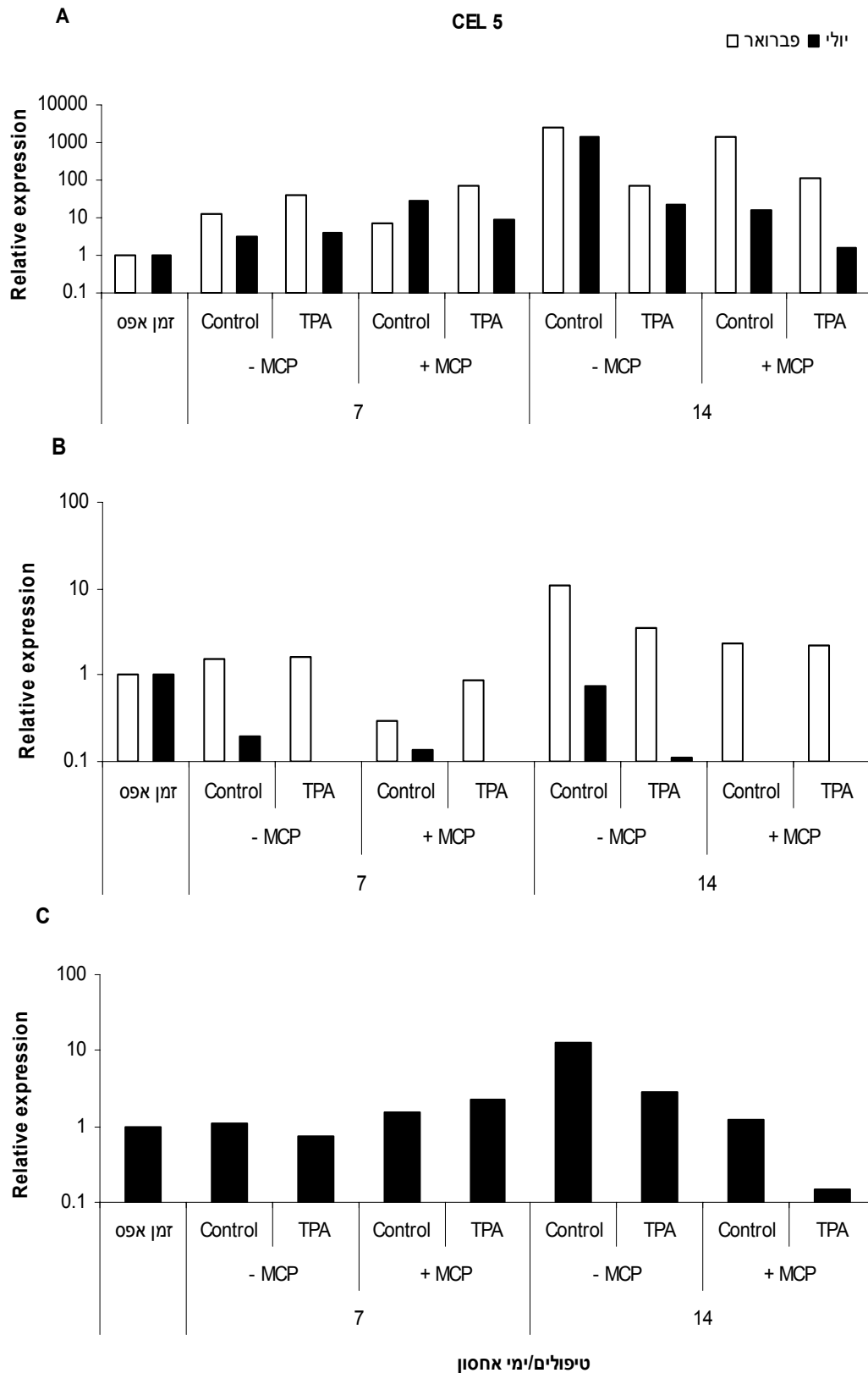
CEL 5										מקור השונות	ד"ח	ימים באחסון
מצעית		קצה העוקץ				מפרק העוקץ						
יולי		יולי		פברואר		יולי		פברואר		סוג טיפול		
-MCP	+MCP	+MCP	-MCP	-MCP	+MCP	-MCP	+MCP	-MCP	+MCP			
a	a	a	a	a	a	a	a	ab	a	Control	7	
a	a	a	a	a	a	a	a	ab	b	100 TPA		
b	ab	b	a	b	a	b	ab	a	a	Control	14	
b	a	a	a	ab	b	ab	a	a	a	100 TPA		
B												
P(F)	סר"ס	P(F)	סר"ס	P(F)	סר"ס	P(F)	סר"ס	P(F)	סר"ס	מקור השונות		
0.9	0.00005	0.4	1.3	0.05	43.2	0.7	0.97	0.0098	13.339	Auxin	7	
0.4	2.14245	0.1	5.1	0.33	6.9	0.2	9.03	0.9363	0.005	1-MCP		
0.7	0.59405	0.4	1.1	0.49	3.3	0.6	2.02	0.2336	1.225	Auxin*1-MCP	14	
	10.5578		5.5		22.6		19.71		2.493	Error		
0.014	14.2	0.021	1.445	0.0308	9.4	0.03	43.11	0.02	39.83	Auxin	14	
0.004	28.9	0.004	4.004	0.0047	28.4	0.02	53.30	0.94	0.01	1-MCP		
0.539	0.4	0.027	1.232	0.4278	0.7	0.35	4.02	0.44	1.85	Auxin*1-MCP	14	
	3.2		0.428		3.5		14.28		9.98	Error		

* המובהקות הסטטיסטית נעשתה בין הטיפולים השונים בכל מועד ניסוי לפי הרקמה הרלוונטית (אותיות a,b) על-פי מבחן Tukey-Kramer HSD.

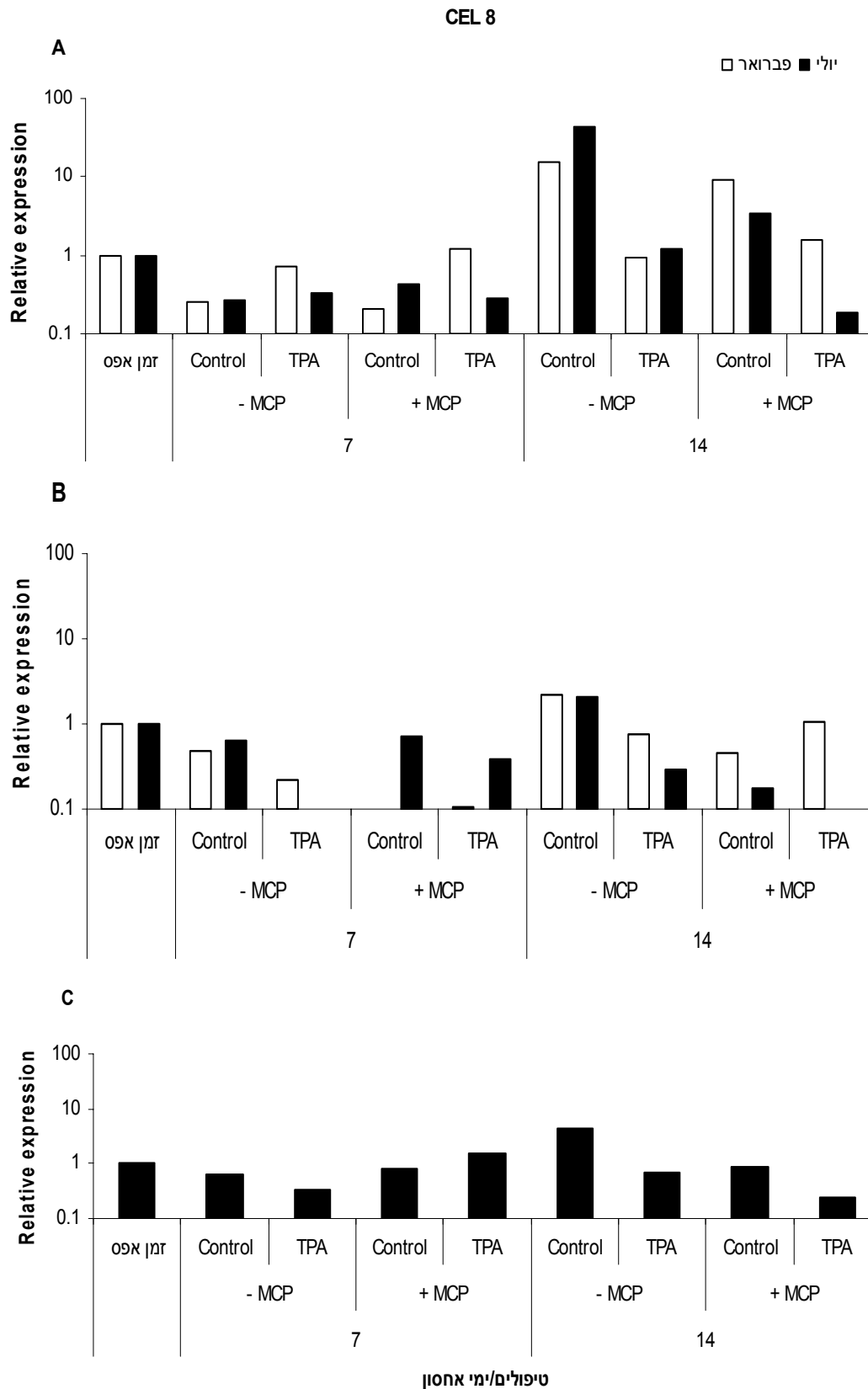
טבלה 12: (A) מבחן תחום מרובה של השפעות אוקסין ו-1-MCP על ביטוי הגן CEL 8 ברקמות השונות במועדי פברואר ויולי. (B) ניתוח השונות בכל רקמה לפי מועד הקטיפ.

CEL 8										מקור השונות	ד"ח	ימים באחסון
מצעית		קצה העוקץ				מפרק העוקץ						
יולי		יולי		פברואר		יולי		פברואר		סוג טיפול		
-MCP	+MCP	+MCP	-MCP	-MCP	+MCP	+MCP	-MCP	-MCP	+MCP			
a	a	a	a	c	a	a	a	a	a	Control	7	
a	a	a	a	bc	ab	a	a	a	a	100 TPA		
a	a	c	b	a	a	c	bc	a	a	Control	14	
a	a	b	a	a	a	ab	a	a	a	100 TPA		
B												
P(F)	סר"ס	P(F)	סר"ס	P(F)	סר"ס	P(F)	סר"ס	P(F)	סר"ס	מקור השונות		
0.9	0.006	0.07	8.5	0.829	0.01	0.9	0.05	0.07	8.06	Auxin	7	
0.1	3.266	0.19	3.7	0.003	8.56	0.8	0.15	0.80	0.09	1-MCP		
0.2	1.829	0.26	2.5	0.035	2.14	0.7	0.44	0.53	0.63	Auxin*1-MCP	14	
	3.995		5.8		0.87		14.32		5.44	Error		
0.04	10.01	0.0019	11.3	0.8	0.05	0.003	44.05	0.02	22.91	Auxin	14	
0.07	7.15	0.0007	19.6	0.3	1.38	0.010	20.22	0.91	0.02	1-MCP		
0.58	0.40	0.2274	0.4	0.1	3.84	0.561	0.39	0.56	0.73	Auxin*1-MCP	14	
	4.50		0.9		3.82		3.86		7.12	Error		

* המובהקות סטטיסטית נעשתה בין הטיפולים השונים בכל מועד ניסוי לפי הרקמה הרלוונטית (אותיות a,b) על-פי מבחן Tukey-Kramer HSD.



איור 12: השפעת טיפולים באוקסין ו-1-MCP על רמת הביטוי של *Cel5* במפרק העוקץ (A), העוקץ (B) והמצעית (C) לאחר 7 ו-14 ימי אחסון ב-12°C ובלחות יחסית של 95%. טיפולי האוקסין TPA ניתנו במינון של 100 ח"מ והחשיפה ל-1-MCP הייתה במינון של 0.5 ח"מ למשך 22 שעות. התוצאות הן ממוצע של שתי חזרות לכל רקמת ניתוק. זמן אפס משמעו יום הקטיף.



איור 13: השפעת טיפולים באוקסין ו-1-MCP על רמת הביטוי של *Cel8* במפרק העוקץ (A), העוקץ (B) והמצעית (C) לאחר 7 ו-14 ימי אחסון ב-12°C ובלחות יחסית של 95%. טיפולי האוקסין TPA ניתנו במינון של 100 ח"מ והחשיפה ל-1-MCP הייתה במינון של 0.5 ח"מ למשך כ-22 שעות. התוצאות הן ממוצע של שתי חזרות לכל רקמת ניתוק. זמן אפס משמעו יום הקטיף.

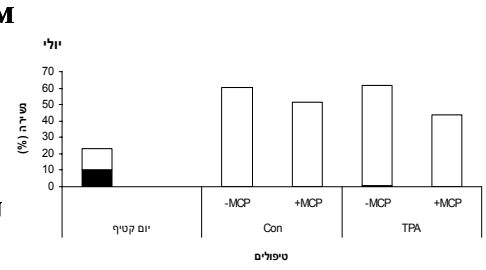
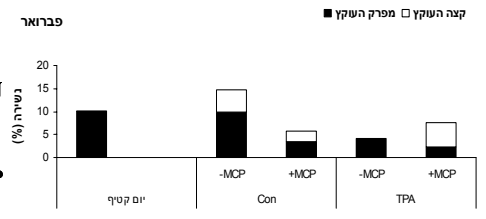
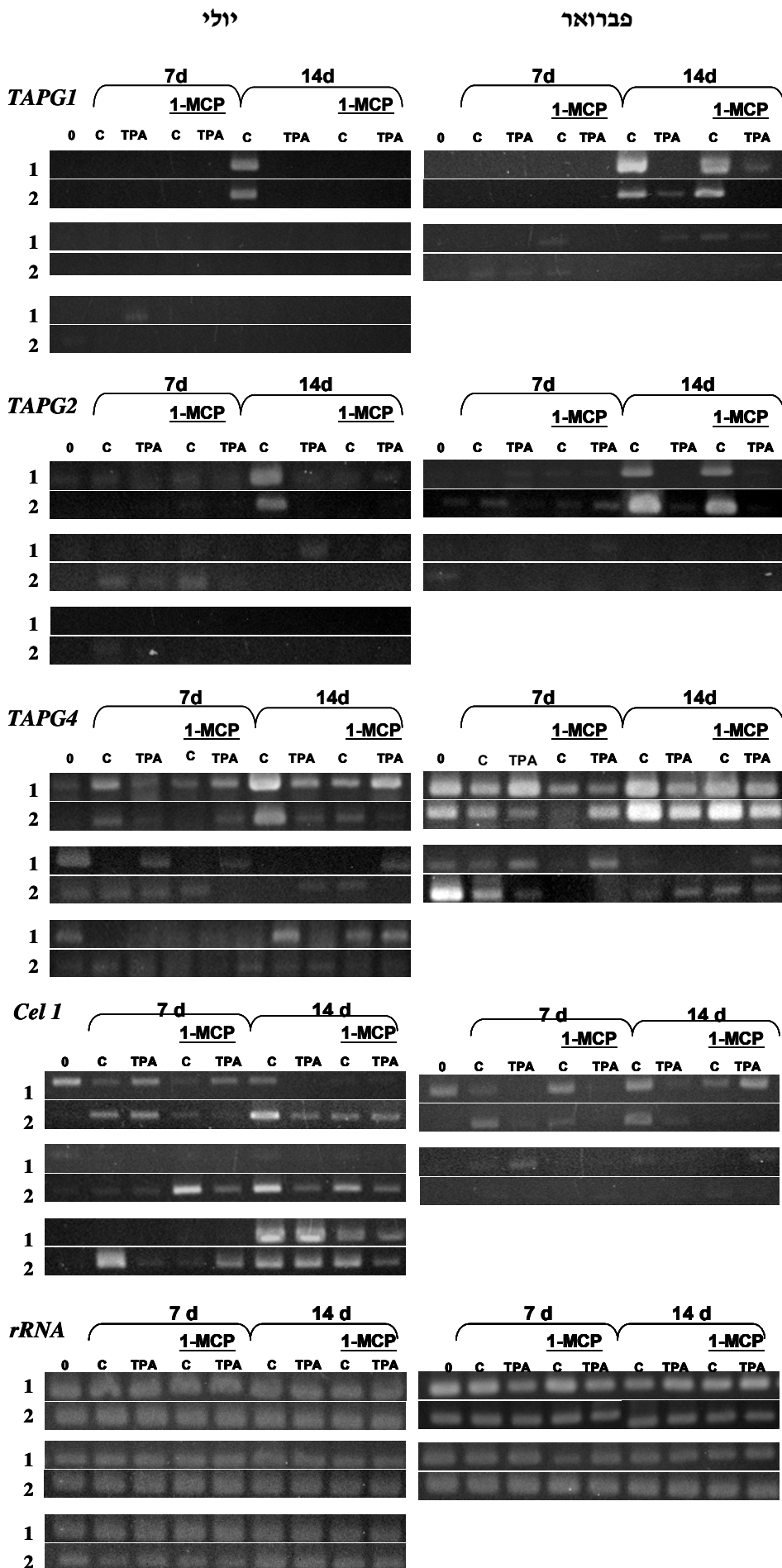
בבחינת תוצאות ה-RT-PCR (איור 14) של הגנים השייכים למשפחת הפוליגלקטרונאזות ניתן לראות כי דגם הביטוי שמתקבל על-ידי *TAPG1* ו-*TAPG2* היה דומה מאד כאשר לאחר 14 ימי אחסון בביקורת (C) התקבלה תמיד רמת ביטוי גבוהה. בניסוי פברואר התקבלה גם רמת ביטוי גבוהה בדגימות אשר נחשפו ל-1-MCP. בבחינת דגם הביטוי של *TAPG4* בניסוי פברואר נראתה רמת ביטוי גבוהה של הגן באתר ניתוק מפרק העוקץ מתחילת האחסון. נראה שיש עיכוב מסוים של הביטוי על ידי 1-MCP לאחר 7 ימים באחסון והשפעה מסוימת של הטיפול ב-TPA לאחר 14 יום. דגם הביטוי בניסוי יולי היה שונה כאשר הביטוי החזק ביותר היה בביקורת הלא מטופלת לאחר 14 ימים באחסון. דגם הביטוי של *TAPG4* באתר הניתוק של העוקץ והמצעית לא היה עקבי.

כאשר בוחנים את דגם הביטוי של *Cell*, ניתן לראות כי בהשוואה למשפחת הפוליגלקטרונאזות הביטוי של גן זה אינו עיקבי בין החזרות השונות. עיכוב הביטוי במפרק העוקץ של *Cell* בניסוי פברואר התקבל על ידי TPA כבר לאחר 7 ימי אחסון ולאחר 14 ימים באחסון. בקצה העוקץ היה ביטוי חלש ולא הייתה אחידות בין החזרות. בניסוי יולי התגובות של מפרק העוקץ וקצה העוקץ לטיפולים לא היו חד-משמעיות. לעומת זאת, במצעית הפרי ניכר שיש השפעה מעכבת של 1-MCP ו-TPA על הביטוי והשפעה חזקה יותר של הטיפול המשולב.

בבחינת דגם הביטוי המתקבל על-ידי rRNA, ניתן לראות כי כצפוי, החשיפה לטיפול האוקסין וה-1-MCP לא גרמו להבדלים בביטוי.

A

B



איור 14: (A) השפעת טיפולי אוקסין ו-1-MCP על רמת הביטוי של TAPG1, TAPG2, TAPG4, Cel1, ושל rRNA במפרק העוקץ (J), קצה העוקץ (P) והמצעית (M) לאורך האחסון בניסויים שנערכו בפברואר וביוולי. הטיפול עם האוקסין TPA נעשה במינון של 100 ח"מ, החשיפה ל-1-MCP נעשתה במינון של 0.5 ח"מ ולמשך כ-22 שעות. בדיקת השפעת הטיפולים נעשתה על דגימות להפקת רני"א שנלקחו ביום ה-7 (7d) וה-14 (14d) לאחסון בהשוואה לביטוי שהתקבל ביום הקטיף (0). תוצאות ה-RT-PCR מייצגות שתי חזרות של הפקת רנ"א לכל רקמת ניתוק. (B) ממוצע אחוזי הנשירה במועדי פברואר ויולי כתוצאה מטיפול אוקסין ו-1-MCP.

4. דיון

הצלחת שיווק עגבניות הצירי באשכולות בארץ ובשווקי חוץ מותנית בכך שהאשכול יגיע לשווקים כיחידה אחת - כשהפירות מחוברים לשזרת האשכול. מופע מעורב של פירות עגבנייה נפרדות שנשרו ואשכולות יחדיו משדר חוסר טריות של התוצרת. הבנת תהליך נשירת הפרי ומהלך פעולת הגורמים המעכבים הבשלה או נשירה כדוגמת 1-MCP עשויים להיות לעזר בפיתוח טיפולים מסחריים לאחר הקטיף, אשר יעכבו את הבשלת ונשירת הפרי ויאריכו את חיי המדף. כמו כן, הבנת המנגנונים המולקולריים של מהלך הנשירה והשפעת טיפולים המעכבים או מעודדים הבשלה/נשירה, מקדמת את הפיתוח של זנים חדשים של עגבניות צ'רי באשכולות, שנשירתם מופחתת והבשלתם איטית.

4.1 מהלך הנשירה בעגבניות צ'רי באשכולות

4.1.1 מהלך הנשירה בעגבניות צ'רי באשכולות לאורך האחסון

התוצאות המתארות את הקינטיקה של הנשירה במהלך האחסון (איור 1 - ניסוי פברואר) מצביעות על תהליך דו-שלבי: בשלב הראשון נראית נשירה מעטה, שעיקרה ב-8 הימים הראשונים לאחסון והשלב השני, המאופיין על-ידי נשירה רבה שמתרחשת בימים 14-16 לאחסון. תוצאות ניסוי זה תואמות לדגם נשירת הפרי שהתקבל בניסויים קודמים במעבדה בעונת החורף, למרות שזה לא הדגם היחיד שהתקבל בעבר. דגם נשירה זה יכול להיות תוצאה של תהליך התפתחותי הדרגתי או כתוצאה מתהליך הבא לידי ביטוי בשלב מסוים באחסון. כפי שיוכח בהמשך הדיון, לדגם זה יש גם גיבוי ברמת ביטוי גנים ברקמות הניתוק. באפיון התפלגות הנשירה על-פי אתר הניתוק, מתקבלת גם כאן התאמה בין התוצאות לתוצאות ניסויים קודמים שהתבצעו במעבדה ולתוצאות שפורסמו בעבר על זן עגבניות הצירי R-819 (Lichter et al., 2006). נשירת הפרי התבצעה בעיקר דרך אתר הניתוק של מפרק העוקץ, התפלגות נשירה האופיינית לקטיפי חורף. החל מהיום ה-14 לאחסון ניתן לראות גם נשירה דרך אתר ניתוק העוקץ. מרכיב זה של הנשירה יכול להיות הן כתוצאה מהתגברות בביטוי גנים האחראים לנשירה בקצה העוקץ או כתוצאה מהתייבשות הרקמה (Dvir et al., submitted).

4.1.2 השפעת טיפולי האוקסין וה-1-MCP לאחר הקטיף על מהלך הנשירה

בעבודה זו נבחנה השפעת מתן אוקסין אקסוגני ו-1-MCP לאחר הקטיף על נשירת הפרי בזן 1335 במהלך עונת השנה.

הדיעה הרווחת היום בספרות המחקרית היא שמתן אוקסין אקסוגני מעכב נשירה ברוב המערכות (van Doorn and Stead, 1997). ידוע על מספר מחקרים שהראו כי יישום אוקסין חיצוני מסוגל למנוע או לעכב את נשירת הפרחים בתפוח, קרנית (*Mirabilis jalapa*), ביגוניה, דובדבן, צסטרום, עגבניה ועוד (Roberts et al., 1984; van Doorn and Stead, 1997; Meir et al., 2003; Abebie et al., 2008). בבחינת תוצאות הקדמיות של ניסוי שנערך בעונת החורף, בו נבדק יישום של אוקסינים סינתטיים שונים – 2,4-DP, 3,5,6-TPA ו-NAA – בשני מינונים שונים נראה כי

השפעת ה-TPA בעיכוב הנשירה הייתה המשמעותית מבין השלושה, ועל-כן הוחלט להשתמש בסוג אוקסין סינתטי זה להמשך הניסויים במינונים שונים בהשוואה ל-NAA במינון של 50 ח"מ. מתוצאות הניסויים (איור 2) ניתן לראות כי יש מקרים של עיכוב של הנשירה על ידי TPA בהשוואה לקבוצת הביקורת, אך אין עקביות בין הניסויים ו/או במינונים השונים של ה-TPA. עיכוב נשירה מירבי, אם כי לא מובהק, נראה ביישום של 100 ח"מ של TPA, אך רק בשניים מהניסויים שנערכו בפברואר ומאי. כמו כן, נראתה השפעה שונה של יישום האוקסין בקטיף חורף לעומת הקיץ: בניסוי פברואר נראה כי האוקסין גרם להפחתה בנשירה בשלושה מתוך ארבעה טיפולים, לעומת מועד יולי שבו לא נראתה השפעה חיובית באף אחד מטיפולי האוקסין. ייתכן כי הסיבה העיקרית להיעדר השפעת האוקסין על הנשירה בקיץ היא העובדה שנשירה זו מאופיינת בנשירה דרך אתר ניתוק העוקץ, שעיקרה היא כתוצאה מהתייבשות גבוהה של הרקמה (Dvir et al., submitted). על פי התוצאות שהוצגו בעבודה זו, אתר זה מתאפיין בהעדר ביטוי או ביטוי מוחלש של הגנים שנבדקו והוא רגיש יותר לשבירה מכנית כתוצאה מהמבנה המרחבי שלו. גורם אפשרי נוסף לחוסר ההשפעה המוחלט של טיפול האוקסין בתקופת הקיץ יכול לנבוע ממעבר פגוע של אוקסין בצמח כך שהאוקסין אינו מגיע לאתרי הניתוק או כתוצאה מיישום מאוחר של ההורמון והחמצת חלון ההזדמנויות של השפעתו על נשירת הפרי, כך שהשפעת העיכוב כתוצאה מהטיפול אינה באה לידי ביטוי. ישנה אפשרות נוספת של מטבוליזם מהיר בתקופה זו וחיבור לתרכובות לא פעילות שמונעות את השפעת המולקולה החופשית (Blanus et al., 2005; Rechenmann and Napier, 2005; Abebie et al., 2008). מאידך, תוצאות העבודה המולקולרית מצביעות על עיכוב ביטוי הגנים גם בתקופת הקיץ כתוצאה מיישום אוקסין כך שהשפעת אוקסין קיימת. יש לציין שהתגובות למינונים משתנים של אוקסין יכולות להיות מורכבות: בספרות דווח גם על מיקרים בהם אוקסין הגביר את הנשירה במקום לעכבה וכמו-כן ידוע כי אוקסין בעודף מגביר את ייצור האתילן ועל-ידי כך יכולה להתקבל עלייה בנשירה או בהבשלה (van Doorn and Stead, 1997; Taylor and Whitelaw, 2001). עם זאת, יש לציין כי מבחינת אנליזה סטטיסטית ליישום אוקסין לא הייתה השפעה מובהקת של עיכוב באף אחד ממועדי הניסוי.

1-MCP מהווה תכשיר מסחרי יעיל כמעכב הבשלה ומשפר את האיכות של פירות קלימקטריים רבים באחסון כדוגמת בננות (Golding et al., 1999), תפוחי-עץ (Watkins et al., 2000), אבוקדו (Hershkovitz et al., 2005) ועוד. כמו כן, דווח בספרות שיש ביכולתו לעכב נשירת פרי של עגבניות צ'רי (Beno-Moualem et al., 2004; Lichter et al., 2006) ושל עלי כותרת של פרחי הפלרגוניום (Cameron and Reid, 2001). השפעת יישום 1-MCP לבדו הפחיתה את הנשירה ב-50-60% בניסויים שנערכו בפברואר, מרץ ומאי לעומת הפחתה של 15% ביולי. ההפחתה ביעילות השפעתו של 1-MCP כנראה וקשורה במעבר מנשירה דרך אתר ניתוק מפרק העוקץ בתקופת החורף לנשירה דרך אתר ניתוק העוקץ בעונת הקיץ (Lichter et al., 2006). נראה כי אתר ניתוק העוקץ מצביע על רגישות חלקית או נמוכה יותר לאתילן בהשוואה לאתר ניתוק מפרק העוקץ כפי שמוכח בתוצאות ניסוי מאי שבו קיימת נשירה דרך שני אתרי הניתוק, אך 1-MCP הפחית את

הנשירה דרך מפרק העוקץ ב-79% לעומת הפחתה של 42% דרך אתר ניתוק העוקץ וזאת למרות שהנשירה ברובה נעשתה דרך אתר זה.

בבחינת האפקט המשולב של יישום אוקסין ו-1-MCP יחדיו לא מתקבלת מגמה אחידה מבחינת השפעת עיכוב נשירה נוספת, למעט מיקרים בודדים כמו בטיפול של 50 ח"מ TPA במשולב עם 1-MCP שבו נראה עיכוב נוסף של הנשירה בשלושה מתוך ארבעת הניסויים בהשוואה ליישום האוקסין לבדו, אם כי מובהקות סטטיסטית התקבלה רק בתוצאות מועד פברואר. עיכוב פעולת אתילן או יישום אוקסין מעכבים, אמנם, נשירה של איברי צמח שונים במערכות שונות (van Doorn and Stead, 1997; Beno-Moualem et al., 2004; Rungruchkanont et al., 2007; Abebie et al., 2008; Jiang CZ, 2008), אך יישום משולב שלהם לאו דווקא יגרום לעיכוב מוגבר של הנשירה. ייתכן ופעולת אוקסין לעיכוב הנשירה מצוייה במורד מסלול האתילן, כך שחסימה יעילה של המסלול באמצעות 1-MCP עלולה לבטל את פעולת עיכוב הנשירה המתקבלת כתוצאה מיישום אוקסין אקסוגני. למשל, נמצא כי יישום של 1-MCP בפרחי סחלב (*Dendrobium(cv. Miss Teen)*) לפני יישום מעכבי האוקסין TIBA ו-CMPA גרם לביטול האפקטים של יישום מעכבי האוקסין בלבד, דהיינו עיכוב נשירה. ממצאים המרמזים על כך שמעכבי אוקסין אלו משפיעים על הנשירה דרך פעולת האתילן (Rungruchkanont et al., 2007). נמצא גם כי יישום האוקסין NAA על עלי איקסורה (*Ixora coccinea*) מנע את נשירתם כתוצאה מעקת קור, אך לא מנע את ייצור האתילן וצבירתם של ACC ו-MACC. באותו מחקר נבדקה גם השפעת 1-MCP ואנטיאוקסידנטים על נשירת העלים ונמצא כי יישום לפני עקת הקור או מיידית לאחריה מעכבת נשירה זו. תוצאות אלו מעלות את האפשרות כי תהליכי חימצון משפיעים על נגישות אוקסין לרקמת הניתוק והעלאת הרגישות לאתילן (Michaeli et al., 1999a, 1999b).

4.1.3 בחינת פרמטרים שונים של מערך הניסוי

יישום האוקסינים השונים נעשה בנוכחות משטח מסוג Triton-X ליעול החדרת האוקסין לרקמה. בנוסף, 1-MCP בהיותו גז מצריך יישום בתוך מיכל סגור ועל כן נבחנו השפעות המשטח והסגירה בתוך מיכל סגור על נשירת הפרי (איור 3). ביום הקטיפה התקבלה מגמת נשירה יציבה למדי בחודשי פברואר-מאי בתחום שבין 10-16% להבדיל מחודש יולי שהראה נשירה מוגברת של 23% נשירה (איור 2). תופעה זו לא מפתיעה מאחר ומדובר בעונות חמות ושכיחות תנאי האקלים השרביים עולה, כך שיתכנו עקות יובש וחום המעודדות בין השאר, על-פי הספרות, ייצור מוגבר של אתילן ונשירה מוגברת (Taylor and Whitelaw, 2001; Lurie and Mitcham, 2007). אם כי נושא זה לא נבדק במסגרת העבודה, והעובדה כי יישום 1-MCP בקיץ לא גרם לעיכוב אינה מחזקת את השערה זו. עלייה באחוזי הנשירה התקבלה גם בכלל הניסוי של מועד יולי בהשוואה לשאר מועדי הניסויים האחרים (איור 2). ניתן לייחס את העלייה באחוזי הנשירה במועד הקיץ להתפלגות הנשירה של אתרי הניתוק, המשתנה בין תקופת החורף שמאופיינת בנשירה בעיקר דרך מפרק העוקץ לתקופת הקיץ, שבה הנשירה נעשית בעיקר דרך אתר ניתוק העוקץ. פורסם בעבר על מתאם בין השינוי באתר הנשירה בעגבניות צרי באשכולות לחשיפת הגידול לתנאי אקלים

קיצוניים כדוגמת חמסינים (Lichter et al., 2006), אך במקרה של ניסוי זה לא דווח על תנאי חמסין לפני הקטיף. על-פי ניסויים קודמים במעבדה של בחינת השתנות הלחות היחסית של חדרי האחסון על הנשירה נמצא כי בלחות יחסית נמוכה של כ-50% התקבל מעבר מובהק מנשירה המאופיינת בעיקר על-ידי מפרק העוקץ לנשירה מאתר ניתוק העוקץ (Dvir et al., submitted). מעבר לכך, דווח בספרות כי איבוד מים לאחר הקטיף באפרסמון (Nakano et al., 2003) גרם להגברת ייצור אתילן, הידוע כהורמון המעודד הבשלה והזדקנות הפרי. אך בדומה לעיל, נושא זה לא נבדק והיעדר העיכוב בקיץ כתוצאה מיישום 1-MCP לא מחזקת טענה זו של נשירה מוגברת כתוצאה מעלייה בייצור אתילן. בבחינת תנאי הלחות היחסית וטמפ' חדר האחסון של ניסוי זה לא נראתה חריגה מהתנאים האופטימליים לאחסון – לחות יחסית גבוהה של 95% וטמפ' נמוכה של 12°C. ידוע כי אחסון בלחות גבוהה מפחית את אובדן משקל הפרי ושומר על רעננות השזרות, כך שגמישות רקמות הניתוק נשמרת והנשירה כתוצאה משבירה מכנית, האופיינית לאתר ניתוק העוקץ, נמנעת.

על פי התוצאות, לא התקבלה מובהקות סטטיסטית (איור 3, טבלה 4) למגמת הירידה, כביכול, שנראית בנשירה הכללית כתוצאה מהריסוס עם המשטח. בספרות דווח על מיקרים בהם נוכחות משטח ביישום אוקסין כריסוס היה רעיל לצמח ולכן גרם דווקא להגברה בייצור אתילן ולנשירה מוגברת (van Doorn and Stead, 1997), אך לא צוין מקרה הפוך בו הייתה השפעה חיובית של משטח על הנשירה. כצפוי, לא התקבלה השפעה על הנשירה של סגירת האשכולות במיכל ל-22 שעות.

4.2 דגם ביטוי הגנים במהלך הנשירה

מספר משפחות גנים של אנזימים הידרוליטיים ידועות כמעורבות בתהליכי הבשלה ונשירה של פירות העגבנייה. משפחת הפוליגלקטורנאזות (polygalacturonases) הכוללת תשעה גנים (Hong et al., 2000), משפחת הצלולאזות (endo- β -1,4-glucanase) הכוללת שמונה גנים (Benoit et al., 2004), ומשפחת הקסילוגלוקן אנדוגליקוזילאז (Xyloglucan Endotransglycosylase) הכוללת חמישה גנים (Catala et al., 2001; Chanliaud et al., 2004). השערת המחקר הייתה שהבנת דגם הביטוי המולקולרי של גנים מקבוצות אלו עשויה לתרום להבנת תהליך הנשירה בעגבניות.

4.2.1 ביטוי הגנים לאורך האחסון

רמות הביטוי היחסיות של הגנים *Cel5*, *Cell* ו-*Cel8*, המייצגים את משפחת הצלולאזות (איורים 10,9,8) נבחנו לאורך האחסון במועד פברואר, אשר אופיין בנשירה מרובה דרך אתר ניתוק מפרק העוקץ. דגם הביטוי של *Cel5* ו-*Cel8* שהתקבל בניסוי זה מצוי במתאם עם ניסויים קודמים שנערכו במעבדה. ביטוי שלושת גנים אלו מתאים לדגם הנשירה שהתקבל בניסוי (איור 1), אשר הצביע על אחוזי נשירה גבוהים החל מהיום ה-14 לאחסון. דגם נשירה זה, המאפיין לרוב נשירה של עונת חורף כפי שנצפה בניסויים קודמים במעבדה, הוא אחד מדגמי נשירה רבים המשתנים

בהתאם להשפעות העונתיות. מעניין לציין כי לא התקבל ביטוי משמעותי של אף אחד מהגנים הנ"ל כאשר התקבלה נשירה שרמטה הייתה מתחת ל-10%, וייתכן כי נשירה זו אינה קשורה בגורמים אנזימטיים אלא מושפעת מכוחות מכניים-פיזיקליים שבאים לידי ביטוי באופן הטיפול בתוצרת חקלאית שלאחר הקטיף. במקביל לפרסומים קודמים (Beno-Moualem et al., 2004), שני הגנים - *Cell* ו-*Cel5* לא התבטאו ביום הקטיף באתר ניתוק מפרק העוקץ של פרי עגבניית הצירי וביטויים עלה בשלבים הקריטיים של הנשירה לאחר הקטיף. כמו כן, דווח כי ביטוי *Cel8* עלה ביום הקטיף אך הוא ירד במהלך האחסון (Beno-Moualem et al., 2004), ממצא העומד בניגוד לתוצאות מחקר זה. הסברים אפשריים להבדלים בדגם הביטוי יכולים להיות ברמת הזן (1335 במחקר הנוכחי ו-R-819 במחקר מ-2004) או בעונה (פברואר במחקר הנוכחי, או מאי במחקר מ-2004).

ביטוי הגנים *TAPG1*, *TAPG2* ו-*TAPG4* השייכים למשפחת הפוליגלקטורנאזות אובחן באתרי ניתוק של פרחים, עלים ופירות העגבנייה (Kalaitzis et al., 1997b; Hong et al., 2000). על-פי תוצאות אנליזת הביטוי של גנים אלו התקבל דגם ביטוי המאופיין בכך ש-*TAPG4* מתבטא מוקדם יותר בהשוואה לשני הגנים האחרים, *TAPG1* ו-*TAPG2*. דגם ביטוי שכזה נראה גם באתרי הניתוק של עלים ופרחים (Kalaitzis et al., 1997b). ביטויים של הגנים *TAPG1* ו-*TAPG2* התקבל לאחר 14 ימי אחסון באתר ניתוק מפרק העוקץ, להבדיל מדגם הביטוי של *TAPG4* שהופיע כבר בימי האחסון המוקדמים ורמתו עלתה משמעותית החל מהיום ה-8 לאחסון. באתר ניתוק העוקץ לא התקבלה עיקביות בביטוי שלושת הגנים, וברקמת המצעית נראתה רמה בסיסית של ביטוי הגנים *TAPG2* ו-*TAPG4* לאורך האחסון עם ביטוי חזק יחסית של *TAPG2* ביום הקטיף. תוצאות אנליזת הביטוי של הגנים *TAPG1* ו-*TAPG2* תואמות את מהלך הנשירה שהתקבל בניסוי (איור 1) ובו אחוזי נשירה גבוהים החל מהיום ה-14 לאחסון. דגם הביטוי של *TAPG4* המופיע מתחילת האחסון ייתכן ומסביר את קבלת הנשירה הנמוכה שנראית בימים המוקדמים של האחסון. על פי השערות בספרות (Kalaitzis et al., 1997b; Hong et al., 2000) יש אפשרות כי ביטוי של *TAPG4* מראשית האחסון מהווה סימן ראשוני לתחילתו של תהליך הנשירה הכולל עלייה בימים מאוחרים יותר של הגנים *TAPG1* ו-*TAPG2* ואף ייתכן של הגנים ממשפחת הצלולאזות. החוקרים Thompson ו-Osborne (Thompson and Osborne, 1994) השתמשו במניפולציה כירורגית, שבה נחתך צבר הצינורות (stele) בשכבת הקורטקס שבאתרי הנשירה של עלי הקטנית (*Phaseolus vulgaris* L.). המסקנות מניסויים אלו היו שצבר צינורות זה עשוי להיות אחראי לשליחת אותות לתחילת תהליך הניתוק לקורטקס מסביב. הם שיערו שיש שחרור של אוליגוסכריד מתאי הדופן של ה-stele שייתכן ומשמש כאות לתאי הקורטקס להתחיל את תהליך הניתוק בין תאים. הביטוי של *TAPG4* בתחילת האחסון תואם אפשרות שהוא יכול להיות מעורב ביצירת סיגנל לנשירה (Kalaitzis et al., 1997b). מצד שני, אין מידע על ביטוי הגן לפני הקטיף וניתן יהיה להוכיח השערה זו רק באמצעות עיכוב או ביטוי ביתר

של הגן ובחינת השפעתו על ביטויים של הגנים האחרים ממשפחת הפוליגלקטרונאזות והצלולאזות ועל תהליך הנשירה.

בבחינת דגם הביטוי של הגן *XET-BRI* ניתן לראות כי באופן כללי, אין עקביות של ביטוי גן זה ברקמות הניתוק השונות מבחינת החזרות וזמני הדגימה, אך ישנן מספר מגמות הראויות לציון – באתר ניתוק מפרק העוקץ התקבל ביטוי מתחילת האחסון ולאחר 14 ימי אחסון נראתה עלייה ברמת הביטוי. ביטוי חזק יחסית של הגן נראה ביום הקטיפה באתר ניתוק העוקץ וברקמת המצעית התקבל ביטוי מסוים מתחילת האחסון שאינו השתנה לאורך הימים באחסון. עד כה דווח בספרות כי פעילות וביטוי גן זה קשורה בעיקר בהבשלת פירות (Redgwell and Fry, 1993; Maclachlan and Brady, 1994; Arrowsmith and Desilva, 1995; Rose and Bennett, 1999) וזה יכול להיות המקור לביטוי הגן ברקמת המצעית. לאחרונה נראתה עלייה בביטוי של גן ממשפחת זו באזורי ניתוק של עלי קלמנטינה בהשפעת אתילן (Agusti et al., 2008). בתוצאות הנוכחיות לגבי ל-*XET-BRI* אין בכדי לבסס או לבטל את האפשרות שגן זה או גנים נוספים ממשפחת הקסילוגלוקן אנדוגליקוזילאז (Campbell and Braam, 1999) משתתפים בתהליכי הנשירה.

בעבודה בוצעה גם השוואה של רמת הביטוי של הגנים השונים ברקמות ניתוק שעברו נשירה במהלך בדיקת הנשירה לעומת רקמות ניתוק שלא נשרו בעקבות הבדיקה. בבחינת ההבדלים בין ביטוי הגנים *Cel5, Cell* ו-*Cel8* במדגם פירות שנשרו לעומת המדגם שייצג פירות שלא נשרו ניתן לראות כי ביטוי שלושת הגנים נראה כבר ביום ה-8 לאחסון באתר ניתוק מפרק העוקץ ורמתו גבוהה יותר בהשוואה לרמת הביטוי המתקבלת על-ידי מדגם הפרי שלא נשר. אך בימים מאוחרים יותר של האחסון רמת הביטוי של מדגם הפרי שנשר נשארה נמוכה ויציבה למדי בהשוואה למדגם הפרי שלא נשר, וייתכן כי ביטוי הגנים בפרי שנשר מצוי במגמת ירידה. ביטוי מוקדם ברקמת מפרק העוקץ במדגם הפרי שנשר היה גם של הגן *TAPG2*, להבדיל מ-*TAPG1* שלא התבטא כלל במדגם זה ושל *TAPG4*, אשר לא הראה הבדל במגמת הביטוי במפרק העוקץ בין מדגם הפרי שנשר לזה שלא אלא רק בעוצמת הבנדים. ברקמות המצעית והעוקץ לא התקבלה מגמת ביטוי מסויימת ומרבית הגנים הראו רמת ביטוי נמוכה. עם זאת, יש לציון כי באתר ניתוק העוקץ התקבל ביטוי גבוה יחסית במדגם הפרי שנשר של הגנים *Cel5* ו-*Cel8* לאחר 16 יום אחסון. (יש לזכור כי בדיקת הביטוי ברקמות העוקץ והמצעית התאפשרה רק החל מהיום ה-14 לאחסון מאחר ולא היה מספיק חומר צמחי להפקה בימים המוקדמים של האחסון). לגבי ביטוי הגן *XET-BRI* לא נראתה מגמת ביטוי מסויימת הראוייה לציון בשלוש הרקמות שנבדקו.

באופן כללי, מתקבל דגם ביטוי מסויים במדגם הפרי שנשר של הגנים המאופייני במרבית המיקרים על אנליזת ביטוי מתוצאה אחת בלבד. זאת מאחר ולא היה מספיק חומר צמחי להפקת חזרה נוספת או כתוצאה מאי-קבלת נשירה בימי אחסון מוקדמים ועל-כן מדגם הפרי שנשר הינו חלקי.

אך למרות הקושי באימות תוצאות דגם הביטוי שהתקבל, ניתן לאפיין את הביטוי באתר ניתוק מפרק העוקץ ולומר שישנה עלייה של הגנים השונים במועד בדיקה מוקדם יותר בהשוואה לביטוי שהתקבל במדגם הפרי שלא נשר. תוצאה המאמתת את ההשערה כי הנשירה דרך אתר ניתוק

מפרק העוקץ אינה אקראית ותלוייה בביטוי של גנים ממשפחות שונות לשם תחילת תהליך הניתוק.

4.2.2 השפעת הטיפולים באוקסין וב-1-MCP לאחר הקטיף על ביטוי הגנים

רמת הביטוי של הגנים השייכים למשפחות הצלולאזות והפוליגלקטרונאזות נבדקה גם תחת השפעת טיפולי TPA במינון של 100 ח"מ, טיפולי 1-MCP וטיפול המשלב יישום של TPA ו-1-MCP יחדיו בשני מועדי ניסוי שונים – פברואר המייצג עונה קרה ויולי שמייצג עונה חמה בשנה. אנליזת ביטוי גנים אלו מעלה מספר נתונים מעניינים הנראים בביטוי כל הגנים הנבדקים, מלבד ה-rRNA שביטויו הינו עיקבי ואחיד כמצופה. מועד יולי אופיין באחוזי נשירה גבוהים בהשוואה למועד פברואר, ונשירה דרך אתר ניתוק העוקץ. למרות זאת, לא התקבל ביטוי חזק של אף אחד מהגנים ברקמת העוקץ, נתון המחזק את ההשערה, שהועלתה על-ידי ליכטר וחובי (Lichter et al., 2006), כי הנשירה דרך אתר ניתוק העוקץ בעונה חמה אינה תלויית פעילות אנזימטית אלא היא תוצאה ישירה של ייבוש רקמה זו ורגישותה לכוחות אשר מסוגלים לשבור את הצינורות (vascular bundles) המחברים בין הגבעול (peduncle) והפרי.

ההשפעות החיוביות של הטיפולים נראות לרוב רק לאחר 14 ימי אחסון וכמעט ולא נראית השפעה או ביטוי משמעותי בתקופת האחסון של 7 ימי אחסון, ממצא שאינו מפתיע מאחר והנשירה ברובה נראית רק בתקופת אחסון זו הן בזן 1335 והן בזן 819 (Beno-Moualem et al., 2004). הביטוי של שלושת הגנים *Cel5*, *Cell* ו-*Cel8* לא התקבל ביום הקטיף (איורים 12,13 ו-14) בדומה לתוצאות הניסוי פברואר לעיל (איורים 8,9 ו-10). ממצא מעניין הראוי לציון הוא קבלת אינדוקציה מסויימת של *Cel5* כתוצאה מיישום ה-TPA לאחר 7 ימי אחסון באתר ניתוק מפרק העוקץ במועד פברואר, אך הסיבות לכך אינן ידועות. לאחר 14 ימי אחסון נראה עיכוב בביטוי שלושת הגנים הנ"ל באתר ניתוק מפרק העוקץ כתוצאה מטיפול TPA, 1-MCP והטיפול המשולב. למעט תוצאות הביטוי של הגן *Cel5*, עיכוב סינרגיסטי לא מתקבל באף אחד ממועדי הניסוי כתוצאה מהיישום המשלב TPA ו-1-MCP יחדיו. כאשר בוחנים את ביטוי הגנים באתר ניתוק קצה העוקץ, ניתן לראות כי גם כאן התקבל עיכוב בביטוי שני הגנים *Cel5* ו-*Cel8* כתוצאה ממתן הטיפולים השונים. מאידך, הביטוי של *Cell* היה חלש ולא הייתה אחידות בין החזרות. חוסר האחידות בביטוי גן זה התקבלה לאורך המחקר ובפירסומים קודמים (Del Campillo and Bennett, 1996; Beno-Moualem et al., 2004) והיא כנראה קשורה לרמות הביטוי הנמוכות של *Cell*. ברקמת המצעית ניתן לראות כי יש עיכוב ביטוי גם כן של הגנים *Cel5* ו-*Cel8* עקב מתן הטיפולים, וביישום הטיפול המשולב יש השפעת עיכוב נוספת בהשוואה לעיכוב הביטוי של כל טיפול בנפרד. למרות היעדר העיקביות בין החזרות בביטוי *Cell*, ניכר שיש השפעה מעכבת של 1-MCP על הביטוי והשפעה חזקה יותר של הטיפול המשולב. דגם הביטוי מצוי בהתאמה לממצאים בספרות, שבהם דווח על השפעה מעכבת של אוקסין ו-1-MCP על ביטוי גנים

ממשפחה זו (Del Campillo and Bennett, 1996; Hadfield et al., 1998; Kalaitzis et al., 1999; Beno-Moualem et al., 2004).

דגם הביטוי של הגנים *TAPG1* ו-*TAPG2* (איור 14) היה דומה מאד אחד לשני, כאשר באתר ניתוק העוקץ והמצעית לא נראה ביטוי שלהם ובאתר ניתוק מפרק העוקץ ביטויים נראה רק לאחר 14 ימי אחסון בביקורת בשני מועדי הבדיקה. עם זאת, להבדיל ממועד יולי, בפברואר התקבל גם ביטוי בטיפול עם 1-MCP. בספרות דווח שאוקסין (IAA) ומעכב פעולת אתילן (STS) גרמו לעיכוב צבירת הגן *TAPG1* (Kalaitzis et al., 1995), במקביל לפרסומים יישום האוקסין אכן גרם לעיכוב ביטוי הגנים, אך בניגוד להם במועד פברואר למעכב פעולת האתילן מסוג 1-MCP לא הייתה השפעה על ביטוי שני הגנים. למרות הביטוי של שני גנים אלו באתר ניתוק מפרק העוקץ במועד פברואר, עדיין התקבלה השפעת עיכוב של יישום 1-MCP על הנשירה במועד זה. ממצא המחזק את המחשבה כי שני גנים אלו הם חלק קטן ממערך הגנים המשתתף ומשפיע על תהליך הנשירה.

דגם הביטוי של *TAPG4* היה שונה לחלוטין מזה שהתקבל על-ידי שני הגנים הקודמים. באתר ניתוק מפרק העוקץ במועד פברואר התקבלה רמת ביטוי גבוהה החל מיום הקטיף. לאחר 7 יום באחסון נראה עיכוב של הביטוי כתוצאה מיישום 1-MCP והשפעה מסוימת של הטיפול ב-TPA לאחר 14 יום. לעומת זאת, במועד יולי לא התקבל ביטוי חזק החל מיום הקטיף ונראתה השפעה לא-אחידה של עיכוב כתוצאה מיישום הטיפולים השונים לאחר 7 ו-14 יום באחסון. באתר הניתוק של העוקץ והמצעית לא הייתה עיקביות בביטוי גן זה. על-פי הספרות נמצא כי יישום אוקסין, במקביל לתוצאות שהתקבלו, מעכב את ביטוי הגן (Hong et al., 2000).

יישום טיפולי האוקסין וה-1-MCP הראו השפעה חיובית של עיכוב על ביטוי הגנים ממשפחת הצלולאזות והפוליגלקטורונאזות בעיקר באתר ניתוק מפרק העוקץ. למרות תוצאות חיוביות אלו לא התקבל מתאם בין עיכוב זה לנשירה הכללית של הניסויים או להשפעה על נשירה דרך אתר ניתוק זה או אחר. ממצא זה מצוי בהתאמה לתוצאות מוקדמות במעבדה שבהן נמצא כי עיכוב הביטוי של *Cel5* ו-*Cel8* על-ידי יישום 1-MCP, לא מנע קבלת נשירה גבוהה, ובהתאמה לדווחים בספרות שהראו כי למרות השתקת גנים ממשפחת הפוליגלקטורונאזות בעלים של עגבנייה הנשירה עדיין התרחשה (Jiang CZ, 2008). כמו כן, בשני מועדי הניסויים נראתה השפעת עיכוב של הגנים השונים כתוצאה מיישום האוקסין, אך בבחינת הנשירה התקבל עיכוב רק במועד פברואר לעומת יולי. ממצא המחזק את התאוריה שנשירה דרך אתר ניתוק העוקץ, האופיינית בעיקר לתקופת הקיץ, עיקרה בהשפעות מכניות-פיזיקליות ורגישותה לשינויים אנזימטיים מועטה. הצמח מכיל מנגנוני בקרה מסועפים ולכן גורמים רבים כמו תנאי אחסון, תנאי גידול ועקות שונות עלולים לשפיעל גנים אלו ורבים אחרים, שעדיין אינם ידועים, ולהביא לתוצאת נשירה והבשלה שאינה תלוייה בטיפולים. מעבר לכך, טיפולי האוקסין וה-1-MCP הראו השפעת עיכוב חלקית בלבד על *TAPG4* שייתכן וביכולתו לפצות על עיכובם של הגנים האחרים מאותה משפחה כמו *TAPG1* ו-*TAPG2* ולעורר את מנגנון הנשירה או במקביל לשפיעל גנים אלו ואחרים, המשתתפים בתהליך הנשירה.

4.3 הבשלת הפרי לאורך האחסון

בעגבניות, צבע ומוצקות מהווים מדדים חשובים מבחינת הצרכן בבחירת תוצרת איכותית. תהליך הבשלת הפרי בעגבנית צ'רי, כמו בפירות קלמקטריים אחרים, הוא תהליך תלוי-אתילן המתרחש עוד בהיות הפרי על הצמח ונמשך גם לאחר הקטיף. במהלך תהליך ההבשלה חלים מספר שינויים עיקריים כמו שינויי צבע, התרככות הפרי, שינויים בכמות הסוכרים והחומציות. בדיקת מדדי הבשלה אלו (טבלה 2) במהלך האחסון של קטיף פברואר העלתה תמונה דומה באופן חלקי לפרסומים בספרות (Mir et al., 2004; Guillén et al., 2006a; Guillén et al., 2006b) על-פי המצופה, התקבלה ירידה בערכים הממוצעים של המוצקות והשתנות זוות הצבע לאורך האחסון, דהיינו קבלת פירות רכים ואדומים יותר בהשוואה למצבם ביום הקטיף. בספרות דווח כי בהבשלת העגבניה משלב ירוק-בוגר לאדום ישנה עלייה ברמות ה-TSS והסוכר (Kader et al., 1977). לעומת זאת, על-פי תוצאות הניסוי לאחר 8 ימי אחסון נראתה מגמת ירידה לא מובהקת ב-TSS ובבדיקה חוזרת לאחר 14 ימי אחסון התקבלה מגמה של עלייה. הבדלים בין תוצאות הניסוי לדיווחים בספרות נמצאו גם באנליזת רמות החומצה. בספרות מדווח על עלייה ברמות החומצה עד הגעה לרמה מקסימלית בשלב שינוי הצבע, ובהמשך ההבשלה ירידה בערכי החומצה (Kader et al., 1977; Guillén et al., 2006b). בתוצאות הנוכחיות של בדיקת החומצה נראתה מגמת עלייה לא-מובהקת באחוז החומצה לאחר 8 ו-14 יום באחסון בהשוואה למועד הקטיף. ההבדלים בין הדיווחים בספרות המצוטטת לתוצאות מדדי ההבשלה בניסוי קיימים כנראה כתוצאה מכך שבמחקרים המצוטטים בדיקות מדדי ההבשלה נעשו בעיקר על פרי המצוי במעבר מירוק-בוגר לאדום, בעוד שהבדיקות בניסוי זה נעשו על פירות כתומים-אדומים. בנוסף, בחלק מהמחקרים בדיקת מדדי ההבשלה נעשתה על קטיפים שונים ולא על פירות לאורך האחסון (Kader et al., 1977). סיבה נוספת אפשרית לקבלת שונות זו היא כתוצאה מהשימוש בזני עגבניה שונים בכל מחקר.

4.3.1 השפעת טיפולי אוקסין ו-1-MCP לאחר הקטיף על מדדי ההבשלה

ההשפעה של אוקסין על הבשלת פירות ידועה זה מכבר כהשפעה עקיפה כתוצאה מההשלכה של פעילות הורמון זה על ייצור האתילן ועל רגישות הרקמות השונות לפעילות האתילן (Taylor and Whitelaw, 2001; Trainotti et al., 2007). לאחרונה דווח כי ישנו ביטוי דיפרנציאלי של גנים הקשורים במעבר האותות של אוקסין בעגבנייה, והוצעה היפותזה שאוקסין מעורב גם הוא במכניזם של הבשלת פירות קלימקטריים (Jones et al., 2002; Trainotti et al., 2007). כפי שצויין לעיל, 1-MCP ידוע כבעל יכולת עיכוב הבשלה, המתבטא בצבע הפרי ובשמירת מוצקות הפרי (Hoeberichts et al., 2002; Mir et al., 2004; Guillén et al., 2006a; Guillén et al., 2006b; Lichter et al., 2006; R. Rinaldi, 2007). לגבי השפעתו על רמות ה-TSS והחומצה ישנם דיווחים סותרים בהקשר לזנים שונים של עגבניה: יש שמצאו השפעת עיכוב של 1-MCP על רמות ה-TSS והחומצה (Wills and Ku, 2002; Guillén et al., 2006a; Guillén et al., 2006b).

al., 2006b) ויש דיווחים אשר לא מצאו השפעה כלשהי של 1-MCP על מדדי הבשלה אלו (Mir et al., 2004; R. Rinaldi, 2007).

בבחינת תוצאות המוצקות של הניסויים במועדים השונים (איור 4) נראה כי באופן כללי ל-1-MCP ישנה השפעה בשמירת המוצקות בעיקר בניסויים שנערכו במועדי פברואר-מרץ. 1-MCP לבדו עיכב את ההתרככות של האשכולות בניסויים פברואר, מרץ בצורה מובהקת, אך לא כך לגבי תוצאות ניסוי מאי ויולי. בהסתכלות על מוצקות הפירות ביום הקטיף (טבלה 5) ניתן לראות כי ערך המוצקות שהתקבל במועד מאי נמוך מאד יחסית לשאר מועדי הניסויים, וייתכן כי ישנו סף מסויים בו 1-MCP כבר אינו מסוגל להשפיע על שמירת מוצקות הפירות. סיבה נוספת אפשרית להיעדר השפעת 1-MCP בניסוי מאי היא שהבדיקות בניסוי זה נערכו לאחר 21 ימי אחסון וידוע כי זמן מחצית החיים של 1-MCP הוא 12 יום, כך שייתכן והשפעתו התפוגגה (Cameron and Reid, 2001; Blankenship and Dole, 2003). לעומת אי-השפעת 1-MCP על מוצקות הפירות, כן נראה עיכוב של הנשירה במועד מאי הודות לטיפול 1-MCP וייתכן שתהליכי הנשירה וההבשלה אינם מסונכרנים ולכן גם מתקבלים ההבדלים בין שני גורמים אלו. לעומת זאת, לא נראה כי ליישום האוקסין האקסוגני לאחר הקטיף, הן של TPA והן של NAA, יש השפעה על מוצקות הפרי באחסון ולא ידועות עבודות מחקר בהקשר לבחינת מדדי הבשלה כתוצאה מטיפול אוקסין לאחר הקטיף.

ברמת הצבע, ברוב המיקרים התקבלה השפעת עיכוב של 1-MCP על מדד הצבע. לעומת זאת, במרבית הניסויים, הטיפול באוקסין לא השפיע על התפתחות הצבע. בניסוי מאי הטיפול באוקסין גרם לעיכוב בהתפתחות הצבע וייתכן גם להשפעה סינרגיסטית עם 1-MCP. היה מעניין לבחון מה התנאים בהם אוקסין משפיע על מדדי ההבשלה השונים.

תוצאות ה-TSS והחומצה נבדקו בשני מועדים בלבד ולפי התוצאות נראה כי השפעת הטיפול ב-TSS בכל מועד ניסוי הייתה שונה: תוצאות חודש מאי מצביעות על מגמת ירידה בערכי ה-TSS והחומצה לאורך האחסון. הירידה בשני מדדי הבשלה אלו עוכבה כתוצאה מיישום 1-MCP לעומת השפעה זניחה של יישום האוקסין. תופעה מעניינת נראתה בטיפול המשולב של יישום 1-MCP ואוקסין, שבו התקבלה ירידה בערכי ה-TSS והחומצה בהשוואה לטיפול 1-MCP בלבד. מאחר וערכי מדדי ההבשלה של יולי הראו ערכים נמוכים במיוחד של חומצה ו-TSS החל מיום הקטיף, כלומר פירות קטיף יולי היו תפלים למעלה מהמצופה לפירות זן זה, קשה להשוות את השפעות הטיפול בשני מועדים אלו. אף על פי כן מגמת הירידה בערכי ה-TSS נראתה גם בניסוי זה כתוצאה מהטיפול המשולב. עם זאת, תוצאות ה-TSS והחומצה במועד יולי לא הראו מובהקות סטטיסטית.

מגמת ההשפעה השלילית כתוצאה מיישום אוקסין ו-1-MCP יחדיו היא תוצאה מעניינת הדורשת מחקר מעמיק של מסלולי פירוק ה-TSS והחומצה.

4.4 סיכום

בעבודה זו נבדקה השפעת טיפולי אוקסין ו-1-MCP לאחר הקטיף על מהלך הנשירה וההבשלה של עגבניות צ'רי באשכולות בעונות שונות שבשנה. כמו כן, במהלך העבודה נעשה מאמץ לאפיין נשירה דרך אתר ניתוק מסויים בהתאם לעונת השנה ולמצוא דגם ביטוי תואם של שבעה גנים שונים השייכים למשפחות גנים, הידועות זה מכבר כפעילות במהלך נשירה והבשלה של פירות רבים. ממצאי המחקר מראים כי קיים קשר בין עונת הקטיף לרמת הנשירה ואתר הניתוק הדומיננטי בנשירה, אך יחד עם זאת ביטוי הגנים השונים התרחש ברובו ברקמת מפרק העוקץ ולא הושפע מהסטת הנשירה לאתר ניתוק העוקץ בעונה החמה. כמו כן, השפעתם של הטיפולים לאחר הקטיף על רמת הנשירה נמצאה כחיובית באופן חלקי ועיקר ההשפעה התקבלה בניסויים שנערכו במועדים המייצגים את עונת החורף, שבה עיקר הנשירה היא דרך אתר ניתוק מפרק העוקץ. מבחינת דגם ביטוי הגנים, נמצא שישנו מתאם בין תהליך הנשירה וההבשלה לרמות ביטוי הגנים השונים המתקבלות לאורך ימי האחסון ברקמות השונות. יישום של טיפולי אוקסין ו-1-MCP גרם לעיכוב בביטוי הגנים השונים שנבדקו, אם כי בעוצמה משתנה ביניהם. מעניין לציין שהשפעת הטיפולים לאחר הקטיף על ביטוי הגנים הייתה דומה בין מועד פברואר ליולי ועיקר הביטוי של הגנים התקבל באתר ניתוק מפרק העוקץ, גם כשהנשירה הייתה דרך אתר ניתוק העוקץ, כפי שקרה במועד יולי. ממצא המחזק את ההשערה כי הנשירה המתרחשת דרך אתר ניתוק קצה העוקץ תלוייה באופן חלקי בלבד בפעילות האנזימטית שנבדקה ועיקר רגישות נשירה זו היא בתנאי סביבת הגידול.

- Abebie, B., Lers, A., Philosoph-Hadas, S., Goren, R., Riov, J. and Meir, S. (2008).** Differential Effects of NAA and 2,4-D in Reducing Floret Abscission in *Cestrum* (*Cestrum elegans*) Cut Flowers are Associated with their Differential Activation of Aux/IAA Homologous Genes. *Ann Bot* 101, 249-259.
- Abeles, F.B., Morgan, P.W. and Saltveit, M.E., Jr. (1992).** Ethylene in Plant Biology. (Academic press, New York & London.).
- Agusti, J., Merelo, P., Cercos, M., Tadeo, F.R. and Talon, M. (2008).** Ethylene-induced differential gene expression during abscission of citrus leaves. *J Exp Bot* 59, 2717-2733.
- Alonso, J.M. and Stepanova, A.N. (2004).** The ethylene signaling pathway. *Science* 306, 1513-1515.
- Arrowsmith, D.A. and Desilva, J. (1995).** Characterization Of 2 Tomato Fruit-Expressed Cdnas Encoding Xyloglucan Endo-Transglycosylase. *Plant Mol.Biol.* 28, 391-403.
- Atherton, J.G. and Rudich, J. (1986).** The Tomato Crop - A Scientific Basis for Improvment. (London: Chapman and Hall Ltd.).
- Barry, C.S. and Giovannoni, J.J. (2007).** Ethylene and fruit ripening. *Journal Of Plant Growth Regulation* 26, 143-159.
- Beno-Moualem, D., Gusev, L., Dvir, O., Pesis, E., Meir, S. and Lichter, A. (2004).** The effects of ethylene, methyl jasmonate, and 1-MCP on abscission of cherry tomatoes from the bunch and expression of endo-1,4-b-glucanases. *Plant Science* 167, 499-507.
- Binder, B.M. and Bleecker, A.B. (2003).** A Model for ethylene receptor function and 1-methylcyclopropene action. *Acta Horticulturae* 628, 177-187.
- Blankenship, S.M. and Dole, J.M. (2003).** 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biology and Technology* 28, 1-25.
- Blanusa, T., Else, M.A., Atkinson, C.J. and Davies, W.J. (2005).** The regulation of sweet cherry fruit abscission by polar auxin transport. *Plant Growth Regulation* 45, 189-198.
- Brummell, D.A., Catala, C., Lashbrook, C.C. and Bennett, A.B. (1997).** A membrane-anchored E-type endo-1,4-beta-glucanase is localized on Golgi and

- plasma membranes of higher plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 4794-4799.
- Cameron, A.C. and Reid, M.S. (2001).** 1-MCP blocks ethylene-induced petal abscission of *Pelargonium peltatum* but the effect is transient. Postharvest Biology and Technology 22, 169-177.
- Campbell, P. and Braam, J. (1999).** Xyloglucan endotransglycosylases: diversity of genes, enzymes and potential wall-modifying functions. Trends Plant Sci 4, 361-366.
- Catala, C., Rose, J.K.C., York, W.S., Albersheim, P., Darvill, A.G. and Bennett, A.B. (2001).** Characterization of a tomato xyloglucan endotransglycosylase gene that is down-regulated by auxin in etiolated hypocotyls. Plant Physiol. 127, 1180-1192.
- Causier, B., Kieffer, M. and Davies, B. (2002).** MADS-Box genes each maturity. Science 296, 275-276.
- Chanliaud, E., De Silva, J., Strongitharm, B., Jeronimidis, G. and Gidley, M.J. (2004).** Mechanical effects of plant cell wall enzymes on cellulosexyloglucan composites. The Plant Journal 38, 27-37.
- Chow, B. and and McCourt, P. (2006).** Plant hormone receptors: perception is everything. Genes and Development 20, 1998-2008.
- Collett, C.E., Harberd, N.P. and Leyser, O. (2000).** Hormonal interactions in the control of Arabidopsis hypocotyl elongation. Plant Physiol. 124, 553-561.
- Davies, N.J. and Hobson, E.G. (1981).** The constituents of tomato fruit - The influence of environment, nutrition and genotype. CRC - Critical Reviews in Food science and Nutrition 15, 205-255.
- Del Campillo, E. and Bennett, A.B. (1996).** Pedicel breakstrength and cellulase gene expression during tomato flower abscission. Plant Physiol. 111, 813-820.
- Giovannoni, J. (2001).** Molecular biology of fruit maturation and ripening. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 52, 725-749.
- Golding, J.B., Shearer, D., McGlasson, W.B. and Wyllie, S.G. (1999).** Relationships between Respiration, Ethylene, and Aroma Production in Ripening Banana. J. Agric. Food Chem. 47, 1646-1651.
- Gonzalez-Carranza, Z.H., Lozoya-Gloria, E. and Roberts, J.A. (1998).** Recent developments in abscission: shedding light on the shedding process. Trends in Plant Science 3, 10-14.

- Gonzalez-Carranza, Z.H., Whitelaw, C.A., Swarup, R. and Roberts, J.A. (2002).** Temporal and spatial expression of a polygalacturonase during leaf and flower abscission in oilseed rape and Arabidopsis. *Plant Physiol.* 128, 534-543
- Guillén, F., Castillo, S., Zapata, P.J., Martínez-Romero, D., Serrano, M. and Valero, D. (2006a).** Efficacy of 1-MCP treatment in tomato fruit. 1. Duration and concentration of 1-MCP treatment to gain an effective delay of postharvest ripening. *Postharvest Biology and Technology* In Press.
- Guillén, F., Castillo, S., Zapata, P.J., Martínez-Romero, D., Valero, D. and Serrano, M. (2006b).** Efficacy of 1-MCP treatment in tomato fruit. 2. Effect of cultivar and ripening stage at harvest. *Postharvest Biology and Technology* In Press.
- Hadfield, K.A. and Bennett, A.B. (1998).** Polygalacturonases: Many Genes in Search of a Function. *Plant Physiol.* 117, 337-343.
- Hadfield, K.A., Rose, J.K., Yaver, D.S., Berka, R.M. and Bennett, A.B. (1998).** Polygalacturonase gene expression in ripe melon fruit supports a role for polygalacturonase in ripening-associated pectin disassembly. *Plant Physiol* 117, 363-373.
- Hardtke, C.H., Dorcey, E., Osmont, K.S. and Sibout, R. (2007).** Phytohormone collaboration: zooming in on auxin–brassinosteroid interactions. *Trends in Cell Biology* 17, 485-492.
- HersHKovitz, V., Saguy, S.I. and Pesis, E. (2005).** Postharvest application of 1-MCP to improve the quality of various avocado cultivars. *Postharvest Biology and Technology* 37, 252-264.
- Heuvelink, E.P. (2005).** Tomatoes. (Wallingford: CABI Publishing).
- Hoeberichts, F.A., Van der Plas, L.H.W. and Woltering, E.J. (2002).** Ethylene perception is required for the expression of tomato ripening-related genes and associated physiological changes even at advanced stages of ripening. *Postharvest Biology and Technology* 26, 125-133.
- Hong, S.-B., Sexton, R. and Tucker, M.L. (2000).** Analysis of Gene Promoters for Two Tomato Polygalacturonases Expressed in Abscission Zones and the Stigma. *Plant Physiol.* 123,869-882 .
- Hong, S.B. and Tucker, M.L. (1998).** Genomic organization of six tomato polygalacturonases and 5' upstream sequence identity with tap1 and win2 genes. *Molecular and General Genetics* 258, 479-487.

- Jiang CZ, L.F., Imsabai W, Meir S, Reid MS. (2008)** .Silencing polygalacturonase expression inhibits tomato petiole abscission. *J Exp Bot* 59, 973-979.
- Jones, B., Frasse, P., Olmos, E., Zegzouti, H., Li, Z.G., Latche, A., Pech, J.C. and Bouzayen, M. (2002).** Down-regulation of DR12, an auxin-response-factor homolog, in the tomato results in a pleiotropic phenotype including dark green and blotchy ripening fruit. *The Plant Journal* 32, 603-613.
- Kader, A., Stevens, M., Albright-Holton, M., Morris, L. and Algazi, M. (1977).** Effect of Fruit Ripeness when Picked on Flavor and Composition in Fresh Market Tomatoes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 102, 724-731.
- Kalaitzis, P., Koehler, S.M. and Tucker, M.L. (1995).** Cloning of a tomato polygalacturonase expressed in abscission. *Plant Mol.Biol.* 28, 647-656.
- Kalaitzis, P., Solomos, T. and Tucker, M.L. (1997a).** Three Different Polygalacturonases Are Expressed in Tomato Leaf and Flower Abscission, Each with a Different Temporal Expression Pattern. *Plant Physiol.* 113, 1303-1308.
- Kalaitzis, P., Solomos, T. and Tucker, M.L. (1997b)** .Three different polygalacturonases are expressed in tomato leaf and flower abscission, each with a different temporal expression pattern. *Plant Physiol.* 113, 1303-1308.
- Kalaitzis, P., Hong, S.B., Solomos, T. and Tucker, M.L. (1999).** Molecular characterization of a tomato endo-beta-1,4-glucanase gene expressed in mature pistils, abscission zones and fruit. *Plant and Cell Physiology* 40, 905-908.
- Kende, H. (1993).** Ethylene biosynthesis. *Annual Review of Plant physiology and Plant Molecular Biology* 44, 283-307.
- Kenigsbuch, D., Chalupowicz, D., Aharon, Z., Maurer, D. and Aharoni, N. (2007).** The effect of CO₂ and 1-methylcyclopropene on the regulation of postharvest senescence of mint, *Mentha longifolia* L. *Postharvest Biology And Technology* 43, 165-173.
- Kepinski, S. (2007).** The anatomy of auxin perception. *BioEssays* 29, 953-956.
- Kevany, B.M., Tieman, D.M., Taylor, M.G., Dal Cin, V. and Klee, H.J. (2007).** Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. *Plant Journal* 51, 458-467.
- Klee, H. and Tieman, D. (2002).** The tomato ethylene receptor gene family: form and function. *Physiol. Plant.* 115, 336-341.

- Klee, H.J. (2002).** Control of ethylene-mediated processes in tomato at the level of receptors. *Journal of Experimental Botany* 53, 2057-2063
- Klee, H.J. (2004).** Ethylene Signal Transduction. Moving beyond Arabidopsis. *Plant Physiol.* 135, 660-667.
- Lashbrook, C.C., Gonzalez-Bosch, C. and Bennett, A.B. (1994).** Two divergent endo-beta-1,4-glucanase genes exhibit overlapping expression in ripening fruit and abscising flowers. *The Plant Cell* 6, 1485-1493.
- Lers, A., Sonogo, L., Green, P.J. and Burd, S. (2006).** Suppression of LX Ribonuclease in Tomato Results in a Delay of Leaf Senescence and Abscission. *Plant Physiol.* 142, 710-721.
- Lichter, A., Guzev, L., Dvir, O., Farber, I., Danshin, A., Pressman, E., Ganz, S. and Beno-Moualem, D. (2006).** Seasonal changes in the abscission site in bunch tomatoes and differential response to 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biology and Technology* 40, 48-55.
- Lurie, S. and Mitcham, E. (2007).** Heat treatment for postharvest control: Theory and practice. In *Physiological Responses of Agricultural Commodities to Heat Treatments*, Tang, J., Mitcham, E., Wang, S., and Lurie, S., eds (Oxfordshire: CABI Publishing) .In Press.
- Maclachlan, G. and Brady, C. (1994).** Endo-1,4-Beta-Glucanase, Xyloglucanase, and Xyloglucan Endo- Transglycosylase Activities Versus Potential Substrates in Ripening Tomatoes. *Plant Physiol.* 105, 965-974.
- Meir, S., Hunter, D.A., Chen, J.C. and Reid, M.S. (2003).** Molecular study of the acquisition of increased sensitivity to ethylene in the abscission zone in response to removal of the auxin source. In *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene III*, Vendrell, M., Klee, H., Pech, J.C., and Romojaro, F., eds (Amsterdam: IOS). 284-289.
- Meir, S., Reid, M.S., Jiang, C.Z., Lers, A. and Philosoph-Hadas, S. (2006).** Molecular studies of postharvest leaf and flower abscission. An annual report to BARD no. IS-3815-05, 72.
- Michaeli, R., Philosoph-Hadas, S., Riov, J. and Meir, S. (1999a).** Chilling-induced leaf abscission of *Ixora coccinea* plants. I. Induction by oxidative stress via increased sensitivity to ethylene. *Physiol. Plant.* 107, 166-173.

- Michaeli, R., Philosoph-Hadas, S., Riov, J. and Meir, S. (1999b).** Chilling-induced leaf abscission of *Ixora coccinea* plants. II. Alteration of auxin economy by oxidative stress. *Physiol. Plant.* 107, 174-180.
- Mir, N., Canoles, M., Beaudry, R., Baldwin, E. and Mehla, C.P. (2004).** Inhibiting tomato ripening with 1-methylcyclopropene. *Journal of the American Society of Horticultural Sciences* 129, 112-120.
- Muller, A., Guan, C.H., Galweiler, L., Tanzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E. and Palme, K. (1998).** AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. *Embo Journal* 17, 6903-6911.
- Nakano, R., Ogura, E., Kubo, Y. and Inaba, A. (2003).** Ethylene biosynthesis in detached young persimmon fruit is initiated in calyx and modulated by water loss from the fruit. *Plant Physiol.* 131, 276-286.
- Osborne, D.J. (1989).** Abscission. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences* 8, 103-129.
- Peter H.Raven, R.F.E., Helena Curtis. (1981).** *Biology of plants.* (Worth).
- Philosoph-hadas, S., Aharoni, N. and Yang, S.F. (1986).** Carbon-Dioxide Enhances The Development Of The Ethylene Forming Enzyme In Tobacco Leaf-Disks. *Plant Physiol.* 82, 925-929.
- Pickett, F.B., Wilson, A.K. and Estelle, M. (1990).** The Aux1 Mutation Of Arabidopsis Confers Both Auxin And Ethylene Resistance. *Plant Physiol.* 9 ,4 .1462-1466
- Prasanna, V., Prabha, T.N. and Tharanathan, R.N. (2007).** Fruit ripening phenomena - An overview. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition* 47, 1-19.
- R. Rinaldi, M.M., G. Colelli. (2007).** effects of 1-methylcyclopropene on postharvest life of ripe tomatoes. *Advances in Horticultural Science* 21, 177-182.
- Rechenmann, C.P. and Napier, R.M. (2005).** Auxins. *Vitamins & Hormones* 9, 203-233.
- Redgwell, R.J. and Fry, S.C. (1993).** Xyloglucan Endotransglycosylase Activity Increases during Kiwifruit (*Actinidia-Deliciosa*) Ripening. *Plant Physiol.* 103, 1399-1406.
- Rhodes, M. (1980).** *In senescence in plants.* (CRC, Boca Raton).

- Roberts, J.A., Schindler, C.B. and Tucker, G.A. (1984).** Ethylene-promoted tomato flower abscission and the possible involvement of an inhibitor. *Planta* 160, 159-163.
- Roberts, J.A., Elliott, K.A. and Gonzalez-Carranza, Z.H. (2002).** Abscission, dehiscence, and other cell separation processes. *Annu Rev Plant Biol* 53, 131-158.
- Rose, J. and Bennett, A. (1999).** Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends Plant Sci* 4, 176-183.
- Rungruchkanont, K., Ketsa, S., Chatchawankanphanich, O. and van Doorn, W.G. (2007).** Endogenous auxin regulates the sensitivity of *Dendrobium* (cv. Miss Teen) flower pedicel abscission to ethylene. *Functional Plant Biology* 34, 885-894.
- Serek, M., Sisler, E.C. and Reid, M.S. (1995).** 1-Methylcyclopropene, a novel gaseous inhibitor of ethylene action, improves the life of fruits, cut flowers, and potted plants. *Acta Horticulturae*, 337-346.
- Sexton, R. (1997).** The role of ethylene and auxin in abscission. *Acta Horticulturae* 463, 435-444.
- Sexton, R., Laird, G. and van Doorn, W.G. (2000).** Lack of ethylene involvement in tulip tepal abscission. *Physiol. Plant.* 108, 321-329.
- Seymour, G. (1993).** *Biochemistry of fruit ripening.* (Chapman & Hall, London).
- Stepanova, A.N., Yun, J., Likhacheva, A.V. and Alonso, J.M. (2007).** Multilevel interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 19, 2169-2185.
- Swarup, R., Parry, G., Graham, N., Allen, T. and Bennett, M. (2002).** Auxin cross-talk: integration of signalling pathways to control plant development. *Plant Mol.Biol.* 49, 411-426.
- T.Addicott, F. (1982).** *Abscission.* (University of California Press).
- Taylor, J.E. and Whitelaw, C.A. (2001).** Signals in abscission. *New Phytologist* 151, 323-340.
- Teale, W.D., Paponov, I.A. and Palme, K. (2006).** Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 847-859.

- Thompson, D.S. and Osborne, D.J. (1994).** A Role for the Stele in Intertissue Signaling in the Initiation of Abscission in Bean Leaves (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol* 105, 341-347.
- Trainotti, L., Tadiello, A. and Casadoro, G. (2007).** The involvement of auxin in the ripening of climacteric fruits comes of age: the hormone plays a role of its own and has an intense interplay with ethylene in ripening peaches. *J. Exp. Bot.* 58, 3299-3308.
- Urbanowicz, B.R., Catala, C., Irwin, D., Wilson, D.B., Ripoll, D.R. and Rose, J.K.C. (2007).** A Tomato Endo-beta-1,4-glucanase, SlCel9C1, Represents a Distinct Subclass with a New Family of Carbohydrate Binding Modules (CBM49). *J. Biol. Chem.* 282, 12066-12074.
- van Doorn, W. and Stead, A. (1997).** Abscission of flowers and floral parts. *Journal of Experimental Botany* 48, 821-837.
- Vrebalov, J., Ruezinsky, D., Padmanabhan, V., White, R., Medrano, D., Drake, R., Schuch, W. and J., G. (2002).** A MADS-Box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (Rin) Locus. *Science* 296, 343-346.
- Watkins, C.B., Nock, J.F. and Whitaker, B.D. (2000).** Responses of early, mid and late season apple cultivars to postharvest application of 1-methylcyclopropene (1-MCP) under air and controlled atmosphere storage conditions. *Postharvest Biology and Technology* 19, 17-32.
- Whitelaw, C.A., Lyssenko, N.N., Chen, L.W., Zhou, D., Mattoo, A.K. and Tucker, M.L. (2002).** Delayed abscission and shorter internodes correlate with a reduction in the ethylene receptor LeETR1 transcript in transgenic tomato. *Plant Physiol.* 128, 978-987.
- Wild, H.P.J.d. (2003).** Effects of CO₂ at 1-MCP Treated Tomato on the Vine. *Acta Hort.* 600, 413-415.
- Wills, R.B.H. and Ku, V.V.V. (2002).** Use of 1-MCP to extend the time to ripen of green tomatoes and postharvest life of ripe tomatoes. *Postharvest Biology and Technology* 26, 85-90.

Abstract

The potential storage time of bunch cherry tomatoes (BCT) depends on their ripening rate and sensitivity to abscission. Like other climacteric fruits, the ripening and abscission processes of BCT are mediated by ethylene and are affected by auxin. There are two potential abscission's zones in the bunch: between the pedicel and the fruit and the joint, which is located in the middle of the pedicel.

The objectives of the work were: 1.To characterize abscission processes from the different abscission zones (AZ) and effect of the seasons. 2.To examine the influence of auxin and 1-methylcyclopropane (1-MCP) treatments after harvest on the abscission and ripening processes of BCT during the seasons. A major effort in characterization of the abscission process was composed of expression analysis of 7 genes which belong to the polygalacturonases, 1,4- β glucanases and endotransglycosylase xyloglucan gene families. Genes from these families are known to be involved in abscission in many systems and it was of interest to determine the effect of the treatments and storage conditions on their expression.

BCT were harvested in different seasons of the year .After harvest the bunches were treated with 25-100 ppm of the auxin 3,5,6-trichloro-2-pyridyloxyacetic acid (TPA) and 50 ppm (Naphthaleneacetic Acid) NAA. The inhibitor of ethylene-action, 1-MCP was applied as a gas at 0.5 ppm. The bunches were stored for 2-3 weeks at 12°C and relative humidity of 90-95%. During storage and after different treatments, joint, pedicel and receptacle tissues were sampled for RNA extraction. This RNA served as a template for expression analysis with Real-Time and semi-quantitative PCR.

As previously reported, the results of this study demonstrates that abscission in the winter occur mostly from the joint while in the summer most of the abscission is from the pedicel zone. Application of auxin or 1-MCP resulted in reduced abscission in most of the experiments, although the reduction was not always significant. The maximal reduction in total abscission and especially abscission from the joint was obtained in winter experiments. With few exceptions, the combined application of TPA and 1-MCP did not result in further inhibition of abscission. Effects of the auxin and 1-MCP on different ripening indices as firmness, color, soluble solids and acidity were also determined during storage. No treatment affected all parameters uniformly. In general, fruit firmness was maintained better after application of 1-MCP and was not affected by auxin treatments. Similarly, in most cases, 1-MCP but not auxin

application delayed color development. The effect of the treatments on acidity and TSS levels was not uniform.

There was a good correlation between the timing of abscission and the expression of the *Cell*, *Cel5* and *Cel8* genes from the cellulose family and *TAPG1* and *TAPG2* from the polygalacturonase gene family. For some of the genes (*Cel5*, *TAPG1* and *TAPG2*) there was a sharp increase in the expression of the genes towards the end of storage when abscission increased. A different pattern was observed with *TAPG4* and *XET-BRI* which were expressed already from the beginning of storage and their level increased steadily as the storage continued. Gene expression in the receptacle tissue was inconsistent and low. In contrast, *Cell* expression in the receptacle increased steadily during storage. Limited comparison of gene expression was also made between AZ which underwent abscission after shaking the bunch and those which did not. The results indicate that the expression of *Cell* and *TAPG2* increased in the AZ which separated before the AZ that did not separate. The effect of TPA and 1-MCP was also studied in two experiments, one performed in February and the other in July. Both 1-MCP and auxin inhibited gene expression, especially at the joint AZ. This inhibition was apparent both in the winter when the treatments were relatively effective and in July when non of the treatments reduced abscission. These findings strengthen the hypothesis that abscission through the pedicel, typical to the summer, occur as a result of dehydration of the tissue rather than enzymatic induction of abscission. To explain abscission when those genes are blocked, requires the assumption that other genes that are less affected by the treatments, such as *TAPG4*, may be involved in the process.

This study proved clearly that abscission of BCT is related to seasonal effects: hot seasons are characterized in abscission which is mostly from the pedicel AZ. In contrast, cold seasons are typically characterized by joint .In addition, while auxin and 1-MCP delayed expression of most of the genes, the efficacy of the treatments on abscission was found positive only partially and most of the effect was obtained in experiments which were held in the winter time which abscission occur mostly from the joint.

**Monitoring seasonal changes in abscission and gene expression
in bunch cherry tomatoes following postharvest treatments
and during storage**

M. Sc. Thesis

**Submitted to the Inter-Faculty Graduate Biotechnology Program
of the Hebrew University of Jerusalem
For the degree of
“Master of Science in Biotechnology”**

**By
Moran Rom**

Rehovot,

Israel

2008

This work was carried out under the supervision of:

Dr. Amnon Lichter

Dept. of Postharvest Science of Fresh Produce
Agriculture Research organization (ARO),
The Volcani Center

Dr. Yonatan Elkind

The Institute of Plant Sciences and Genetics in Agriculture,
Faculty of Agricultural, Food and Environmental Quality Sciences
The Hebrew University of Jerusalem