

204-0342-98

קוד מחקר:

נושא: פיתוח מערכת סמנים ביוכימיים לקביעת העיתוי האופטימלי למתן טיפולי שבירת תרדמה בגפן

מוסד: מינהל המחקר החקלאי

ד"ר אתי אור

חוקר ראשי:

2

חוקרים שותפים:

1996-1998

תקופת מחקר:

4

מאמרים:

תקציר

ציאנאמיד חומצי (HC) הנו שובר התרדמה היעיל ביותר עבור גפן. יחד עם זאת מדובר בחומר בעל עלות גבוהה, חלון צר לאפליקציה אופטימלית ופוטנציאל נזק גבוה. מנגנון פעילותו של החומר אינו ברור. אפיון שינויים ביוכימיים החלים במהלך התרדמה ובחשפעת הטיפול ב-HC יסייע לפיתוח סמנים אנדוגניים, שיאפשרו לקבוע דרגת תרדמה ומועד אופטימלי ליישום החומר. כמוכן, אפיון שינויים אלו יהווה בסיס להבנת מנגנון הפעילות של HC ולפיתוח של שוברי תרדמה אלטרנטיביים.

במחקר הנוכחי התחלנו באיתור גנים בעלי ביטוי דיפרנציאלי, במהלך התרדמה או בהשפעת טיפול ב-HC, באמצעות השוואת אוכלוסיות RNA של פקעים. בין הגנים שאותרו כמשתנים נמצאו גן בעל דמיון לאלכוהול דהידרוגנאז וגן המקדד לקינאז. גנים נוספים נמצאים בשלבי אפיון.

כמוכן נבחנו, בבקעת הירדן, תגובת הגפן לטיפול ב-HC במספר מועדי טיפול בין דצמבר לינואר, על מנת להגדיר חלון זמן אופטימלי לטיפול. התברר כי יישום מוקדם של HC גורם לפגיעה משמעותית באשכול וביבול גם כאשר רמת ההתעוררות תקינה. בדיקת ההשפעה של הפרדה בין מועד הזמירה למועד הריסוס ב-HC הראתה כי הפרש של עד חודש, בין זמירה במחצית דצמבר לריסוס במחצית ינואר, אינו פוגע ברמת ההתעוררות ומשפר את רמת היבול. בהמשך נלמד את הקשר בין התבטאות הקינאז למצב התרדמה ונבחן מתאם בין ביטוי גנים שאופיינו לבין תגובה אופטימלית לטיפול ב-HC. בצד חיפוש סיגנלים אלטרנטיביים להתעוררות נבקש ללמוד את השפעת HC על התפתחות האשכול.

דצמבר 1998

פיתוח מערכת סמנים ביוכימיים לקביעת העיתוי האופטימלי ליישום חומרים

שוברי תרדמה בגפן - דו"ח מסכם

שמות החוקרים: אתי אור¹, גיל ניר², שמעון לביא¹ ופיני שריג²

1 המכון למטעים, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן, ת.ד. 50250.

דואר אלקטרוני vhattior@volcani.agri.gov.il

2 מו"פ בקעת הירדן, גלגל, ד.ג. חבל יריחו

Characterization of biochemical markers for the detection of optimal timing for dormancy-breaking treatments in the grape vine

Final report

Etti Or¹, Gil Nir², Shimon Lavee¹ and Pini Sarig²

1 Institute of horticulture, Volcani center, Bet Dagan, P.O.B. 50250

Email: vhattior@volcani.agri.gov.il

2 Jordan valley R&D, Gilgal, Israel

פרק א: נסיונות לאיתור שינויים ביוכימיים החלים במהלך תרדמת הפקעים או בתגובה לטיפול בציאנמיד חומצי.

הציאנמיד החומצי, נכון להיום, הינו שובר התרדמה היעיל ביותר בגפן. יחד עם זאת מדובר בחומר בעל עלות גבוהה, פוטנציאל נזק גבוה וחלון צר לאפליקציה אופטימלית. מאחר ויישום הציאנמיד צריך להעשות לפני שקיים שינוי חזותי בהתפתחות הפקע נוצר צורך מעשי באפיון שינויים ביוכימיים החלים במהלך תרדמת הפקעים ובהשפעת הטיפול בציאנמיד חומצי. אפיון שינויים אלו יוכל לסייע לפיתוח סמנים אנדוגניים אמנים שבאמצעותם ניתן יהיה לקבוע את דרגת התרדמה ולפיה להחליט על המועד האופטימלי ליישום ציאנמיד חומצי.

מנגנון פעילותו של הציאנמיד החומצי אינו ברור ומובן עד היום. זיהוי גנים המתבטאים בפקע באופן דיפרנציאלי בהשפעת הטיפול בציאנמיד חומצי עשוי להניח את הבסיס לאנליזה מתקדמת של מנגנון הפעילות. הבנת מנגנון העברת הסיגנלים המובילים להתעוררות, ואפיון האתרים עליהם פועל הציאנמיד עשויים לסייע בהבנת תופעת התרדמה. הבנה זו הינה בעלת חשיבות לשליטה על תהליך התרדמה ותביא לפיתוח פוטנציאלי של שוברי תרדמה אלטרנטיביים, שעלותם פחותה והסיכון בשימוש בהם נמוך יותר. פיתוח מסוג זה הינו בעל משמעות כלכלית מרחיקת לכת בגפן בפרט ובעצי פרי נשירים בכלל.

פרק זה במחקר הנוכחי עוסק בנסיונות לאיתור שינויים ביוכימיים המאפיינים שלבים שונים במהלך תרדמת הפקעים או בתגובה לטיפול בציאנמיד חומצי. במסגרת המחקר נערכו השוואות של אוכלוסיות RNA מפקעי גפן משלבי תרדמה שונים. השוואות נערכו גם בין פקעים מטופלים בציאנמיד חומצי ופקעי בקורת. השוואה זו מאפשרת בחירת שבטי cDNA המייחדים שלבי תרדמה שונים. שבטים אלו ישמשו כסמנים ויבחן המתאם שבין הופעתם ובין תגובה אופטימלית של הצמח לריסוס בציאנמיד (ראה פרק ב). סמנים אלו יוכלו לשמש בעתיד להגדרת שלב התרדמה של הפקעים ולקביעת עיתוי אופטימלי לריסוס. באופן זה תתאפשר הבכרה מקסימלית של פרי בכמות ואיכות גבוהה. בנוסף להשוואות אלו נערכה

במסגרת תכנית מחקר אחרת גם השוואה של רמת ABA בפקעים במהלך התרדמה. מתאם בין שינוי ברמת ABA לדרגת התרדמה יוכל לשמש בעתיד להגדרת מצב התרדמה.

תקציר

שלב המחקר הראשון היה איסוף פקעים במהלך תקופת התרדמה כתשתית לאנאליזה המולקולרית. רוב הפקעים הוקפאו ומיעוטם שימש לקביעת עומק התרדמה בכל שלב ולהכנת עקומת תרדמה. הושאו עקומות תרדמה משנתיים עוקבות (96 ו 97) בשני כרמים שונים בבקעת הירדן, בגלגל ובתומר. עקב השונות בהתנהגות החומר הצמחי, לחזרה רב שנתית זו משמעות עצומה. עקומות התרדמה שימשו לבחירת נקודות זמן בהן הפקעים נבדלים בעצמת התרדמה באופן מובהק. פקעים מנקודות זמן אלו שימשו להשוואת אוכלוסיות RNA ורמות ABA. במשך שלוש שנות הנסיון נערכו נסיונות שדה למעקב אחר תגובת הפקעים לטיפול בציאנאמיד (ראה פרק ב). נאספו פקעים מכל מועד טיפול לבחינת מתאם בין נוכחות סמנים שונים ובין תגובת הגפן לציאנאמיד שתערך לאחר אפיון הסמנים. בכל עונה נאספו פקעים מכל מועד טיפול לבחינת מתאם בין נוכחות סמנים שונים ותגובת הגפן לציאנאמיד. בנוסף לאיסוף פקעים לא מטופלים ישירות מן השדה הקפאנו גם פקעים מזמורות שטופלו בציאנאמיד חומצי ומזמורות בקורת לאחר שהייה של יום, שלושה ימים ושבע בטמפרטורה מיטבית להתעוררות. פקעים אלו שימשו להשוואת אוכלוסיות RNA ונמצאו הבדלים דרמטיים בביטוי RNA כבר לאחר יום אחד.

במקביל לאיסוף החומר הצמחי נבחנו שיטות אחדות להפקת RNA מרקמת הפקע משום ששיטות ההפקה הסטנדרטיות הביאו לניצולת RNA נמוכה מאיכות גרועה. נמצאה שיטת הפקה המשלבת שימוש ב CTAB ומיצוי בכלורופורם שנתנה ניצולת RNA גבוהה מאיכות טובה. הופק RNA מפקעים מנקודות זמן שונות, על בסיס האינפורמציה מעקומות התרדמה, ונערכה השוואת אוכלוסיות RNA בשיטת Differential display. שבטים שהראו דיפרנציאליות בביטוי במהלך התרדמה או בהשפעת טיפול בציאנאמיד תומצי מוצו מגיל, עברו אמפליפיקציה ושובטו. במהלך המחקר נתקלנו בבעייה קשה בבחינת הביטוי הדיפרנציאלי בשיטות שגרתיות, עקב כמויות ה RNA הזעירות העומדות לרשותנו מרקמת הפקע. במקביל לנסיונות לשפר את הרגישות ב-Northern blot אנו מנסים לכייל שיטה ל-RT-PCR כמותי. לאחר כיול השיטה נוכל להמשיך בבחינת דגם הביטוי של שבטים שביטויים מושפע על ידי הריסוס בציאנאמיד חומצי ובבחינת מתאם בין נוכחות סמנים שונים ותגובת הגפן לציאנאמיד. בדיקת דגם ההתבטאות של אחד השבטים הראתה השתנות בהתאמה לעקומת התרדמה עם התבטאות מוגברת לקראת ההתעוררות. בשבט אחר מסתמנת ירידה דרסטית בביטוי בהשפעת הטיפול בציאנאמיד חומצי. שבטים נוספים נמצאים בתהליך בחינה בהווה. נבנתה ספריית cDNA מפקעים רדומים והיא משמשת לשיבוט שבטים דיפרנציאליים מבטיחים שאופיינו בשנתיים האחרונות. בין השבטים ששובטו נמצא גן לקינאז שביטוי מעוכב על ידי ציאנאמיד חומצי, גן בעל דמיון לאלכוהול דהידרוגנאז שביטוי יורד עם הכניסה לתרדמה ועולה עם היציאה מתרדמה וגן שלא נמצא לו כל הומולוג בבנק הגנים.

איסוף חומר צמחי והכנת עקומת תרדמה

בעונת החורף 95/6 נאספו פקעי גפן מזן פרלט בכרם בגלגל מתחילת חודש ספטמבר ועד סוף חודש ינואר מדי כשבועיים. בכל מועד נאספו כחמישים זמורות בנות כעשרה פרקים. הזמורות שימשו להכנת 100 יחורים חד פרקיים חסרי עלים ובעלי פקע יחיד. ייחורים אלו הוצבו בעשר קבוצות בנות עשרה ייחורים בתנאי הארה קבועה 23 מ"צ לבדיקת עומק התרדמה. המדד לבדיקת עומק התרדמה הינו אחוז הפקעים

המבלבלים לאחר 21 יום בתנאים אופטימליים. מאותן זמורות נאספו פקעים שהוקפאו בחנקן נוזלי ונשמרים ב -80 מ"צ.

באיור 1 ניתן לראות את עקומת התרדמה שהתקבלה על בסיס הנתונים שנאספו כמתואר. מן העקומה ניתן לראות כי במהלך ספטמבר קיימת עלייה באחוז ההתעוררות של הפקעים עד לשיא בתחילת אוקטובר. דגם זה הינו אופייני וחוזר על עצמו מדי שנה והוא משקף תקופה של התפתחות פקעים. בתחילת ספטמבר יתכן כי חלק מן הפקעים עדיין לא השלימו את התפתחותם ולכן אינם מתעוררים. כאשר נשלמת תקופת ההתפתחות ניתן לקבל 90% התעוררות או יותר. בשלב זה נקלט הגרוי הסביבתי המוביל להתפתחות מצב התרדמה. עבור *V. riparia* ברור כיום כי הגרוי הוא התקצרות אורך היום. עבור *V. vinifera* מדובר כפי הנראה בשילוב של התקצרות אורך היום עם ירידה בטמפרטורה (Fennel and Hoover, 1991, Amer. Soc. Hort. Sci. 116:270-273).

שלב התרדמה המקסימלית היה בן כחודש, בין מחצית נובמבר למחצית דצמבר. בשלב זה הפקעים קולטים סיגנל כלשהו ועוברים תוך כחודש ממצב של תרדמה עמוקה למצב של פעילות צימוח מלאה. מספר מועדי דגימה נבחרו לשמש להמשך השוואות RNA:

- א. נקודת עצמת תרדמה מינימלית עם הכניסה לתרדמה (5.10.95).
 - ב. נקודת עצמת תרדמה מקסימלית בתחילת שלב התרדמה העמוקה (16.11.95).
 - ג. נקודת עצמת תרדמה מקסימלית בסוף שלב התרדמה העמוקה, לקראת ההתעוררות (17.12.95).
 - ד. נקודת עצמת תרדמה נמוכה עם היציאה מתרדמה (15.1.96).
- ניתן לראות כי הנקודות א ו-ב נבדלות באופן מובהק וכמוהן גם הנקודות ג ו-ד. לעובדה זו חשיבות גדולה בתהליך המנסה לאפיין שינויים באוכלוסיות RNA בשלב השראת התרדמה ושלב היציאה מן התרדמה. ההבדל המובהק מצביע על שוני מהותי במצבן הפיזיולוגי של שתי הקבוצות המשוויות בכל צמד. בסתיו-חורף 96/7 נאספו פקעים במועדים דומים מכרם במושב תומר וזאת על מנת לאפשר קבלת והשוואת נתונים ממקומות שונים בבקעת הירדן. לחומר הצמחי ממקומות שונים תהייה חשיבות רבה בזמן חיפוש קורלציות בין מועד הטיפול בציאנמיד חומצי לבין הופעת סמנים דיפרנציאליים.
- באיור 2 ניתן לראות את עקומת התרדמה שהתקבלו על בסיס הנתונים שנאספו כמתואר לאחר 14, 21 ו 40 יום בתנאי המרצה. מן העקומה שצויירה לאחר 21 ימים (התקופה המקובלת להצגת עקומת התרדמה) ניתן לראות כי עד מחצית ספטמבר הפקעים עדיין ערים ומגיעים ל 80% התעוררות (איור 2). משלב זה מתחיל להתפתח מצב תרדמה המגיע לשיאו בתקופה שבין תחילת נובמבר לתחילת דצמבר. במחצית דצמבר מתחיל שלב של יציאה מתרדמה המתבטא בעלייה באחוזי ההתעוררות. במקביל מוצגות עקומות תרדמה המתקבלות לאחר 14 ו 40 ימים. עקומות אלו מייצגות שני מצבים קיצוניים יותר. מדידת אחוזי התעוררות פקעים כבר לאחר 14 יום מבטאת ביתר הדגשה את ההבדל בין אוכלוסיית פקעים רדומה בין סוף אוקטובר למחצית דצמבר לאוכלוסיית פקעים ערה לפני ואחרי פרק זמן זה. לעומת זאת לאחר 40 ימי המרצה נהוג לחשוב כי רב הפקעים, כולל כאלו שהיו רדומים, מתעוררים וההבדל בין האוכלוסיות מתמתן. יחד עם זאת ניתן לראות כי דגם עקומת התרדמה נשמר גם לאחר תקופה זו. בצורת הצגה זו מודגש עומק התרדמה של פקעים שנאספו במהלך חודש נובמבר. בעקומת התרדמה מגלגל ב 95/6 התחיל מצב התרדמה להתפתח במחצית אוקטובר ושלב התרדמה המקסימלית היה בן כחודש, בין מחצית נובמבר למחצית דצמבר. שונות מסוג זה מוכרת ונובעת בין היתר משינויים במשטר ההשקיה של הכרם, השקיה סתוית מאחרת כניסה למצב תרדמה, ומשינויי טמפרטורה בין שנה לשנה.
- על בסיס הנתונים המשולבים משלושת העקומות נבחרו מספר מועדי דגימה לשמש להמשך השוואות RNA:

- א. נקודת עצמת תרדמה מינימלית עם הכניסה לתרדמה (8.10.96).
- ב. נקודת עצמת תרדמה מקסימלית בתחילת שלב התרדמה העמוקה (3.11.96).
- ג. נקודת עצמת תרדמה מקסימלית בסוף שלב התרדמה העמוקה, לקראת ההתעוררות (3.12.96).
- ד. נקודת עצמת תרדמה נמוכה עם היציאה מתרדמה (2.1.97).

נקודות אלו נבדלו גם ברמת ABA בפקעים כאשר היה מתאם הפוך בין אחוז ההתעוררות לרמת ה ABA.

אופטימיזציה של הפקת RNA מפקעי גפן.

נוכחות פוליפנולים בכלל, ופרואנטוציאנינין בפרט, בפקעי גפן מהווה כפי הנראה מכשול בפני יישום שיטות הפקת RNA סטנדרטיות המניבות כמות גדולה של RNA במערכות צמחיות אחרות. לפיכך נדרש מאמץ על מנת לבצע מודיפיקציות בשיטות הקיימות וואו פיתוח שיטות חלופיות. חלק מן הנסיונות שנעשו מתוארים.



בכל הנסיונות להפקת RNA מפקעי גפן מזן פרלט נעשה שימוש בשני גרמים של פקעים. הפקעים נטחנו חנקן נוזלי והחומר הטחון שימש להפקות בשיטות השונות. תחילה נעשו נסיונות להפקת RNA בשיטה הנפוצה בה מורחף החומר הטחון בבופר המכיל גואנידין הידרוכלוריד, נערכת השקעה ספציפית של RNA באמצעות ליתיום כלוריד, הפלט מורחף, החלבונים ממוצים על ידי פנול וכלורופורם ולבסוף נערכת השקעה אתנולית של ה RNA המנוקה (Or et al. 1993. Plant Cell 5:1599-1609). בשיטה זו מתקבל, ברקמות רבות, RNA מאיכות טובה ובניצולת גבוהה. בערוץ B ניתן לראות 1% מכלל ה RNA שהופק מגרם אחד של גרגרי תירס כבקורת להפקה מקבילה מפקעי גפן. בערוץ C הורצו 33% מכלל הכמות שהופקה בשיטה המתוארת משני גרמים של פקעי גפן. מן התמונה ניתן לראות כי מדובר בניצולת אפסית ובאיכות גרועה. מתוך הנחה כי הכמות הגדולה של פוליפנולים ברקמת הגפן עשויה להיקשר אל ה RNA ולהעביר אותו אל הפאזה הפנולית, נעשו מספר מודיפיקציות בנסיון להסיר את הפוליפנולים מן ה RNA על ידי קישור תחרותי. נסיון בו הוסף פוליווינילפולירילידון (PVPP) לבופר הגואנידין (1.5 גרם לריאקציה) מוצג בערוץ D. נסיון להוסיף Bovine serum albumin (BSA) בריכוז של 5% לבופר גואנידין, בנוסף ל PVPP, מוצג בערוצים E (מיצוי בפנול לפני השקעה ב ליתיום כלוריד) ו-F (מיצוי בפנול לאחר ההשקעה בליתיום כלוריד). בכל המקרים הוטען שליש מכלל ההפקה על גיל אגרוז ובכל המקרים לא נראה שיפור באיכות ההפקה. בכל המקרים האמורים הפלט לאחר ההשקעה האתנולית הסופית נשא פיגמנט אדום והיה בעל מסיסות נמוכה. הרצה של המשקע לאחר ההרחפה של הפלט האתנולי המתייחס לערוץ F הראתה כי מרבית ה RNA נמצא במקטע הלא מסיס (ערוץ G). נעשה נסיון לעקוף את הבעיה על ידי התמרת המיצוי הפנולי בהשקעת חלבונים באמצעות אמוניום אצטט (2.5M). לאחר הרחפה בבופר גואנידין נערכה השקעה באמוניום אצטט, עם השקעה קודמת בליתיום

כלוריד (ערוץ I) ובלעדיו (ערוץ J). בשני המקרים הוטען שליש מן הנפח הכולל שהתקבל בתם ההפקה על גיל אגרוז ובשניהם לא הושג כל שיפור ונראה היה כי ה-RNA עבר דגרדציה. בערוץ L מתוארת הפקה שנערכה על בסיס השיטה המשתמשת ב CTAB להפקת DNA גנומי (Saghai-Marroof et al. 1984. PNAS 81:8014-8018). לאחר טיפול בן 10 דקות בחום עם בופר המכיל CTAB וחומר מחזר (בתא מרקפטואתאנול) נערכה השקעה של החומר הגס, הנוזל הועבר להשקעת RNA באמצעות ליתיום כלוריד והפלט המורחף מוצה עם כלורופורם בלבד על מנת לנקות את מקטע ה RNA מחלבונים. הפרדה של 5% מכלל ההפקה בגיל אגרוז מצביעה על ניצולת סבירה של RNA מאיכות טובה. בשיטה זו לא היו בעיות מסיסות או פיגמנטציה של הפלט האתנולי. שיטה זו שימשה ותשמש להמשך העבודה עם רקמות גפן.

בניית ספריית cDNA מפקעים.

להכנת ספריית cDNA מפקעים השתמשנו בקיט ליצירת ספריה בוקטור ZAPII שנרכש מחברת Stratagene. איכותו וכמותו של ה RNA הסבו קשיים מרובים אולם לאחר מאמץ נבנתה ספריה באיכות טובה כאשר הטיטר של הספריה הראשונית לפני אמפליפיקציה היה 6×10^5 .

השוואת אוכלוסיות RNA.

RNA הופק בהתאם לשיטה שהותאמה לפקעי גפן. להפקת RNA שימשו פקעים קפואים. RNA טופל ב RNase free DNase מ Promega והורחף במים מטופלים ב DEPC. חלק מן ההפקה נמהל לריכוז של 100ng/ microliter ושימש ל Differential display (Liang, 1992, Science 257:967-971) and Pardee) לפי פרוטוקול מפורט המצוי בערכה להשוואת RNA בשיטת Differential display הנמכרת על ידי Gene Hunter. פריימרים סונתזו על ידי BTG ונמהלו לריכוז של 2 micromole. ריאקציות הוכנו תוך שימוש בזוגות פריימרים שונים (שמונה עשר צרופים אפשריים בעזרת הפריימרים שברשותנו) והתוצרים הופרדו בגיל דנטורטיבי. זהו מספר שבטים המצביעים על התבטאות דיפרנציאלית במהלך התרדמה. שבטים אלו מוצו מגיל, עברו רה-אמפליפיקציה ושובטו ל T-cloning vector שנרכש מ Promega.

בשנת המחקר הראשונה התחלנו להשוות בשיטה זו אוכלוסיות RNA מפקעי פרלט שנדגמו בארבע נקודות זמן במהלך התרדמה ונבדלו באופן מובהק בעצמת התרדמה ביניהן. אותרו מספר שבטים המצביעים על התבטאות דיפרנציאלית במהלך תקופת התרדמה. קטעי ה-DNA מוצו מגיל, עברו אמפליפיקציה ושובטו (איור 3).

מאחר ועיקר העניין שלנו הוא בסמנים שיופיעו לקראת ההתעוררות החלטנו לאתר סמנים נוספים לשלב המעבר בין תרדמה להתעוררות תוך שימוש במערכת האינדוקטיבית של טיפול בציאנמיד חומצי. מערכת מודל זו מאפשרת הגדרת שלב המעבר בין תרדמה להתעוררות ונותנת אפשרות למעקב אחר השינויים החלים בהשפעת האינדוקציה להתעוררות. לימוד ואפיון שינויים בביטוי גנים בפאות מעבר זו עשויה לתרום רבות להבנת תהליך ההתעוררות והגורמים הנוטלים בו חלק, והיא עשויה לתרום לאפיון סמנים הקשורים ישירות לתהליך ההתעוררות בשלבי הראשונים.

לשם כך התחלנו להשוות אוכלוסיות RNA מפקעי גפן שטופלו בציאנמיד חומצי לפקעי בקורת בשיטת Differential display. במקביל למעקב אחרי התעוררות הפקעים בכרם במועדי הזמירה השונים (איור 6) נלקחו שתי קבוצות של זמורות בנות עשרה פקעים בכל מועד זמירה. קבוצה אחת רוססה ב-5% אלזודף

והשניה רוססה במים. הזמורות הובאו למעבדה ונחתכו ליחורים חד פרקיים שהועברו ל 23 מ"צ. עשר קבוצות בנות עשרה יחורים מהטיפול ומהבקורת שימשו למעקב אחר התעוררות בתנאים מבוקרים. כששים קבוצות בנות חמישים יחורים שהו בטמפרטורה של 23 מ"צ (בכוסיות מים). לאחר יום, שלושה ימים ושבוע ממועד הטיפול הוצאו עשרים קבוצות יחורים ופקעיהם הוקפאו בחנקן נוזלי ונשמרו ב -80 מ"צ. להפקת RNA שימשו פקעי טיפול ובקורת שהוקפאו לאחר יום ושלושה ימים.

RNA שימש להשוואות RNA בשיטת Differential display. קטע מאחד הגילים מוצג באיור 4 ותלק מן הפסים הדיפרנציאליים מסומן בתמונה בחיצים. ניתן לראות כי כבר לאחר יום ממועד הטיפול מופיעים הבדלים דרמטיים בביטוי גנים בין פקעים מטופלים לפקעי בקורת. שבטים שהראו ביטוי דיפרנציאלי מוצו מגיל, עברו רה-אמפליפיקציה ושובטו ל T-cloning vector שנרכש מ Promega.

אפיון סמנים שזוהו כבעלי ביטוי דיפרנציאלי ובחינת דגם ההתבטאות שלהם.

א. שבטים מהשוואות אוכלוסיות RNA מפקעי פרלט שנדגמו בארבע נקודות זמן במהלך התרדמה.

אחד השבטים שמוצו מן הגיל, BR1822, סומן בזרחן רדיואקטיבי ושימש כפרוב לבדיקת דגם ההתבטאות של הגן אותו הוא מייצג במהלך התרדמה. לצורך זה הופק RNA מפקעים מארבע נקודות ההשוואה ששמשו להשוואת האוכלוסיות, ואשר עומק התרדמה שלהן מתואר בעקומה קווית באיור 5. RNA זה שימש להכנת Northern blot ונערכה היברידיזציה בין הפרוב המסומן לבלוט זה. הבלוט המסומן נסרק באמצעות Phosphoimager ותוצאות הסריקה נורמלו על ידי שימוש בפרוב ריבוזומלי. באיור 5 ניתן לראות השתנות בביטוי הגן br1822 בהתאמה לעקומת התרדמה. ההתבטאות המוגברת לקראת ההתעוררות עשויה לרמז כי מדובר בגן הקשור לפעילות צימוח ונמצא תחת רפרסיה בשלב התרדמה העמוקה. אפשרות אחרת היא כי צבירת קור מהווה סיגנל לאקטיבציה של גן מווסת המעורב בהסרת הרפרסיה מעל גנים אחרים. מאחר והגן האמור מתבטא גם בזמן התרדמה, אם כי ברמה נמוכה יותר, האפשרות הראשונה היא בעלת סבירות גבוהה יותר.

ריצוף חלקי של קטע ה-DNA שבידינו הראה הומולוגיה גבוהה לגן לאלכוהול דהידרוגנאז. ידוע בספרות כי ציאנמיד חומצי מעכב פעילותו של אלכוהול דהידרוגנאז בבני אדם ועל כן אסורה שתיית אלכוהול על חקלאים בסמוך למועד בו הם מטפלים בכרם בציאנמיד חומצי. האפשרות של אינטראקציה בין אלכוהול דהידרוגנאז לבין ציאנמיד חומצי והקשר שלה לתהליך שבירת התרדמה תלמד בהמשך. מאחר ובידינו רק קטע קצר מן אנו מממשיכים לשבט את הגן השלם מספרית cDNA מפקעים.

ריצוף של שלושה סמנים דיפרנציאליים נוספים ששובטו לא הראה דמיון לגן מוכר בספרות. מאחר והפרגמנטים הם קצרים מאד (כמאה וחמישים בסיסים) יש סבירות גבוהה שהם חלק מה 3'UTR ואינם מייצגים את הקטע המבני של הגן. בימים אלו אנו מתחילים לשבט קטעים ארוכים יותר מהספריה תוך שימוש בפרגמנטים שבידינו כגלאים ואז נוכל לקבל אינפורמציה רבה יותר מריצוף הגנים. אחת הבעיות העיקריות המאטה את קצב ההתקדמות הינה הכמויות המוגבלות של פקעים ו-RNA העומדים לרשותנו והרגישות המוגבלת של Northern blot. מגבלה זו מונעת מאיתנו לבדוק באמצעות Northern blot דגם ביטוי של קלונים ששובטו במהלך השוואות RNA.

מסיבה זו התחלנו בנסיונות לכייל שיטה של RT-PCR כמותי על בסיס קיט Quantum של חברת Ambion. שיטה זו תאפשר השוואות כמותיות תוך שימוש בכמויות זעירות של RNA. לאחר כיול השיטה נוכל להמשיך בבחינת דגם הביטוי של שבטים שנמצא שביטויים משתנה במהלך התרדמה לפי השוואות RNA בשיטת Differential display.

ב. שבטים מהשוואת אוכלוסיות RNA מפקעי פרלט שנדגמו מזמורות מטופלות בציאנמיד חומצי

וזמורות בקורת.

בין הגנים שביטויים משתנה אפיינו לאחרונה גן אחד שבידינו קלון חלקי שלו בן כחמש מאות בסיסים. גן זה אינו מראה דמיון לגן כלשהו לפי השוואות למאגרי הנתונים, אנו ממשיכים בשיבוט הגן על מנת לבדוק אם הגן השלם מראה דמיון לגן כלשהו. גן שני, GPK1 מקדד על פי השוואות רצף, לפרוטאין קינאז. ביטוי של גן זה משתנה באופן דרמטי בהשפעת ריסוס בציאנמיד חומצי. לגבי פרוטאין קינאזות רבים נמצא כי הם מעורבים בתהליכי העברת סיגנלים (Signal transduction).

תגובת הצמח/ התא הצמחי לקבלת סיגנל כרוכה בשינויים בזרימת יונים, שינויים בפעולת חלבונים ושינויים בביטוי גנים. תגובה זו חולקה בעבר לתגובה מהירה שאינה כרוכה בשינוי בביטוי גנים ותגובה איטית בה חל בין היתר שינוי בביטוי גנים אולם כיום ברור כי אותה רשת העברת סיגנלים מבקרת את התגובות המהירות והאיטיות (11). ממצאי הנסיונות להבנת מסלולי העברתם של סיגנלים בצמחים מתייחסים ברובם לתפקידים המרכזי של קלמודולין ופרוטאין קינאזות בתהליכי העברת הסיגנל (7A, 10,11).

הסיגנל נקלט לראשונה על ידי רצפטור, שעשוי להיות ממוקם בממברנה, בציטופלסמה, בדופן התא או בגרעין. הרצפטורים המוכרים הם חלבונים והידועים שבהם הינם פרוטאין קינאזות. רצפטורים אחרים שייכים למשפחת ה GTPases. הרצפטורים מביאים לשחרור של second messengers המפעילים פרוטאין קינאזות המבקרות תנועה וגידול או מביאות לזרחון של Transcription factors. קיימת גם אפשרות של הפעלה ישירה של קינאזות על ידי קינאזות אחרות שקדמו להן בשרשרת העברת הסיגנל (10,11).

פרוטאין קינאזות מתווכות בתהליך העברת זרחון מ ATP לשיר צדדי של חומצה אמינית, סרין, תריאונין או טירוזין. פעולתן של הקינאזות עשויה להתבטל על ידי פעולה נגדית של פרוטאין-פוספאטאזות. מצב הזרחון של חלבון עשוי להיות בעל השפעה גדולה על פעילותו ועל יכולת האינטראקציה של עם חלבונים אחרים ועל כן זרחון רברסבילי יכול להיות כלי יעיל לוויסות תהליכים והעברת סיגנלים. מודיפיקציה של חלבונים על ידי פרוטאין קינאזות ידועה לכן כמסלול ההעברה העיקרי לסיגנלים רבים. אחת הקבוצות הידועות הינה קבוצת הקינאזות היוצרת את ה MAPK cascade. קבוצה זו מעורבת בהעברת סיגנלים כימיים וסביבתיים דוגמת עקה אוסמוטית, פציעה, ABA, אתילן, fungal elicitors ועוד. כמו כן קיימות הוכחות להשתתפותן של קבוצות אחרות של קינאזות צמחיות בתהליכי העברת סיגנלים (7A, 10,11).

סמיכות השינוי בביטוי של הגן למתן הסיגנל הכימי החיצוני להתעוררות מביאה אותנו לשער כי מדובר בגן בעל תפקיד רגולטורי בתהליך שבירת התרדמה. על מנת לאפיין את הגן וללמוד על מעורבותו בהעברת הסיגנל שיבטנו ראשית את הגן החלקי מספריית הפקעים והשלמנו את רב החלק החסר באמצעות RT-PCR תוך שימוש ב degenerate primer שתוכן על בסיס רצפים שמורים ב Kinase zone I ובפריימר ספציפי מן הקלון החלקי של GPK1. נוכחות הגן בעצים נשירים אחרים נבדקת כרגע ב Southern blots וביטוי בצמחים אלו בהשפעת ציאנמיד חומצי יבחן באמצעות northern blots של RNA מפקעים מטופלים ופקעי בקורת.

בנוסף לגן המבני אנו מתחילים בשיבוט הפרומוטור מספרייה גנומית של גפן הקיימת במחלקתנו על מנת לנסות ללמוד מן הרצף על קיום אתרי בקרה. ברצוננו ללמוד את דגם ביטוי של הגן ממספר דקות ועד מספר ימים לאחר מתן הטיפול באמצעות Northern blots או תוך שימוש ב RT-PCR. נבדוק אם הגן מתבטא ברקמות גפן נוספות (עלים, שורשים, גבעולים). הגן השלם יוכנס לוקטור ביטוי pRSET ויוכנו נגדו נוגדנים. נוגדנים אלו ישמשו

לבדיקת ההשתנות ברמת החלבון באמצעות western blot בהשפעת הטיפול. יערכו מבחני פוספורילציה על מיצוי מפקעים מטופלים בציאנמיד חומצי ופקעי ביקורת. פוספורילציה in vivo תבדק במערכת של פקעים מנותקים. נבחן גם שיטה לאוטופוספורילציה של חלבוני המיצוי על גבי ממברנה ואוטופוספורילציה של החלבון המנוקה לאחר ביטוי מוגבר שלו ב E. coli מאותו וקטור שישמש להכנת חלבון לצורך הפקת נוגדנים. הנוגדנים שיוכנו בשלב הקודם ישמשו לאימונופריסיטציה של החלבון המזורחן. בעתיד נרצה לבדוק אם ניתן להשפיע על ביטוי הגן בעזרת בעזרת סיגנלים אלטרנטיביים, ונבקש לבחון את השפעת הציאנמיד החומצי על ביטוי הגן על ידי חיבור גן מדווח לפרומוטור. אנו מתכוונים לבחון אפשרות של הקמת מערכת מודל של פקעות תפוחי אדמה או תרבות תאי גפן שתאפשר לנו בחינת ביטוי הגן. את חשיבותו של הקינאז להעברת הסיגנל נרצה לבחון על ידי הכנת antisense construct וטרנספורמציה שלו לגפן. מאחר וחסרה לנו אינפורמציה בסיסית רבה ברור כי אנחנו רחוקים עדיין מן האפשרות לתכנן מבחנים מן הסוג המתואר מעל.

לאור החשיבות העתידית שאנו מייחסים לחלק זה של המחקר אנו חושבים שחשוב להתחיל בו מאמץ באופן מיידי. חשיבותו עצומה משום שהוא עשוי לאפשר שבירת תרדמה על ידי סיגנל אלטרנטיבי לציאנמיד חומצי ולאפשר שליטה טובה יותר בהתעוררות בגפן ובעצי פרי נשירים באזורים חמים וקרים ברחבי העולם.

פרק ב: יישום מוקדם של ציאנמיד חומצי לשבירת תרדמה בגפן מזן 'פרלט' גורם לפגיעה משמעותית ביבול גם כאשר רמת ההתעוררות הפקעים תקינה.

תקציר

הפתרון האגרוטכני המקובל לשבירת תרדמה בגפן באזורים חמים הינו ריסוס בציאנמיד חומצי ("דורמקס"). המועד האופטימלי לטיפול בציאנמיד חומצי נמצא בחלון צר במהלך התפתחותו של הפקע. במסגרת המאמץ למצוא את חלון הזמן האופטימלי עבור כל אזור, נבחנו בבקעת הירדן תגובת הגפן לטיפול בציאנמיד חומצי במספר מועדי טיפול.

רמת הבלבול היא הממד העיקרי המקובל כיום לבדיקת אופטימום הטיפול ומקובל לחשוב כי בטיפול מוקדם רמת ההתעוררות ואחידותה נפגעות. בניגוד למקובל לא מצאנו בשלושת שנות הניסוי הבדלים מובהקים ברמת הבלבול בין טיפולים שנערכו במועדים שונים. גם אחידות הבלבול לא נבדלה באופן בולט.

בניגוד להשפעה קטנה ובלתי מובהקת של טיפול מוקדם בציאנמיד חומצי על אחוז הפקעים המתעוררים, נמצאה פגיעה גדולה ומובהקת של טיפול במועד זה במספר האשכולות וגודלם וביבול הממוצע לגפן. מן הנתונים המובאים ניתן להסיק כי ההנחה המקובלת, לפיה פגיעה ביבול הגפן בהשפעת טיפול בציאנמיד חומצי נובעת מירידה במספר הפקעים המתעוררים, אינה בהכרח נכונה ועל כן הסתמכות על נתוני רמת הבלבול לשם החלטה בדבר מועד טיפול אופטימלי הינה מוטעית ומסוכנת.

על פי הנתונים המובאים, בולטת העובדה כי הפגיעה המהותית הכרוכה בטיפול בציאנמיד חומצי במועד מוקדם הינה הפגיעה ביבול, הנובעת, כנראה, מהשפעה ייחודית של ציאנמיד חומצי על התפתחות המריסטמה הרפרודוקטיבית בלבד.

הסיבה לפגיעה הספציפית של הטיפול בציאנמיד חומצי הן במספר האשכולות והן בגודלם במועד הטיפול המוקדם אינה ברורה עדיין. עבודה לבירור התופעה נמשכת.

מבוא

הגפן הינה מין נשיר העובר בתנאי אקלים ממוזג וסובטרופי תרדמה חורפית. לאחר שהושרתה תרדמה נדרשת מנת קור מינימלית על מנת להביא להתעוררות מתרדמה (6,7). מבין המינים הנשירים נחשבת הגפן כבעלת דרישות קור מועטות יחסית אולם גם דרישות אלו לא תמיד מתמלאות באזורים חמים ועל כן

גידול גפן באזורים אלו כרוך בהתעוררות פקעים לקויה מתרדמה. התעוררות לקויה מתבטאת באיחור בהתעוררות, חוסר אחידות במועד פתיחת הפקעים, ירידה ביבולים והתנוונות מהירה של הגפנים (2,9). הבכרה המתאפשרת עקב האביב החם הינה היתרון העיקרי של אזורים חמים דוגמת בקעת הירדן והערבה בגידול ענבי מאכל ועל כן התעוררות פקעים לקויה ומאחרת מהווה פגיעה משמעותית בכלכליות הגידול. באזורים אלו הצורך באמצעים מלאכותיים לשבירת תרדמה, על מנת לפצות על העדר הקור הטבעי, הופך לחיוני בשגרת הטיפול בכרם (1A,3,4,9).

הפתרון האגרוטכני המקובל לשבירת התרדמה בכרם הינו ריסוס בציאנמיד חומצי שנמצא כשובר התרדמה הכימי היעיל ביותר בגפן (2,5,8,9). מנגנון הפעולה של ציאנמיד חומצי אינו ברור אולם ידוע כי ריכוז הציאנמיד החומצי ומועד הריסוס האופטימלי לשבירת תרדמה משתנים בתלות בהשתנות עוצמת התרדמה של הפקע, שאינה מלווה בשינויים חזותיים בהתפתחות הפקע ולכן קשה לחיזוי (2).

היחס בין שלב ההתפתחות של הפקע לבין תגובתו לציאנמיד חומצי אינו ברור אולם ידוע כי עמידות הפקעים לטיפול בציאנמיד חומצי יורדת במהירות עם היציאה מן התרדמה ועל כן מקובל להימנע מריסוס מאוחר כדי למנוע נזק לפקעים. ליישום מוקדם מדי של ציאנמיד חומצי, כאשר הפקעים בשלב התרדמה עמוקה, אין השפעה שוברת תרדמה או שלחילופין הוא עשוי לגרום להתעוררות חלקית ולא אחידה של פקעים. התעוררות חלקית ובלתי אחידה זו עלולה להביא לפגיעה ברמת היבול ובאיכותו (2,3,4,9). המועד האופטימלי לטיפול בציאנמיד חומצי נמצא בחלון צר במהלך התפתחותו של הפקע ואיתורו של חלון זה הינו בעל חשיבות כלכלית גדולה.

במסגרת המאמץ למצוא את חלון הזמן האופטימלי עבור כל אזור, נבחנה בבקעת הירדן תגובת הגפן לטיפול בציאנמיד חומצי במספר מועדי טיפול. מועדי הטיפול שנבחנו היו כאלה הנמצאים בטווח הזמנים בו מבוצעים טיפולים אלו בפועל בכרמים המסחריים בבקעת הירדן.

חומרים ושיטות

הניסויים נערכו במהלך שלוש שנים בחלקות גפן מסחריות בפצאל ובתומר בבקעת הירדן. גפנים מהזן 'פרלטי' נזמרו בשלושה מועדים שונים: מחצית דצמבר, ראשית ינואר ומחצית ינואר. שלוש קבוצות בנות שש גפנים נזמרו בכל מועד, תוך השארת שלושה פקעים לזמורה, וריסוס מיד לאחר הזמירה. ארבע גפנים בכל קבוצה רוססו ב 5% "דורמקס" ושתיים רוססו במים ושימשו כביקורת. השתמשנו בתכשיר המסחרי "דורמקס" המשווק על ידי חברת אגן ומכיל 48% ציאנמיד חומצי. התריסוס, שהכיל 0.01% של Triton X-100 כמשטח, ניתן במרסס גב תוך הקפדה על כיסוי מלא של הגפנים הזמורות. לאחר הטיפול נספר סך כל הפקעים בכל גפן ומדי שבוע, במשך שישה שבועות ממועד כל טיפול, נספרו הפקעים המתעוררים בכל גפן וחושב % הפקעים המתעוררים. מספר האשכולות לגפן נספר כששה שבועות מתחילת פריצת הפקעים. בעת ההבשלה נשקל היבול ונלקחו מדגמים לבדיקת משקל האשכול, משקל הגרגר ואחוז הסוכר והחומצה. בנוסף לטיפול ה"דורמקס" או הביקורת ניתנו לגפנים כל הטיפולים המסחריים הנהוגים בזן פרלטי. לבדיקת השתנות עומק תרדמת הפקעים במהלך העונה נאספו מדי שבועיים, מתחילת ספטמבר ועד למחצית ינואר, עשר קבוצות בנות עשרה ייחורים חד פרקיים. ייחורים אלו הונחו בכוסיות מים ועברו המרצה בטמפרטורה של 23 מ"צ ותאורה במשך 12 שעות ביממה למשך 40 ימים. אחוז הפקעים המתעוררים נמדד לאחר 14, 21 ו 40 ימים. תוצאות מייצגות מובאות כממוצעים ומצוינות סטיית התקן.

השתנות עומק התרדמה בפקעי גפן במהלך החורף בבקעת הירדן.

השיטה המקובלת למדידת עומק התרדמה הינו חישוב אחוז הפקעים המלבלבים לאחר 21 ימים בתנאי המרצה אופטימליים (23°C ותאורה מלאה). מן הנתונים המובאים ניתן לראות כי במחצית ספטמבר הפקעים עדיין ערים ומגיעים ל-80% התעוררות (איור 2). משלב זה מתחיל להתפתח מצב תרדמה המגיע לשיאו בתקופה שבין תחילת נובמבר לתחילת דצמבר. במחצית דצמבר מתחיל שלב של יציאה מתרדמה המתבטא בעלייה באחוזי ההתעוררות. עקומות התרדמה המתקבלות לאחר 14 ו 40 ימי המרצה מייצגות מצבים קיצוניים יותר. מדידת אחוזי התעוררות הפקעים לאחר 14 יום בתנאי המרצה מחדדת את נקודות המעבר בין התעוררות לתרדמה ומדגישה את ההבדל בין התנהגותה של אוכלוסיית פקעים רדומה (בין סוף אוקטובר למחצית דצמבר) לאוכלוסייה ערה (עד מחצית אוקטובר ומסוף דצמבר). לאחר 40 ימי המרצה רב הפקעים, כולל כאלו שהיו רדומים, מתעוררים וההבדל בין האוכלוסיות מתמתן. יחד עם זאת ניתן לראות כי דגם עקומת התרדמה נשמר ומודגש עומק התרדמה של פקעים שנאספו במהלך נובמבר. בשלושת שנות הניסוי התקבל דגם דומה של עקומת התרדמה. השונות בין שנה לשנה התבטאה בשינויים של כשבוע עד שבועיים במועד הכניסה לתרדמה והיציאה ממנה ובמשך שלב התרדמה העמוקה. על פי הנתונים משלושת העקומות המוצגות באיור 2 ניתן לראות כי במחצית דצמבר אוכלוסיית הפקעים נמצאת בנקודת הצומת שבין שלב התרדמה עמוקה לתחילת ההתעוררות.

השפעת מועד הטיפול בציאנמיד חומצי על רמת התעוררות הפקעים ואחידותה.

פריצת הפקעים בגפנים שטופלו ב"דורמקס", בשלושת מועדי הטיפול השונים, החלה לאחר כארבעה שבועות ממועד הריסוס ונמשכה עד כששה שבועות לאחריו. פקעים שלא התעוררו עד למועד זה לא לבלבו כלל (איור 6). בגפנים שנזמרו וטופלו במחצית דצמבר היתה התעוררות של כ-50% מן הפקעים לאחר ארבעה שבועות ממועד הריסוס והתעוררות של 20% נוספים בשבועיים שלאחר מכן. בגפנים שטופלו באופן זהה בסוף דצמבר-תחילת ינואר ובמחצית ינואר אחוזי ההתעוררות הסופיים לא היו גבוהים באופן מובהק מאלו שנצפו בגפנים ממועד הטיפול הראשון, וקצב ההתעוררות היה דומה. יחד עם זאת יש לציין כי מבדיקה רב שנתית נראית נטייה קבועה, אם כי לא מובהקת, לשיפור של עד 10% בהתעוררות גפנים שנזמרו ורוססו במחצית ינואר בהשוואה עם אלו שנזמרו ורוססו במחצית דצמבר.

השפעת מועד הטיפול בציאנמיד חומצי על היבול

בניגוד לממצאים המצביעים על ההשפעה הקטנה והבלתי מובהקת של מועד הטיפול על אחוז הפקעים המתעוררים ועל אחידות ההתעוררות נמצאה השפעה בולטת ומובהקת של מועד הטיפול על מספר האשכולות, גודל האשכול והיבול המתקבל לגפן.

מהשוואת מספר האשכולות בין גפנים שטופלו ב"דורמקס" בשלושה מועדים שונים, בין מחצית דצמבר למחצית ינואר (איור 7), ניתן ללמוד כי מספר האשכולות לגפן יורד באופן מובהק ככל שמועד הזמירה והריסוס ב"דורמקס" מוקדם יותר. גפנים שטופלו במחצית דצמבר נשאו בממוצע שנים עשר אשכולות ואילו גפנים שטופלו במחצית ינואר נשאו בממוצע כארבעים אשכולות. לעומת זאת, בגפני הביקורת, שנזמרו באותו מועד ורוססו במים בלבד, אין הבדל מובהק במספר האשכולות בהשפעת מועד הזמירה והריסוס והן נשאו 30-35 אשכולות לגפן.

כמוכן נמצא כי במועד הטיפול הראשון מספר האשכולות הממוצע בגפנים שרוססו במים בלבד עולה, באופן מובהק, פי שניים ויותר על מספר האשכולות בגפנים שרוססו ב"דורמקס".

מלבד השפעת מועד הטיפול על מספר האשכולות לגפן נמצאה גם השפעה על גודל האשכול. מהשוואת משקל האשכולות בין גפנים שטופלו ב"דורמקס" בשלושת המועדים השונים, נמצא כי משקל האשכול יורד באופן מובהק ככל שמועד הזמירה והריסוס ב"דורמקס" מוקדם יותר (איור 8). אשכולות שהתפתחו על גפנים שנזמרו וטופלו ב"דורמקס" במחצית דצמבר שקלו בממוצע כ-125 גרם, אשכולות מגפנים שטופלו בתחילת ינואר שקלו בממוצע כ-190 גרם, ואילו אשכולות מגפנים שטופלו במחצית ינואר שקלו בממוצע כ-275 גרם.

בניגוד להבדלים המובהקים שנמצאו במשקל האשכול בהשפעת הטיפול ב"דורמקס", משקל האשכול הממוצע בביקורת אינו נבדל בשלושת המועדים ועומד על 260-270 גרם, בדומה למשקל האשכול שהתקבל מטיפול "דורמקס" במחצית ינואר.

מהשוואת נתונים בין טיפול הביקורת לטיפול ב"דורמקס" במועד הניסוי הראשון (מחצית דצמבר) נראה כי משקל האשכול הממוצע בגפנים מטיפול הביקורת עולה פי שניים על זה שנמדד בגפנים שטופלו ב"דורמקס".

משקל הגרגר עצמו לא נבדל באופן מובהק בין גפנים שטופלו ב"דורמקס" במועדי הטיפול השונים (איור 9), אם כי ניתן להבחין בנטייה קלה לירידה במשקל הגרגר באשכולות שנבצרו מגפנים שטופלו במועד הטיפול האחרון.

על בסיס הנתונים של משקל האשכול ומשקל הגרגר חושב מספר הגרגרים הממוצע לאשכול עבור מועדי הטיפול השונים ב"דורמקס". בטיפול הביקורת מספר הגרגרים המחושב לאשכול הינו בסביבות 110 גרגרים ללא תלות במועד הזמירה והריסוס (איור 10). בטיפול "דורמקס", לעומת זאת, מספר הגרגרים לאשכול הולך ויורד ככל שמועד הטיפול מוקדם יותר. מספר הגרגרים לאשכול מטיפול במחצית ינואר הוא כ-110-115 גרגרים, בדומה לנתון שהתקבל בטיפול הביקורת. מספר גרגרים זה הינו המספר המקובל כאופטימלי עבור אשכול פרלט איכותי. בטיפול בראשית ינואר מספר הגרגרים לאשכול הינו כ-80 ואילו במועד הטיפול המוקדם, מחצית דצמבר מספר הגרגרים לאשכול היה כ-50 בלבד.

בעת הבציר התבצעה שקילת יבול נפרדת עבור כל גפן בכל החזרות והטיפולים. נתוני היבול הממוצע לגפן כפי שנמדדו בשתי עונות עוקבות 95-6 ו 96-7 מוצגים בנפרד (איור 11). מהשוואת היבול בין גפנים שטופלו ב"דורמקס" בשלושה מועדים שונים, בין מחצית דצמבר למחצית ינואר, ניתן ללמוד כי היבול יורד באופן בולט ומובהק ככל שמועד הזמירה והריסוס ב"דורמקס" מוקדם יותר. היבול הממוצע מגפנים שטופלו "דורמקס" במחצית דצמבר היה בין 2.5-6 ק"ג לגפן. גפנים שטופלו בראשית ינואר הניבו בממוצע בין 6-8 ק"ג לגפן ואילו היבול על גפנים שטופלו במחצית ינואר היה כ-13 ק"ג לגפן.

בגפני הביקורת היבול הממוצע במועדי הטיפול השונים היה כ-12 ק"ג לגפן למעט מועד הטיפול השני בשנת הניסוי הראשונה, שבו היבול היה כ-10 ק"ג לגפן ומועד הטיפול השלישי בשנת הניסוי 96-7, שבו היבול הממוצע הגיע לכ-8 ק"ג לגפן, יבול נמוך מזה שהתקבל בשני מועדי הטיפול הראשונים.

השוואת נתוני היבול בין גפני הביקורת לגפנים המטופלות ב"דורמקס" מראה כי כאשר הטיפול ניתן במחצית דצמבר היבול הממוצע בגפנים המטופלות ב"דורמקס" מהווה 15-50% מן היבול הממוצע בגפני הביקורת.

השפעת מועד הטיפול בציאנמיד חומצי על מועד הבציר.

גפנים שטופלו ב"דורמקס" במחצית דצמבר מתעוררות כחודש לפני הגפנים שטופלו במחצית ינואר (איור 6). בחינה השוואתית של דרגת ההבשלה של גפנים שטופלו ב"דורמקס" בשלושת מועדי הטיפול נערכה במועד הבציר הראשון, בו נבצר הפרי מגפנים שטופלו ב"דורמקס" במחצית דצמבר (איור 12). במועד בדיקה זה נמצאו הבדלים מובהקים בתכולת הסוכר והחומצה כאשר פרי ממועד הטיפול המוקדם הוא בעל רמת הסוכר הגבוהה ביותר ורמת החומצה הנמוכה ביותר ופרי ממועד הטיפול המאוחר הוא בעל רמת הסוכר הנמוכה ביותר ורמת החומצה הגבוהה ביותר. נתונים אלו השפיעו כמובן על מועד הבציר של הפרי מן הטיפולים השונים (טבלה 1).

טבלה 1: השפעת מועד הריסוס ב"דורמקס" על מועד הבציר

מועד זמירה וריסוס ב"דורמקס"	מועד בציר	ימים מריסוס לבציר
18.12.96	3.6.97	168
2.1.97	8.6.97	156
14.1.97	15.6.97	152

הקדמת הריסוס בשנים עשר יום, ממחצית ינואר לתחילת ינואר, הביאה להקדמת הבציר בשבעה ימים ואילו הקדמת הריסוס בעשרים ושמונה ימים, ממחצית ינואר למחצית דצמבר, הביאה להקדמת הבציר בשנים עשר ימים. מחישוב מספר הימים מריסוס לבציר (טבלה 1) ניתן לראות כי ככל שהריסוס מוקדם יותר עולה מספר הימים הנדרש עד להבשלה לדרגה המתאימה לבציר.

דיון

מהלך התרדמה של פקעי גפן בבקעת הירדן נמצא במעקב מתחילת שנות השמונים (9). מהלך התרדמה מתואר על ידי בחינת עומק התרדמה של אוכלוסיית פקעים הנדגמת מדי שבועיים בין ספטמבר לפברואר. המדד שנבחר לתאור עומק התרדמה הינו אחוז הפקעים המבלבלים לאחר שלושה שבועות בתנאים אופטימליים לגידול. עקומת התרדמה העונתית שהתקבלה מראה כי עד למחצית ספטמבר או תחילת אוקטובר הפקעים עדיין ערים. בסביבות מחצית אוקטובר חלה ירידה ביכולת הפקעים להתעורר בתנאים אופטימליים. ירידה זו מעידה על התפתחות מצב תרדמה. עומק התרדמה מגיע לשיאו ברוב החורפים במהלך חודש נובמבר וזאת למרות שבחורפים רבים מספר שעות הקור הנצבר עד סוף נובמבר הוא נמוך מאוד. המשתנה העיקרי בין השנים השונות הוא משך תקופת התרדמה העמוקה שהינו ארוך יותר בשנים חמות וקצר יותר בשנים קרות. לאחר תקופה זו שמשכה בין שלושה לחמישה שבועות בתנאי בקעת הירדן מתחילה עלייה ביכולת הבלבול. עלייה זו עשויה להיות חדה יותר בשנים קרות ומתונה יותר בשנים חמות. תחילתו של תהליך היציאה מתרדמה מתרחשת בדרך כלל בדצמבר והעיתוי המדויק במהלך דצמבר תלוי במשך תקופת התרדמה, המשתנה עם השנים. מעקב אחר מהלך התרדמה שנערך במשך הניסויים הנוכחיים, בכרמים בהם בוצעו הניסויים, מעיד כי מהלך התרדמה בשנות הניסוי היה אופייני לגפן בבקעת הירדן. תגובת הגפנים בכרמי הניסוי בשנות הניסוי יכולה על כן לייצג את התנהגות הכרמים בבקעת הירדן. במהלך התרדמה, להוציא הבדלים שעשויים לנבוע משינויים בשגרת הטיפול בכרם.

השפעת מועד הטיפול בציאנמיד חומצי על התעוררות הפקעים ואחידותה.

יתרונם הכלכלי העיקרי של מגדלי גפן מאכל באזורים חמים נעוץ באפשרות הבכרת הגידול. אך טבעי הוא שחקלאים באזורים אלו ינסו להקדים את התעוררות הגפן ככל שניתן. השימוש ב"דורמקס" בריכוז גבוה ובמועד מוקדם מן המומלץ הוא מן הפיתויים שחקלאים רבים לא עומדים בהם נוכח המחירים הגבוהים בעונה המוקדמת. המדקמים שבחקלאי בקעת הירדן מתחילים בפעולות הזמירה והריסוס במחצית דצמבר אשר לפי עקומת התרדמה האופיינית מהווה נקודת המעבר בין תרדמה עמוקה לתחילת תהליכי יציאה ממנה.

ידוע מזה שנים כי ציאנמיד חומצי פועל בצורה אופטימלית כאשר ניתן מספר שבועות לפני ההתעוררות הטבעית ולאחר צבירה מסוימת של מנות קור (2). המדד לבדיקת אופטימום הפעולה הוא אחוזי הבלבול. הדעה הרווחת בין העוסקים בגידול הגפן באזורים חמים הינה כי טיפול מוקדם ב"דורמקס" פגיעתו רעה משום שהוא מביא לבלבול לא אחיד, באחוזים נמוכים, לעומת טיפול במועד מאוחר. הירידה באחוז הפקעים המתעוררים היא, על פי דעה זו, הסיבה לירידה ברמת היבול (2,3,4,5,9,12). בניסויים שערכנו בשלוש השנים האחרונות בבקעת הירדן, בחרנו להשוות את רמת הבלבול בהשפעת טיפול ב"דורמקס" במועדים שונים, הנמצאים כולם בטווח התאריכים המקובלים על כורמי בקעת הירדן למטרה זו.

בניגוד לדעה הרווחת, לא מצאנו בשלוש שנות הניסוי הבדלים מובהקים ברמת הבלבול בין טיפולים שנערכו במועדים שונים וגם אחידות הבלבול לא נבדלה באופן בולט. על סמך נתונים אלו על רמת הבלבול, שהיא המדד העיקרי המקובל כיום לבדיקת אופטימליות הטיפול, ניתן היה להסיק כי אין כל מניעה להתחיל בטיפולי שבירת תרדמה במחצית דצמבר ולהביא להקדמה של כשבועיים בהבשלה, הקדמה שהיא בעלת משמעות כלכלית נכבדה בעונת היצוא המוקדם. ניתוח השפעת מועד הטיפול על מספר האשכולות וגודלם ועל רמת היבול מראה כי הסתמכות על נתוני רמת הבלבול לשם החלטה בדבר מועד טיפול אופטימלי הינה מוטעית ומסוכנת. בניגוד לממצאים המצביעים על השפעה קטנה ובלתי מובהקת של מועד הטיפול על אחוז הפקעים המתעוררים נמצאה

השפעה מובהקת וגדולה של מועד הטיפול על מספר האשכולות, גודלם ועל היבול הממוצע לגפן. טיפול במועד מוקדם הביא לירידה גדולה במספר האשכולות ובמשקלם. הירידה במשקל האשכול נובעת ממספר גרגרים נמוך יותר ולא משוני בגודל גרגר. ממצא זה מעיד על פגיעה במבנה האשכול ולא בפוטנציאל ההתפתחות של הגרגר.

מנתוני טיפול הביקורת, שנזמר באותו מועד ורוסס במים, ניתן להסיק כי למועד הזמירה המוקדם אין השפעה מזיקה על איכות היבול וגודלו. מספר האשכולות הגדול יותר ואיכות האשכולות הגבוהה יותר בטיפול זה, בהשוואה לטיפול ב"דורמקס" באותו מועד, מדגימים את פוטנציאל היבול במועד הזמירה המוקדם. כמו כן הם מדגישים את העובדה כי הנוק לפוטנציאל זה הוא תוצאה ישירה של הטיפול ב"דורמקס".

מן הנתונים המובאים ניתן לראות כי במועד הטיפול המוקדם קיימת השפעה חיובית על התעוררות המרכיב הוגטטיבי של הפקע המורכב בגפן, מרכיב העלווה, והשפעה שלילית על המרכיב הרפרודוקטיבי של הפקע האחראי להתפתחות הפרי. על פי הנתונים המובאים בולטת העובדה כי פגיעה ביבול קיימת גם כאשר ההתעוררות טובה ועל כן פגיעה זו אינה קשורה בהתעוררות הוגטטיבית.

הסיבה לפגיעה הספציפית של "דורמקס" במספר האשכולות ובגודלם במועד הטיפול המוקדם אינה ברורה. סיבה אפשרית אחת שניתן להעלות הינה פגיעה ישירה של החומר במריסטמה הרפרודוקטיבית בפקע הנמצאת במועד זה בשלב התפתחותי רגיש. במקרה זה ירידה בריכוז ה"דורמקס" עשויה להקטין את הנוק. הקטנת ריכוז ה"דורמקס" עשויה מאידך להוריד את אחוזי ההתעוררות. שילוב בין "דורמקס" לשובר תרדמה נוסף שאינו פוגע באשכולות עשוי לאפשר הקטנת הנוק תוך הימנעות מפגיעה בהתעוררות. ניסויים הקדמיים לשילוב שוברי תרדמה תוך הקטנת אחוז ה"דורמקס" הצביעו על אפשרות של הקטנת הנוק לפרי ושיפור היבול.

הנוק לאשכולות יכול לנבוע גם מפגיעה עקיפה על ידי הקדמת תהליכי הצימוח וחשיפת הבלבוב הצעיר לתנאי מזג האוויר הקיימים בין מחצית דצמבר למחצית ינואר.

אפשרות אחרת היא כי השבירה המוקדמת של תרדמת הפקע יכולה להביא לעצירת התמיינותה הסופית של מריסטמת האשכול.

בעצי פרי נשירים מסויימים מוכרת השפעה דיפרנציאלית של "דורמקס" על פקעי עלווה ופקעי פרי. באפרסקים מבכירים, שזיפים, נקטרינות ותפוחים מוכרת תופעה של לבלוב מצוין של פקעי עלווה יחד עם התעוררות גרועה ביותר עד אפסית של פקעי פרי כתוצאה מתמותתם (2).

הקדמת הטיפול לשבירת תרדמה בכשלושים ימים, ממחצית ינואר למחצית דצמבר, מביאה להקדמה של 12 יום בלבד במועד הבציר. פער זה נובע מן העובדה שככל שמועד הטיפול מוקדם יותר מספר הימים עד להבשלת הפרי עולה, וזאת משום שתחילת ההתפתחות נעשית בטמפרטורה נמוכה יחסית, שבה קצב הצימוח איטי יותר. אמנם להקדמה זו עשויה להיות משמעות כלכלית בתחילת עונת היצוא אולם בשקלול התועלת הכלכלית הנובעת מהבכרה אל מול הנוק הבולט ברמת היבול ואיכותו, נמצא כי המחיר הגבוה יותר ליחידת משקל הנבצרת מוקדם יותר אינו מפצה על היבול הנמוך וכי טיפול במחצית דצמבר מקטין את הרווח מן הגידול בארבעים אחוזים ויותר (בתלות בשנה) וזאת לאחר התחשבות בחסכון הנובע מטיפול בכמות קטנה יותר של תוצרת.

פרק ג: הפרדת מועד הזמירה ממועד הריסוס בציאנמיד חומצי בכרם 'פרלט' בבקעת הירדן.

תקציר

ההנחיה המקובלת לטיפול בציאנמיד חומצי (דורמקס) בגפן בכלל ובזן פרלט בפרט, משלבת המלצה לריסוס מיד לאחר הזמירה. הסברה הרווחת הנה כי פער זמן ממושך בין זמירה לריסוס יביא לירידה ברמת ההתעוררות ולפחיתה ביבול. יישום ההמלצה לריסוס מיד לאחר הזמירה כרוך בגיוס כוח אדם רב לזמן קצר, ומוביל בדרך כלל לגיוס עובדים לא מיומנים ולפגיעה באיכות הזמירה. סיטואציה זו הובילה לבחינה מחודשת של הצורך בהצמדת הריסוס לזמירה. בניסיון דו שנתי נבדקה השפעת ההפרדה בין זמירה

לריסוס על רמת ההתעוררות והיבול בון פרלט, בתנאי בקעת הירדן. לא נמצא הבדל ברמת ההתעוררות וביבול בין גפנים שרוססו במחצית ינואר, מיד לאחר זמירתן, לבין גפנים שרוססו באותו מועד אך נזמרו שבועיים או חודש לפני מועד הריסוס. הבשלת הפרי בגפנים שרוססו במחצית ינואר חלה שבוע לאחר ההבשלה בגפנים שנזמרו ורוססו במחצית דצמבר. גפנים שנזמרו במחצית דצמבר ורוססו בציאנמיד חומצי (דורמקס) רק כחודש לאחר מכן נשאו יבול כפול, בהשוואה לגפנים שנזמרו באותו מועד ורוססו מיד לאחר הזמירה. ממצאים אלו מאפשרים הפרדת מועד הזמירה ממועד הריסוס, לשיפור איכות הזמירה והיבול ולנוחות הכורס.

מבוא

ריסוס בציאנמיד חומצי (דורמקס) נמצא כטיפול היעיל ביותר לשבירת תרדמה בגפן והוא מהווה טיפול שגרתי בגידול ענבים באזורים בעלי אקלים חם (2,3,4,9). ההנחיה המקובלת לטיפול בציאנמיד חומצי בון פרלט משלבת המלצה לריסוס מיד לאחר הזמירה. הרעיון העומד בבסיס ההמלצה הוא שילוב אפקט הפצע בהשפעת הציאנמיד החומצי, להעצמת הגירוי המוביל לשבירת תרדמה ולשיפור ברמת ההתעוררות ואחידותה. הסברה הרווחת הנה כי פער זמן ממושך בין זמירה לריסוס יביא לירידה ברמת ההתעוררות ולפחיתה ביבול (1,5A).

יישום ההמלצה לריסוס מיד לאחר הזמירה כרוך בגיוס כוח אדם רב לזמן קצר, על מנת לסיים את תהליך הזמירה והריסוס במסגרת חלון הזמן האופטימלי ליישום ציאנמיד חומצי. הזמירה הנה אחת הפעולות המורכבות בגידול הגפן, ולאיכות ביצועה השפעה גדולה על צורת הגפן, על השליטה בצימוח ועל איכות היבול וכמותו. גיוס עובדים רבים לזמן קצר לא תמיד אפשרי וגם כאשר הוא מתבצע הוא מוביל בדרך כלל לגיוס עובדים לא מיומנים ולפגיעה באיכות הזמירה. הבעיה מחריפה כמובן ככל שהכרם גדול יותר. סיטואציה זו הובילה לבחינה מחודשת של הצורך בהצמדת הריסוס לזמירה. בניסיון דו שנתי נבדקה השפעת הניתוק בין זמירה לריסוס על רמת ההתעוררות והיבול בון פרלט בתנאי בקעת הירדן.

חומרים ושיטות

הניסויים נערכו במשך שנתיים בחלקת גפן מסחרית במושב תומר בבקעת הירדן. גפנים מזן פרלט נזמרו בשלושה מועדים שונים: מחצית דצמבר, תחילת ינואר ומחצית ינואר. בכל מועד נזמרו שלוש קבוצות בנות תשע גפנים תוך השארת שלושה פקעים לזמורה. שלוש גפנים בכל קבוצה רוססו מיד לאחר הזמירה ב 5% דורמקס, שלוש גפנים נוספות רוססו באותו זמן במים ושלושת הגפנים הנותרות רוססו ב 5% דורמקס רק במחצית ינואר. לריסוס השתמשנו בתכשיר המסחרי "דורמקס" המשווק על ידי חברת אגן ומכיל 48% ציאנמיד חומצי. התרסיס הכיל משטח (Triton x-100 0.01%) וניתן במרסס גב תוך הקפדה על כיסוי מלא של הגפנים הזמורות.

לאחר הטיפול נספר מספר הפקעים הכללי בכל גפן, ובמשך ששה שבועות מזמן הריסוס נספרו הפקעים המתעוררים בכל גפן. פקע נחשב למתעורר כאשר החל בצבוץ של רקמה ירוקה. מספר האשכולות בכל גפן נספר לפני הפריחה, והיבול נשקל בזמן הבציר. בנוסף לטיפול הדורמקס והביקורת ניתנו לגפנים כל הטיפולים המסחריים הנהוגים בון פרלט. התוצאות מבוטאות כממוצעים של שלוש חזרות ומצוינת סטיית התקן.

תוצאות

השפעת ההפרדה בין מועד הריסוס ומועד הזמירה על רמת ההתעוררות של הפקעים. מתן ציאנמיד חומצי במועדים השונים, ובהפרשי זמן משתנים ממועד הזמירה, לא שינה את פרק הזמן שעבר מן הריסוס ועד למועד פריצת הפקעים. פריצת הפקעים החלה כארבעה שבועות ממתן הציאנמיד ונמשכה כשבועיים (נתונים אלו אינם מוצגים). מן האמור לעיל יובן כי גפנים שרוססו במחצית דצמבר התעוררו כשבועיים לפני אלו שרוססו בתחילת ינואר וחודש לפני הגפנים שרוססו במחצית ינואר, ללא תלות במועד הזמירה.

כאשר הושוותה רמת ההתעוררות בין גפנים שנזמרו יחד, במחצית דצמבר, ורוססו בהפרש של כחודש לא נמצא הבדל מובהק בשנת הניסוי הראשונה, ובשנת הניסוי השנייה נמצא הבדל של אחוזים בודדים בלבד (איור 13).

גפנים שנזמרו בתחילת ינואר ורוססו לאחר שבועיים לא נבדלו ברמת ההתעוררות באופן מובהק מגפנים שנזמרו באותו מועד ורוססו מיד, בשתי שנות הניסוי.

גפנים שנזמרו במחצית ינואר ורוססו מיד לא נבדלו באופן מובהק ברמת ההתעוררות מגפנים שרוססו באותו מועד אך נזמרו שבועיים או חודש לפני כן. בשנת הניסויים השנייה אחוז ההתעוררות הממוצע היה גבוה ב 10-15% בהשוואה לשנת הניסויים הראשונה (איור 13).

השפעת ההפרדה בין מועד הזמירה ומועד הריסוס על היבול.

גפנים שנזמרו במחצית דצמבר ורוססו בדורמקס רק כחודש לאחר מכן נשאו מספר כפול של אשכולות בהשוואה לגפנים שנזמרו באותו מועד ורוססו מיד לאחר הזמירה (איור 14). ההבדל בכמות האשכולות בין גפנים שנזמרו בראשית ינואר ורוססו בהפרש של שבועיים היה קטן יותר. גפנים שנזמרו במחצית ינואר ורוססו מיד לא נבדלו באופן מובהק בכמות האשכולות מגפנים שנזמרו שבועיים או חודש לפני שרוססו במחצית ינואר.

רמת היבול, בדומה למספר האשכולות, הייתה דומה בגפנים שנזמרו במועדים שונים אך רוססו יחד במחצית ינואר. רמת היבול בגפנים אלו הייתה כ- 15 קילוגרם לגפן, שבחישוב מתאימים לכשלושה טון לדונם (איור 15).

גפנים שנזמרו במחצית דצמבר ורוססו רק לאחר כחודש, במחצית ינואר, נשאו יכול כפול מיבולן של גפנים שנזמרו ורוססו במחצית דצמבר. האחרונות נשאו יכול של כ- 7.5 קילוגרם לגפן המקביל ליבול של כטון וחצי לדונם.

הבשלת הפרי מגפנים שנזמרו במחצית דצמבר ורוססו במחצית ינואר חלה כשבוע לאחר הבשלת הפרי מגפנים שרוססו במחצית דצמבר, מיד לאחר הזמירה (טבלה 2).

טבלה 2 : השפעת הפרדת מועד הזמירה ממועד הריסוס בצינאמיד חומצי (דורמקס) על התפלגות היבול בין מועדי הבציר השונים. הנתונים מייצגים אחוז היבול בבציר מסויים מסך כל היבול לטיפול.

מועד בציר	26.5.98	1.6.98	8.6.98	16.6.98	
מועד זמירה	מועד ריסוס				
מחצית דצמבר	מחצית דצמבר	39	5.5	5.5	50
מחצית דצמבר	מחצית ינואר	25.5	62	12.5	
ראשית ינואר	ראשית ינואר	23	29	2	46
ראשית ינואר	מחצית ינואר	6.5	90.8	2.7	
מחצית ינואר	מחצית ינואר	24.8	70.4	4.8	

דיון

זמירת גפנים בטיפול הביקורת במחצית דצמבר או ראשית ינואר, שלא לוותה בריסוס בדורמקס, לא הביאה להקדמה במועד ההתעוררות. גפנים אלו החלו להתעורר במועד ההתעוררות הטבעי, בשלש האחרון של פברואר, ימים בודדים לאחר הגפנים שנזמרו במחצית ינואר. לא נמצא כל הפרש במועדי ההבשלה של גפנים שנזמרו בשלושת המועדים השונים ולא רוססו בדורמקס (הנתונים אינם מובאים). על פי תוצאות אלו ניתן להסיק כי לפעולת הזמירה עצמה לא הייתה השפעה משמעותית על שבירת תרדמה או על קצב הצימוח של הפקע, שהגיב לתנאי הסביבה בלבד. חשיבותה של הזמירה על פי ממצאים אלו היא בעיקר לעיצוב הגפן ולביטול השלטון הקודקודי של הפקעים האמיריים, המשפר את אחידות ההתעוררות לאורך הזמורה.

לטיפול בציאנמיד חומצי (דורמקס) הייתה השפעה שוברת תרדמה שהייתה בלתי תלויה במועד הזמירה. בכל מועד בו ניתן, גרם הדורמקס להתחלה של התעוררות פקעים לאחר כארבעה שבועות ממועד הריסוס, בין אם הגפנים נזמרו באותו יום, שבועיים או חודש קודם לכן. רמת ההתעוררות בתגובה לריסוס בדורמקס הייתה דומה, ללא תלות בזמן שעבר בין מועד הזמירה למועד הריסוס.

כאשר הטיפול בדורמקס ניתן במחצית ינואר, הזמן שעבר מן הזמירה ועד לטיפול לא השפיע על מספר האשכולות ועל היבול לגפן. כלומר, גפנים שרוססו שבועיים או חודש לאחר הזמירה נתנו יכול דומה לזה של גפנים שרוססו מיד לאחר זמירתן, במחצית ינואר.

גפנים שרוססו במחצית דצמבר או בראשית ינואר, מיד לאחר זמירתן, נשאו יכולים נמוכים מאלו שנשאו גפנים שנזמרו במקביל ורוססו בדורמקס שבועיים או חודש מאוחר יותר. תוצאה זו הינה בניגוד לצפוי על פי הסברה המקובלת, לפיה הפרש בין זמירה לריסוס עשו לגרום לירידה ביבול.

השונויות ביבול אינה נובעת מההבדל בתקופה שבין הזמירה לריסוס. לראיה יובאו תוצאות הריסוס במחצית ינואר לפיהן גפנים שנזמרו שבועיים או חודש לפני הריסוס לא נבדלו ביבול מגפנים שנזמרו ורוססו באותו יום, במחצית ינואר. השונויות ביבול נובעת מהשתנות ברגישות מריסטמת האשכול לטיפול בדורמקס בתלות במועד הטיפול.

יש לציין כי עבור גפנים שנזמרו בראשית ינואר נבדק רק הפרש של שבועיים בין מועד הזמירה לריסוס. הפרש של חודש מזמירה במועד זה ועד לריסוס משמעו ריסוס בראשית פברואר, כשבועיים עד ארבעה שבועות לפני מועד ההתעוררות הטבעי. ריסוס בתחילת פברואר לא יקנה, מחד, הקדמה על פני התעוררות טבעית בסוף פברואר, ומאידך יהיה בעל פוטנציאל פיטוטוקסיות גבוה, משום שבשלב זה מריסטמות הפקע הם בשלבי התפתחות מתקדמים לקראת הפריצה האביבית.

השפעת ריסוס המבוצע שבועיים לאחר זמירה במחצית דצמבר לא נבדקה עדיין ותיבדק בהמשך. על בסיס התוצאות הנוכחיות, ההשערה היא כי לא צפוי שינוי ברמת ההתעוררות אולם קיימת אפשרות של קבלת יבול נמוך יותר בהשוואה לריסוס לאחר כחודש, במחצית ינואר. השונויות ביבול הצפוי נובעת ממועד הטיפול בדורמקס ולא מן ההבדל בתקופה שבין הזמירה לריסוס. כמו כן לא בדקנו עדיין בגישה זו זמירה מוקדמת ממחצית דצמבר והדבר ייבדק בהמשך. סביר להניח כי בניגוד לממצאים קודמים, לפיהם זמירה מוקדמת יותר שניתנה בשילוב עם ריסוס בציאנמיד חומצי גרמה להתעוררות בלתי אחידה, ניתן יהיה לגזום מוקדם יותר, בתנאי שהריסוס לא יתבצע לפני תחילת ינואר.

על בסיס התוצאות שהובאו ניתן לסכם כי לטיפול המשלב זמירה ממחצית דצמבר ועד אמצע ינואר עם ריסוס בדורמקס רק במחצית ינואר, לא הייתה כל השפעה שלילית על התעוררות והייתה השפעה חיובית על היבול. תחילת זמירה במחצית דצמבר או תחילת ינואר משחררת את החקלאי מן הצורך לגייס כוח אדם רב ובלתי מיומן, ומאפשרת זמירה מקצועית שלא תחת לחץ. ריסוס מרוכז לקראת מחצית ינואר של כרמים שנזמרו החל ממחצית דצמבר יחסוך זמן וחומר ואף הראה יתרון משמעותי ביבול. חסרונו היחיד של ריסוס במחצית ינואר הוא בכך שהיבול הבשיל ונבצר כשבוע לאחר הבציר של פרי מטיפולים שנזמרו ורוססו במחצית דצמבר ותחילת ינואר. על הכורס לשקול אם הקדמה של שבוע עד שבועיים במועד הבציר שקולה כנגד הנוחות והאיכות שבזמירה וכנגד השיפור המשמעותי בכמות היבול ואיכותו.

נספחים

1. Or, E., Nir, G and Vilozy, I. (1998).
Evidence for differential sensitivity of the reproductive organ within the grape compound bud to hydrogen cyanamide application.
Vitis (in press.)
2. Or, E., Nir, G., Vilozy, I., Stromza, A. and Sarig, P. (1998).
Uncoupling of pruning from hydrogen cyanamide application in "Perlette" at the Jordan valley does not affect bud break and allow better yield.
Alon Hanotea (in press.).
3. Or, E., Nir, G., Vilozy, I., Stromza, A. and Ogredovitch, A. (1998).
Timing of hydrogen cyanamide application: minor effect on bud break and major effect on yield.
Alon Hanotea (in press.).
4. Or, E., and Vilozy, I. (1998).
Characterization of molecular markers for the detection of optimal timing for dormancy breaking treatment in grape vine.
7th International Symposium on Grapevine Genetics and Breeding.

איור 1: השתנות עומק תרדמת הפקעים בגפנים מן הזן "פרלט" במהלך חורף 95-6 בבקעת הירדן. עשר קבוצות בנות עשרה ייחורים חד פרקיים נאספו בכל מועד ועברו המרצה בתנאים של 23 מ"צ 120 שעות תאורה ביממה. אחוז הפקעים המלבבים חושב לאחר 21 ימים. הערכים הינם ממוצע של עשר חזרות בכל מועד דגימה.

איור 2: השתנות עומק תרדמת הפקעים בגפנים מן הזן "פרלט" במהלך חורף 96-7 בבקעת הירדן. פרטי הניסוי כמתואר באיור 1. אחוז הפקעים המלבבים חושב לאחר 14, 21 ו 40 ימים.

איור 3: השוואת אוכלוסיות RNA מפקעי גפן בשלבים שונים של מחזור התרדמה על ידי שימוש בשיטת

Differential display. דגימות RNA ששימשו להשוואות היו מארבעה מועדי דגימה. השונות

המובהקת בשלב התרדמה בו נמצאים הפקעים במועדים אלו היווה בסיס לבחירת נקודות ההשוואה.

שונות זו מתבטאת בערכי עומק התרדמה של פקעים שנדגמו במועדים אלו (איור 1).

RNA הופק מפקעים מזן פרלט שהוקפאו במועדים השונים, טופל ב Reverse transcriptase לקבלת

cDNA ועבר אמפליפיקציה ב PCR תוך שימוש בתחל (primer) אקראי ותחל מסוג polyT לפי Liang

and Pardee (Science, 1992, 257:967-971). תוצרי האמפליפיקציה הופרדו בגיל אקריל

אמיד: אוריאח בריכוז של 6%. האותיות שמתחת לערוצי הגיל הנראים בתמונה מציינות את נקודות

הדגימה המשוות: B=15.10.95, C=30.10.95, D=30.11.95, E=15.12.95.

איור 4: השוואת אוכלוסיות RNA מפקעי גפן שטופלו בציאנמיד חומצי ומפקעי בקורת על ידי שימוש

בשיטת **Differential display**. פקעי פרלט מטיפול ב 5% אלזודף ומטיפול בקורת שימשו להשוואות

RNA. ייחורים נושאי פקעים שהו לאחר הטיפול בטמפרטורה מיטבית להתעוררות, 23 מ"צ, ולאחר יום

או שלושה ימים הוקפאו בחנקן נוזלי ונשמרו ב-80 מ"צ. השוואות RNA נעשו כמתואר באיור 3. האותיות

מתחת לערוצי הגל מציינות את נקודות הדגימה המשוות. 1H: פקעים מטופלים לאחר יום אחד ב 23 מ"צ,

1C: פקעי בקורת לאחר יום אחד ב 23 מ"צ, 3H: פקעים מטופלים לאחר שלושה ימים ב 23 מ"צ, 3C: פקעי

בקורת לאחר שלושה ימים ב 23 מ"צ.

איור 5: ההשתנות בהתבטאות השבט 1822BR נמצאת בהתאמה עם מחזור התרדמה. RNA הופק

מפקעי גפן מזן פרלט שנאספו בארבע נקודות זמן שונות במהלך תרדמת הפקעים והוקפאו. דגימות אלו

נבדלות באופן מובהק בשלב התרדמה שבו הן נמצאות על בסיס עקומת התרדמה הקווית המוצגת בתמונה

(עומק התרדמה נמדד כמתואר באיור 1). דגימות בנות חמישה עשר מיקרוגרם של total RNA שימשו

להכנת Northern blot. לאחר היברידיזציה עם השבט 1822BR (שסומן באמצעות זרחן רדיואקטיבי)

נערכה אנליזה תוך שימוש ב Fuji phosphoimager. נורמליזציה נערכה באמצעות פרוב ריבוזומלי.

הערכים המוצגים בעמודות מציינים את הכמות המוספת של 1822BR mRNA (באחוזים) מעל לערך

הנמוך ביותר שנמצא בפקעים שנדגמו בשלושים באוקטובר.

איור 6: השפעת מועד הטיפול בציאנמיד חומצי על רמת ההתעוררות וקצב ההתעוררות של פקעי גפן מזן

פרלט. גפנים מזן פרלט בכרם מסחרי במושב תומר נזמרו בשלושה מועדים שונים. הושארו שלושה פקעים

לזמורה. שלוש קבוצות בנות שש גפנים טופלו בכל מועד, ארבע גפנים רוססו ב 5% "דורמקס" בסמוך

לזמירה ושתיים רוססו במים. סך כל הפקעים נספר בזמן הטיפול ו % הפקעים המתעוררים חושב מדי

שבוע במשך שישה שבועות ממועד כל טיפול. העמודות בגוונים השונים מייצגות את מועדי הטיפול השונים

(אפור: 18 בדצמבר, שחור: 2 בינואר, לבן: 14 בינואר).

איור 7: השפעת מועד הטיפול בציאנמיד חומצי על מספר האשכולות לגפן. פרטי הניסוי מתוארים באיור

6. לאחר הלכוב נספר מספר האשכולות בכל גפן והערכים המוצגים הם ממוצע של שלוש חזרות. עמודות

אפורות מציינות מספר האשכולות בגפנים ש רוססו ב 5% "דורמקס" ועמודות לבנות מציינות את מספר האשכולות בגפנים שרוססו במים.

איור 8: **השפעת מועד הטיפול בציאנמיד חומצי על משקל האשכול**. פרטי הניסוי מתוארים באיור 6. בזמן הבציר נשקלו האשכולות מכל קבוצה והערכים המוצגים הם ממוצע של שלוש חזרות. עמודות אפורות מציינות משקל האשכולות בגפנים שרוססו ב 5% "דורמקס" ועמודות לבנות מציינות את משקל האשכולות בגפנים שרוססו במים.

איור 9: **השפעת מועד הטיפול בציאנמיד חומצי על משקל הגרגר**. פרטי הניסוי מתוארים באיור 6. בזמן הבציר נדגמו עשרים כתפי אשכולות מכל חזרה, נשקלו עשרה גרגרים מכל אשכול וחושב משקל גרגר ממוצע לחזרה. הערכים המוצגים הם ממוצע משקל הגרגר משלוש חזרות. העמודות מציינות את משקל הגרגר בגפנים שרוססו ב 5% "דורמקס" במועדי הריסוס השונים.

איור 10: **השפעת מועד הטיפול בציאנמיד חומצי על מספר הגרגרים באשכול**. מספר הגרגרים הממוצע לאשכול חושב על בסיס משקל הגרגר הממוצע ומשקל האשכול הממוצע בכל טיפול. עמודות שחורות מציינות מספר גרגרים ממוצע לאשכול בגפנים שרוססו ב 5% "דורמקס" ועמודות לבנות מציינות את מספר הגרגרים ממוצע לאשכול בגפנים שרוססו במים.

איור 11: **השפעת מועד הטיפול בציאנמיד חומצי על היבול לגפן**. פרטי הניסוי כמתואר באיור 6. בזמן הבציר נשקלו כל האשכולות והנתונים המוצגים הינם ממוצע של שלוש חזרות לטיפול. עמודות שחורות מציינות יבול לממוצע לגפן שרוססה ב 5% "דורמקס" ועמודות לבנות מציינות יבול ממוצע לגפן שרוססה במים.

איור 12: **השפעת מועד הטיפול בציאנמיד חומצי על דרגת ההבשלה**. פרטי הניסוי מתוארים באיור 6. אחוזי החומצה והסוכר מפרי משלושת מועדי הטיפול ב 5% "דורמקס" נקבעו בזמן הבציר של הפרי ממועד הטיפול הראשון. הנתונים המוצגים הינם ממוצעי שלוש החזרות.

איור 13: **השפעת הפרדת מועד הזמירה ממועד הטיפול בציאנמיד חומצי (דורמקס) על רמת ההתעוררות בגפנים מזן פרלט**. גפנים מזן פרלט בכרם מסחרי בבקעת הירדן נזמרו בשלושה מועדים שונים. בכל מועד נזמרו שלוש קבוצות בנות תשע גפנים תוך השארת שלוש פקעים לזמורה. שלוש גפנים בכל קבוצה רוססו מיד לאחר הגיזום ב 5% דורמקס, שלוש גפנים נוספות רוססו באותו זמן במים ושלושת הגפנים הנותרות רוססו ב 5% דורמקס רק במחצית ינואר. לאחר הזמירה נספר מספר הפקעים הכללי בכל גפן ולמשך ששה שבועות מזמן הריסוס בציאנמיד חומצי נספרו הפקעים המתעוררים בכל גפן. מוצגים נתונים משתי שנות

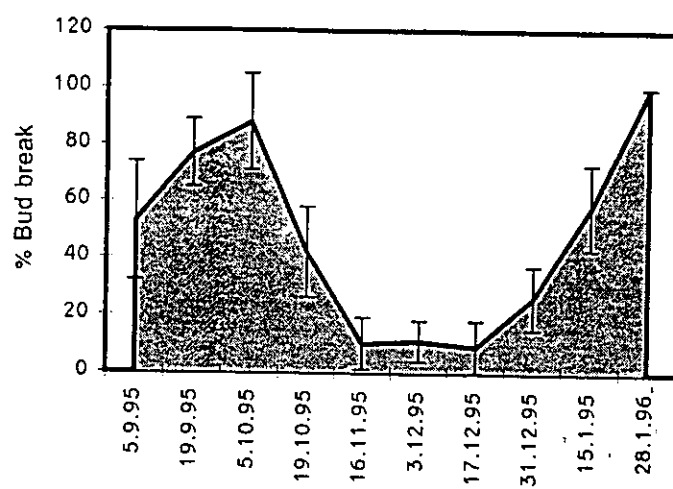
ניסוי עוקבות: 1996 (A) ו 1997 (B). עמודות אפורות מציינות את אחוז הפקעים המתעוררים בגפנים שרוססו בדורמקס במועד הזמירה ועמודות לבנות מציינות את אחוז הפקעים המתעוררים בגפנים שריסוסן בדורמקס נדחה למחצית ינואר.

איור 14: **השפעת הפרדת מועד הזמירה ממועד הטיפול בציאנמיד חומצי על מספר האשכולות לגפן בכרם מסחרי מזן פרלט בבקעת הירדן**.

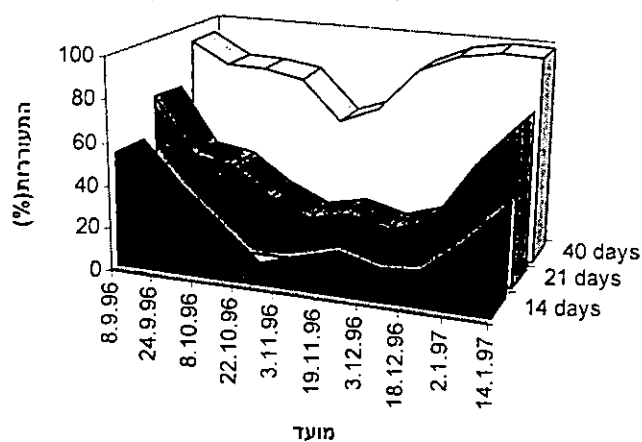
פרטי הניסוי כמתואר באיור 13. מספר האשכולות בכל גפן נספר לפני הפריחה ומוצגים נתונים מגפנים שרוססו בציאנמיד חומצי במועדים השונים. עמודות אפורות מציינות מספר אשכולות ממוצע בגפנים שרוססו בדורמקס במועד הזמירה ועמודות לבנות מציינות מספר אשכולות ממוצע בגפנים שריסוסן בדורמקס נדחה למחצית ינואר.

איור 15: **השפעת הפרדת מועד הזמירה ממועד הטיפול בציאנמיד חומצי על היבול לגפן בכרם מסחרי מזן פרלט בבקעת הירדן**. פרטי הניסוי מתוארים באיור 13. היבול מכל גפן נשקל בזמן הקטיף ומובאים נתוני היבול של גפנים שרוססו בציאנמיד חומצי במועדים השונים. עמודות אפורות מציינות יבול ממוצע לגפנים שרוססו בדורמקס במועד הזמירה ועמודות לבנות מציינות יבול ממוצע לגפנים שריסוסן בדורמקס נדחה למחצית ינואר.

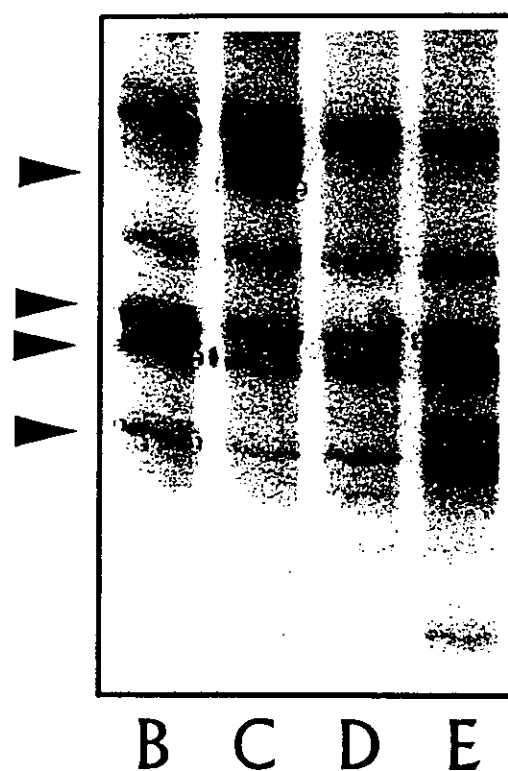
1. ביבי, י. (1997) חוברת הדרכה לגידול גפן בבקעת הירדן. בהוצאת ההסתדרות הציונית.
- 1A. Erez, A. (1987). Chemical control of budbreak. HortScience 22: 1240-1243.
2. Erez, A. (1995). Means to compensate for insufficient chilling to improve bloom and leafing. Acta Hort. 395:81-95.
3. George, A.P. and Nissen, R.J. (1990). Effects of hydrogen cyanamide on yield, growth and dormancy of table grapes in subtropical Australia. Acta Hort. 279: 427-436.
4. George, A.P., Nissen, R.J. and Baker, J.A., (1988). Effects of Hydrogen Cyanamide in manipulating budburst and advancing fruit maturity of table grapes in South-Eastern Queensland. Australian J. of Exp. Agric. 28: 533-538.
5. Pires, E.J.P., Terra, M.M., Pommer, C.V., Passos, I.R.S., Nagai, V. and Ambrosano, G.M.B. (1995). Adjustment of ideal hydrogen cyanamide concentration for breaking dormancy of grapevine in less warm region. Acta Hort. 395:169-176.
- 5A. Maraschin, M., Koller, O.C. and Dasilva A.L. (1992). Effect of the pruning time and application of calcium cyanamide on the dormancy breaking and productivity of *cv. Niagara Branca*. Pesquisa Agropecuaria Brasileira 27:3.
6. Samish, R.M. (1954). Dormancy in woody plants. Ann. Rev. plant physiol. 5:183-204.
7. Saure, M. (1985). Dormancy release in deciduous fruit trees. Hort. Rev. 7:239-300.
- 7A. Sheen, J. 1996. Ca^{2+} dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. Science 274: 1900-1903.
8. Shikhamany, S.D. and Reddy, N.N., (1989). Comparative efficacy of Cyanamide and Thioured sprays on budbreak in Thompson seedless grape. Indian Grape J. 3: 37-42.
9. Shulman, Y., Nir, G., Fanberstein, L. and Lavee, S. (1983). The effect of cyanamide on the release from dormancy of grapevine buds. Scientia Horticulturae 19:97-104.
10. Stone, J.M., Walker, J.C. 1995. Plant protein kinase families and signal transduction. Plant Physiol. 108: 451-457.
11. Trewavas, A.J. and Malho, R. 1997. Signal perception and transduction: The origin of the phenotype. Plant Cell 9: 1181-1195.
12. Zelleke, A. and Kliewer, M. W. (1989). The effects of hydrogen cyanamide on enhancing the time and amount of budbreak in young grape vineyards. Amer. J. Enol. Vitic. 40:47-51.



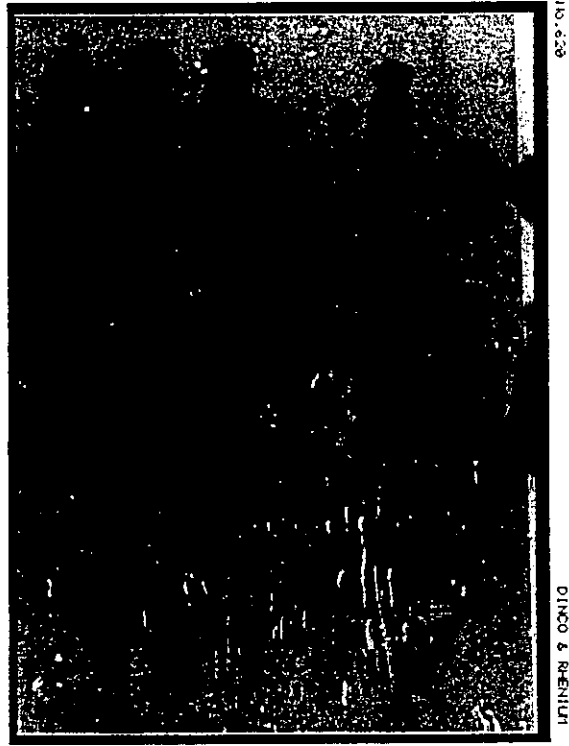
איור 1



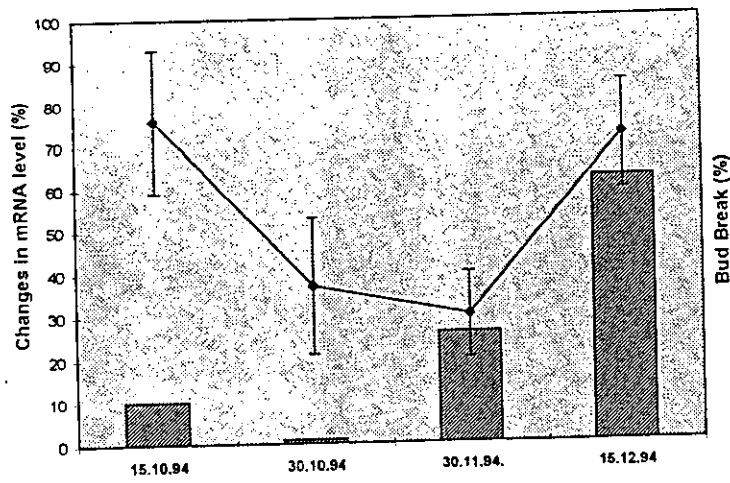
איור 2



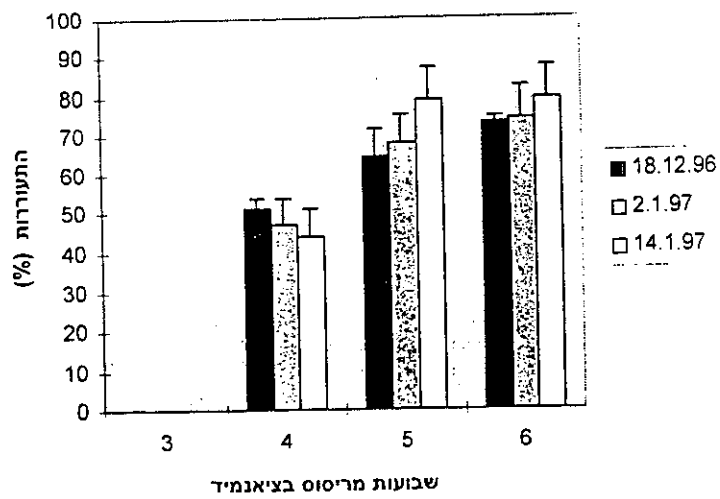
איור 3



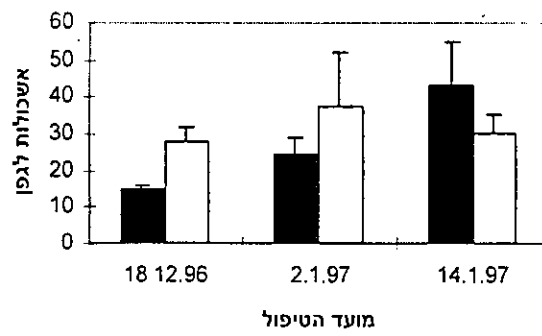
איור 4



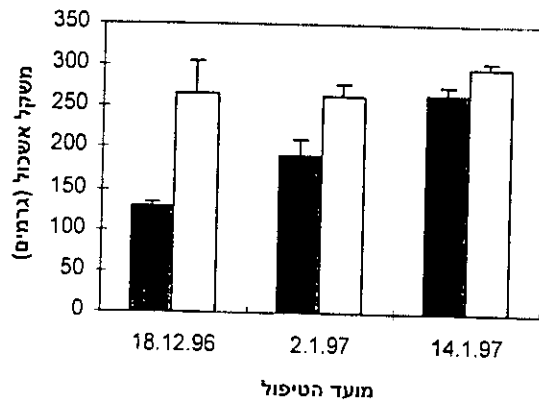
איור 5



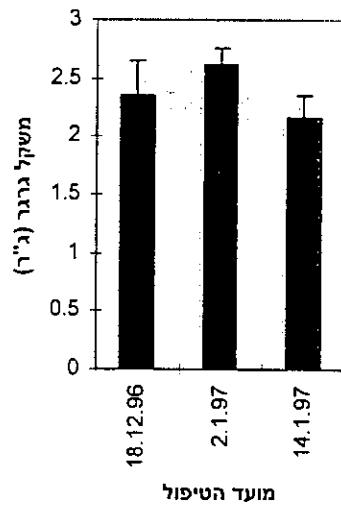
איור 6



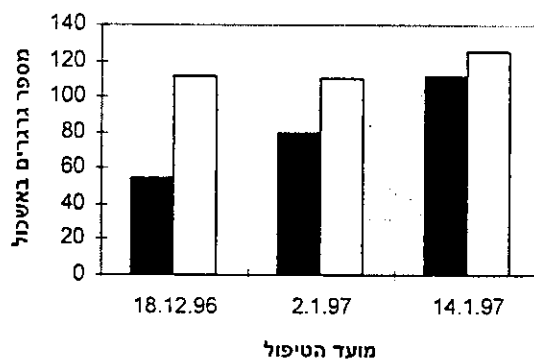
איור 7



איור 8

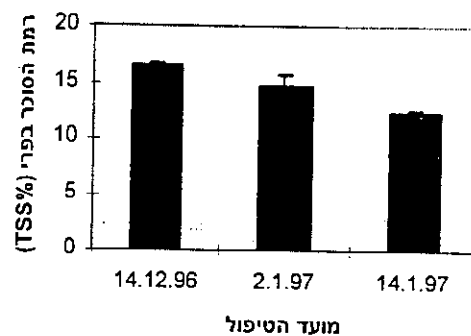
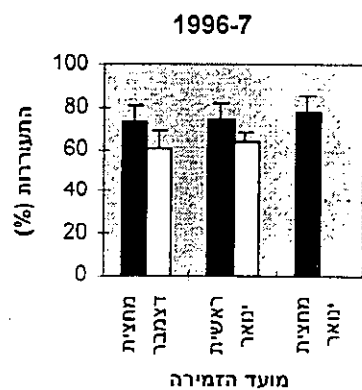
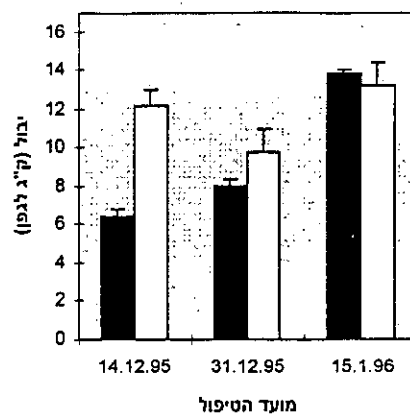
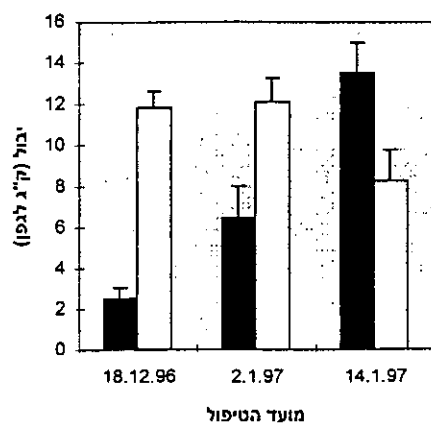


איור 9

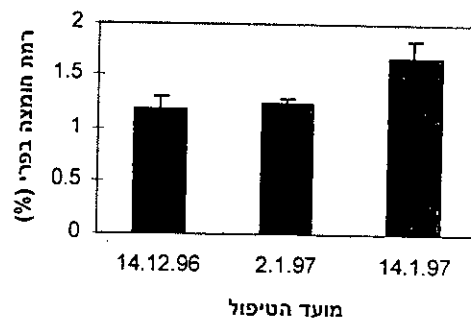
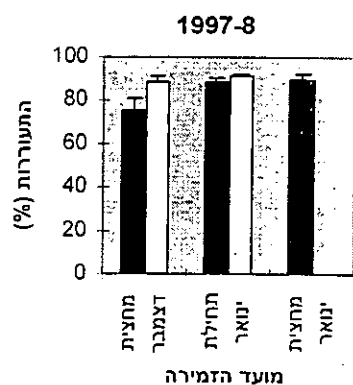


איור 10

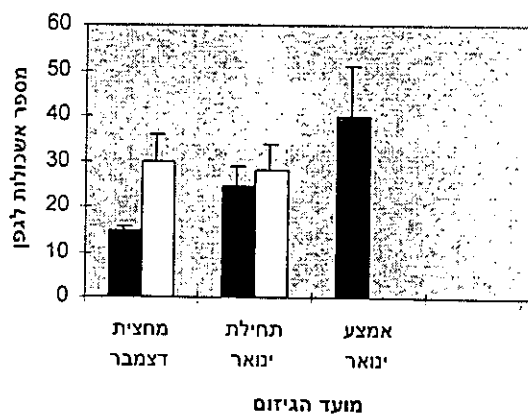
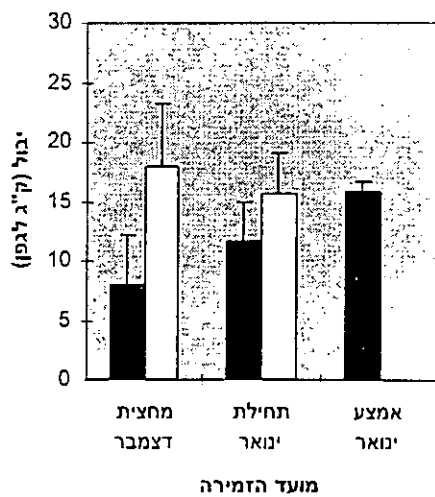
איור 11



איור 13



איור 12



איור 14

איור 15

מטרות המחקר לתקופת הדו"ח

איתור גנים בעלי ביטוי דיפרנציאלי בהשפעת טיפול בציאנמיד חומצי ובהשפעת מצב תרדמת הפקע ואפיונם. בחינת תגובת הגפן לטיפול בציאנמיד חומצי במספר מועדי טיפול על מנת למצוא חלון זמן אופטימלי לריסוס. על בסיס התוצאות המטרה העתידית הינה לבחון מתאם בין ביטוי גנים לבין תגובה אופטימלית של הצמח לטיפול בציאנמיד חומצי כדי לאפשר הגדרת העיתוי האופטימלי לריסוס בשוברי תרדמה.

עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח

1. שיבוט גנים בעלי התבטאות דיפרנציאלית במהלך התרדמה, כולל קינאז וגן בעל דמיון לאלכוהול דהידרוגנאז. 2. בחינת תגובת הגפן לטיפול בציאנמיד חומצי במספר מועדי טיפול על מנת למצוא חלון זמן אופטימלי בין דצמבר לינואר בבקעת הירדן הראתה כי ביישום מוקדם חלה פחיתה גדולה ביכול גם כאשר ההתעוררות תקינה. 3. בבדיקת ההשפעה של הפרדה בין זמירה לריסוס בציאנמיד חומצי לא נפגעה רמת ההתעוררות ושופרה רמת היבול בזן פרלט בבקעת הירדן.

המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו.

1. יישום מוקדם של ציאנמיד חומצי גורם לפגיעה משמעותית ביכול 'פרלטי' בבקעת הירדן גם כאשר רמת התעוררות הפקעים תקינה. 2. הפרדה בין מועד הזמירה למועד הריסוס באלוזדף של עד חודש בין דצמבר וינואר אינה פוגעת בהתעוררות ומשפרת את היכול. 3. במהלך התרדמה חלים שינויים רבים בביטוי גנים. שינוי שזוהה בביטוי קינאז בהשפעת ריסוס בציאנמיד חומצי עשוי להצביע על תפקיד רגולטורי בתהליך שבירת התרדמה.

הבעיות שנותרו לפתרון

איתור גנים נוספים בעלי ביטוי דיפרנציאלי. בחינת מתאם בין ביטוי גנים שאופיינו לבין תגובה אופטימלית של הצמח לטיפול בציאנמיד. לימוד הקשר בין התבטאות הקינאז למצב התרדמה. חיפוש סיגנלים אלטרנטיביים להתעוררות. אנליזה של השפעת הציאנמיד על התפתחות האשכול. אפיון ביטויים של גנים שנמצאו כבעלי ביטוי דיפרנציאלי.

האם הוחל בהפצת ידע

הרצאות: יום עיון לכורמים 96, יום עיון לכורמים- ינואר 97, יום עיון לחקלאי הערבה- נובמבר 98, יום עיון לחקלאי הבקעה- נובמבר 98. **מאמרים :** פרוט בעמוד 17 בדו"ח המלא.