



1999-2001

תקופת המחקר:

256-0530-01

קוד מחקר:

Subject: HYPERSENSITIVITY OF ASTER PLANTS TO
LIGHT SIGNAL FOR FLOWERING

Principal investigator: ISRAELA WALLERSTEIN

Cooperative investigator: LIBMAN DIANA, BORRIS
MECHNIK

Institute: Agricultural Research Organization (A.R.O.)

שם המחקר: הגברת הרגישות המורפוגנטית
של אסטר לאור

חוקר ראשי: ישראלה ולרשטיין

חוקרים שותפים: דיאנה ליבמן, בוריס מציניק

מוסד: מינהל המחקר החקלאי, ת.ד. 6 בית דגן
50250

תקציר

הצגת הבעיה: יתרונה היחסי של ישראל בכמות (שטף X זמן) האור בתקופת החורף קשור גם בהקדמת הפריחה של צמחי יום-ארוך שכוללים את מרבית פרחי הקטיפה המיוצרים בארץ בחורף. יתרון זה אינו מוחלט וגם בישראל תגובת הפריחה של צמחי יום-ארוך בחורף איטית, וכפופה למגבלות העוצמה והעלות של תוספת תאורה מלאכותית.

מטרת המחקר להגביר את קליטת פוטוני האור שמפעילים את תהליך הפריחה בצמחי יום-ארוך ע"י העשרת הצמח באחד משני הפיטוכרומים A או B, שניהם קולטני אור אדום ואדום-רחוק שמפעילים את מערכת התגובה ליום-ארוך. הצפי היה שהגברת קליטת הפוטונים משטף אור נמוך יחסית תיעל את מערכת התגובה ותקטין את תלותה בשטף האור. כדי לאפיין את כלליות האפשרות להשתמש בתוצאות מחקר זה גם בצמחים אחרים נבחנו גם השפעת ההעשרה על מסלולים מרכזיים המבקרים את השפעת היום הארוך על הפריחה.

מהלך ושיטות העבודה: פותחה שיטה להחדרת פיטוכרום A משיבולת שועל ופיטוכרום B מארבידופסיס לאסטר. ביטוי הגן המוחדר ביצירת mRNA נבחנה ב RT PCR. אורך היום הקריטי והתגובה למשך שבירת הלילה נבחנו בתנאי פיטוטרון. התגובה למשטרי הארה בהארכת יום או בשבירת לילה כולל התלות של מהירות התגובה בכמות אור השמש נבחנו בתנאי חממה. ההשפעה של הטרנספורמציה על היבול ועל תלותו בתאורה מלאכותית נבחנו בתנאים מסחריים.

תוצאות עיקריות העשרה בכל אחד משני הפיטוכרומים הקטינה מאד את התלות בכמות אור השמש והגדילה מאד את יבול הענפים הפורחים. העשרה בפיטוכרום A קיצרה את אורך היום הקריטי (מ-14 ל-8 שעות) וביטלה את הצורך בהארכת יום תוך שמירה על היתרון בתוספת יבול. העשרה בפיטוכרום B הגבירה מאד את הרגישות לשבירת לילה (משך זמן הארה קוצר משעתיים ל-15 דקות) וע"י כך הקטינה את הצורך בתוספת תאורה תוך שמירה על היתרון ביבול. הממצאים מצביעים על אפשרות שהעשרה בפיטוכרום B הגבירה את מעבר האור לשעון הביולוגי.

מסקנות והמלצות: תוצאות המחקר משמשות בסיס למהלך רישום פטנט ומסחרו. כלליות ההשפעה של הפטנט על צמחים אחרים, כולם צמחי יום ארוך הנבדלים זה מזה בשלב הפריחה המותנה ביום-ארוך נמצא עכשיו בשלבי למידה.

דוח לתוכנית מספר 256-0530-01

הגברת הרגישות המורפוגנטית של אסטר לאור

Hypersensitivity of Aster plants to light signal to flowering

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

ישראלה ולרשטיין, ליבמן דיאנה ומצ'ניק בוריס, מחלקה לפרחים וצמחי נוי, מכון ולקני בית דגן ת.ד. 6 מיקוד:

E-mail: vhwaisra @ agri.gov.il 50250

האם הנך מאשר את ציון הפסקה הבאה בדף הפתיחה לדו"ח: כן

הממצאים בדו"ח הנם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים

חתימת החוקר: יעל וואיסר

תקציר

הצגת הבעיה: יתרונה היחסי של ישראל בכמות (שטף X זמן) האור בתקופת החורף קשור גם בהקדמת הפריחה של צמחי יום-ארוך שכוללים את מרבית פרחי הקטיפה המיוצרים בארץ בחורף. יתרון זה אינו מוחלט וגם בישראל תגובת הפריחה של צמחי יום-ארוך בחורף איטית, וכפופה למגבלות העוצמה והעלות של תוספת תאורה מלאכותית. מטרת המחקר הנוכחי הייתה להגביר את קליטת פוטוני האור שמפעילים את תהליך הפריחה בצמחי יום-ארוך ע"י העשרת הצמח באחד משני הפיטוכרומים A או B, שניהם קולטני אור אדום ואדום-רחוק שמפעילים את מערכת התגובה ליום-ארוך. הצפי היה שהגברת קליטת הפוטונים משטף אור נמוך יחסית תיעל את מערכת התגובה ותקטין את תלותה בשטף האור. כדי לאפיין את כלליות האפשרות להשתמש בתוצאות מחקר זה גם בצמחים אחרים נבחנו גם השפעת ההעשרה על מסלולים מרכזיים המבקרים את השפעת היום הארוך על הפריחה. מהלך ושיטות העבודה: פותחה שיטה להחדרת פיטוכרומ A משיבולת שועל ופיטוכרומ B מארכידופסיס לאסטר. ביטוי הגן המוחדר ביצירת mRNA נבחנו ב RT_PCR. אורך היום הקריטי והתגובה למשך שבירת הלילה נבחנו בתנאי פיטוטרון. התגובה למשטרי הארה בהארכת יום או בשבירת לילה כולל התלות של מהירות התגובה בכמות אור השמש נבחנו בתנאי חממה. ההשפעה של הטרונספורמציה על היכול ועל תלותו בתאורה מלאכותית נבחנו בתנאים מסחריים.

תוצאות עיקריות העשרה בכל אחד משני הפיטוכרומים הקטינה מאוד את התלות בכמות אור השמש והגדילה מאוד את יכול הענפים הפורחים. העשרה בפיטוכרומ A קיצרה את אורך היום הקריטי (מ-14 ל-8 שעות) וביטלה את הצורך בהארכת יום תוך שמירה על היתרון בתוספת יכול. העשרה בפיטוכרומ B הגבירה מאוד את הרגישות לשבירת לילה (משך זמן הארה קוצר משעתיים ל-15 דקות) וע"י כך הקטינה את הצורך בתוספת תאורה תוך שמירה על היתרון ביכול. הממצאים מצביעים על אפשרות שהעשרה בפיטוכרומ B הגבירה את מעבר האור לשעון הביולוגי.

מסקנות והמלצות: תוצאות המחקר משמשות בסיס למהלך רישום פטנט ומסחורו, מהלך שמכון ולקני מיישם. כלליות ההשפעה של הפטנט על צמחים אחרים, כולם צמחי יום ארוך הנבדלים זה מזה בשלב הפריחה המותנה ביום-ארוך נמצא עכשיו בשלבי למידה בתוכנית נוספת שממומנת מקרן המדען של משרד החקלאות.

פרסומים מדעיים:

תוצאות המחקר נשלחו לפרסום ב Plant Science והן משמשות בסיס לפטנט שנימצא בשלב ה-PCT והמסחור.

ב. מברא, כולל רקע מדעי קצר ומטרות המחקר

יצוא פרחי הקטיף מישראל מתקיים בעיקרו בתקופה שבין סתיו לאביב ומתבסס על יתרונה היחסי של ישראל לעומת אירופה בתנאי הגידול הטבעיים בתקופה זו. הבסיס העיקרי ליתרון זה הוא בקרינת השמש. יחסית לאירופה בתקופה זו בישראל הימים ארוכים וקרינת השמש גבוהה. יתרונות קרינת השמש מתבטאים הן בתחום הפוטוסינתטי והן בתחום המורפולוגי. היתרון בתחום המורפולוגי מתבטא בתגובת הפריחה של צמחי יום-ארוך. צמחים אלה הם בעיקרם פרחי קיץ שפריחתם מכוונת לחורף בעזרת משטרי הארה מלאכותית שיוצרים תנאי יום-ארוך בחורף. אחד ממרכיבי השוני בין התנאים המלאכותיים בחורף לתנאים הטבעיים בקיץ הוא בכמות (שטף X זמן) האור. גם בישראל הכמות בחורף נמוכה בהרבה מזו של הקיץ מפני שהימים הטבעיים קצרים יותר, קרינת השמש נמוכה והאור המלאכותי ניתן בעוצמה נמוכה מאד, עובדה שגורמת לאיטיות בתגובת הפריחה, פחות מחזורי קטיף ולכן יכול נמוך יחסית. לכן נלוות הוצאות קבועות ושוטפות הכרוכות בהספקת התאורה המלאכותית. לכן יש עניין רב להקטין או לבטל את הצורך של גידולים אלה ביום ארוך ובשטף אור גבוה לצורך פריחה. זו הייתה מטרתו העיקרית של המחקר הנוכחי.

במחקר הנוכחי השתמשנו באסטר כצמח מודל ללימוד ההשפעה של העשרה בפיטוכרום A או B על התגובה הפוטופיריודית ליום-ארוך. *Aster (Asteracea)* הוא צמח עשבוני רב שנתי. מחזור הגידול שלו מתחיל בתנאי יום קצר בהם הוא מפתח שושנת עלים, בתנאי יום-ארוך מתפתח ענף הפריחה ומציעת הפרח המורכב אבל התפתחות הפרחים מעוכבת. אחרי התפתחות ענף הפריחה והמצעית תנאי יום קצר מאפשרים התפתחות פרחים. מתוך שני השלבים של תהליך הפריחה, התפתחות ענף התפרחת והתפתחות הפרחים, התמקד המחקר שלנו בשלב המותנה בתנאי יום-ארוך, כלומר בשלב התפתחות ענף הפריחה. בשלב זה ביקשנו ללמוד האם העשרה בקולטני אור, שמעבירים את השפעת האור לשלבים שונים של תהליך הפריחה, תקטין את התלות של תהליך הפריחה בתנאי יום-ארוך הן מבחינת אורך היום והן מבחינת שטף הקרינה. על פי מודל בקרת הפריחה בארכידופסים, התוצאות של מחקר זה אמורות להיות ישימות גם למקרים בהם התפתחות הפרחים עצמם מותנית בתנאי יום-ארוך. צמחי יום-ארוך מגיבים למשך, שטף והרכב האור. תגובתם לתנאי יום-ארוך היא תהליך מורכב שכולל את הפעלת קולטני האור, השעון האנדוגני והגנים הקובעים את זמן הפריחה. האור פועל באמצעות הקולטנים הן על השעון והן ישירות על הגנים שקובעים את זמן הפריחה. לאור יש תפקיד איכותי וכמותי בהפעלת התהליך. בחלק האיכותי נכללים קביעת אורך היום הקריטי והשפעת שבירת לילה ליצירת תנאי יום-ארוך, ואילו בחלק הכמותי נכללת השפעת שטף האור על מהירות ועוצמת התגובה. בצמחי יום-ארוך עליה בשטף האור יכולה לקצר את אורך היום הקריטי ושבירת לילה צריכה להיות ארוכה יחסית כדי ליצור תנאי יום-ארוך. מספר קולטני אור מעורבים בקליטת האור ובהפעלת שרשרת התגובות שמובילה לפריחה של צמחי יום-ארוך. למעורבותם יש קשר לכל מרכיבי השפעת האור על הפריחה: המרכיב האיכותי והכמותי כמו גם ההשפעה הישירה או ההשפעה

באמצעות השעון. מחקר זה התמקד בתפקידם של פיטוכרום B ו-A קולטני האור האדום והאדום-רחוק, בתגובת אסטר ליום ארוך.

הפיטוכרומים זו קבוצה של קולטני אור אדום ואדום רחוק. מתוכם מעניינים אותנו פיטוכרום A ו-B שמעורבים בבקרת הפריחה. פיטוכרום B מופעל באור אדום ומעוכב באור אדום רחוק ואילו פיטוכרום A מופעל באור אדום ואדום רחוק אבל גם נהרס באור אדום ולכן פעולתו בולטת באור עשיר באדום רחוק. פעילות שני הפיטוכרומים יכולה להיות: חופפת, מתנגדת או ייחודית לפיטוכרום. כלומר בתנאי תאורה מוגדרים יכולים שני הפיטוכרומים להשפיע באופן דומה על תהליכים פוטומוורפוגנטיים, להשפיע באופן ייחודי לפיטוכרום או ששני הפיטוכרומים מבטלים אחד את השפעתו של השני. אופן הפעולה של כל אחד מהם, ובפרט של פיטוכרום A, עשוי להשתנות בהתאם לשטף האור ולרציפות תקופת האור. אור שניקלט ע"י אחד או שני הפיטוכרומים יכול להעביר לשעון האנדוגני אות לתחילת תקופת האור, כלומר לכוון את השעון האנדוגני כך שהשעון יתחיל לספור שעות אור כמו שהוא עושה עם הזריחה. פעולת השעון יוצרת ביטוי ריתמי של הגנים הקובעים את זמן הפריחה. המועד ביממה והגובה של שיא הביטוי שלהם מושפע הן מהריתמוס שמופעל ע"י השעון והן מאורך היום והוא שקובע את זמן הפריחה. כלומר זמן הפריחה נקבע ע"י האור בשני מסלולים: באמצעות השעון ובאמצעות היום הארוך. שני המסלולים מופעלים ע"י קליטת האור בפיטוכרום. כלומר הפיטוכרומים יכולים להשפיע על הגנים הקובעים את זמן הפריחה באחת או בשתי דרכים: לקבוע את זמן מחזוריות הביטוי שלהם באמצעות הכוונת השעון ו/או לקבוע את משך וגובה השיא בביטויים באמצעות העברת השפעת היום הארוך ישירות לגנים הקובעים את זמן הפריחה. מועד השיא, גובהו ומשכו קובעים את אורך היום הקריטי. מתן אור בהמשך ליום טבעי קצר משפיע על אורך היום ובאופן ישיר (שלא באמצעות השעון) על ביטוי הגנים ואילו שבירת לילה יכולה להיקלט בצמח כאור שניתן בהמשך ליום ולכן לפעול כמו הארכת יום, או שהיא נקלטת בשעון כאות לתחילת יום ופועלת על הפריחה באמצעות הכוונת השעון. לשתי דרכי הפעולה של האור: הישירה והעקיפה יכול להיות קשר שונה עם תנאי היום הטבעי, כשיום זה הוא קצר. אור שפועל באמצעות השעון מחליף את השפעת אור הבוקר ומשאיר את השפעת סוף היום הטבעי ואילו אור שפועל באופן ישיר משאיר את השפעת אור הבוקר ומחליף את השפעת סוף היום הטבעי. צמחי יום-ארוך מגיבים להרכב ולשטף האור במחצית השניה של היום באופן שאור עשיר באדום-רחוק ושטף גבוה מזרזים את תגובת הפריחה. לעומת זאת התגובה להעשרה באור אדום או אדום-רחוק בשבירת לילה משתנה בין צמחי יום-ארוך שונים, אבל גם בשבירת לילה יש חשיבות לשטף האור.

למרות החשיבות של שטף האור לתגובת הפריחה של צמחי יום-ארוך, חשיבות שבאה לידי ביטוי בסדרי גודל של שטף קרינת השמש, הניסויים בהם נבחנה מעורבות הפיטוכרומים בבקרת הפריחה של צמחי יום-ארוך הן באמצעות השעון והן באופן ישיר גלמדה רק בתנאי אור מלאכותי ששונה מקרינת השמש הן בהרכבו והן בעוצמתו. השונות בעוצמה היא לפחות בסדר גודל אחד (100 לעומת 1000). בתנאי האור המלאכותי (תאי גידול) נמצאה השפעה חיובית של פיטוכרום A על פריחה רק בתנאי יום ארוך. צמחים חסרי פיטוכרום A אחרו לפרוח וצמחים מועשרים בפיטוכרום A הקדימו לפרוח. לא נמצאה השפעה של פיטוכרום A על פריחה בתנאי יום קצר. הממצאים בפיטוכרום B היו מבוססים על תגובת צמחים חסרי פיטוכרום. היות וצמחים אלה הקדימו לפרוח גם בתנאי יום-קצר וגם בתנאי יום ארוך המסקנה הייתה שפיטוכרום B מעכב פריחה ללא קשר לאורך יום. ממצאים אחרים מאפשרים הסקת מסקנה שונה על תפקיד פיטוכרום B בפריחה. ממצאים אלה הראו מחד שלפיטוכרום B יש

תפקיד חשוב בהכוונת השעון ומאידך שחוסר בגן ELF (גן פעיל במעבר אור מהקולטן לשעון) גורם גם הוא לפריחה מוקדמת הן ביום קצר והן ביום ארוך. צרוף שני הממצאים מצביע על האפשרות שהקדמת הפריחה של צמחים חסרי פיטוכרום B, ללא תלות באורך היום, נובעת מהפרעה במעבר אור לשעון ומכאן פיטוכרום B אינו בהכרח מעכב פריחה. הפיטוכרומים A ו-B פעילים בהרבה תהליכים פוטומוורפוגנטיים. בתהליכים אלה השפעתם גדולה עם הגדלת ביטויים בצמח. במילים אחרות: ביטוי יתר מגביר כמותית את השפעתם. לכן צפינו שהעשרה של אסטר בפיטוכרומים אלה תפעל על קליטת האור לתהליך הפריחה באופן כמותי כמו עליה בשטף אור. יחד עם זאת בצמחים טרנסגנים אליהם הוחדר גן ממקור זר מיקומו של הגן המוחדר, השונות בגן ובפרומטר שלו עשויים להשפיע על היחס הישר בין מידת הביטוי של הגן המוחדר ועוצמת התגובה.

במהלך המחקר השתמשנו בקרינת השמש כמקור אור וביום טבעי קצר כבסיס להשפעת טיפולי אור מלאכותי הן בהארכת-יום והן בשבירת לילה. בכך התקרבונו לשלב יישום התוצאות בשטחים מסחריים ויצרנו לצמחים משטר אור, הן מבחינת ספקטרום והן מבחינת שטף שיאפשר ביטוי הפיטוכרום במערכת דומה לזו שבה הוא פועל באופן טבעי. במערכת זו בחנו את ההשפעה של העשרה בפיטוכרום A או B על התגובה של התפתחות ענף הפריחה באסטר לאורך יום טבעי קצר, הארכת-יום, שבירת לילה ושינויים כמותיים בשטף קרינת השמש. את הממצאים יחסנו לפיטוכרום מסוים ולמסלול השפעה אפשרי. כדי להתקרב לשלב היישום נבחנו הצמחים הטרנסגנים גם בתנאים חצי מסחריים.

פירוט הניסויים והתוצאות

הטרנספורמציה

השתמשנו בגן לפיטוכרום A שנלקח משיבולת שועל ובגן לפיטוכרום B שנלקח מארבידופסיס. שני הגנים הוחדרו לצמח בעזרת אגרובקטריום. הפרומטר של שני הגנים היה 35S. היות ופרומטר זה אינו טבעי לצמחים הנחנו שיהיה קשה ליחס הבדלים בפריחה בין קווים שונים לרמת הביטוי של הגן בצמח והסתפקנו בהוכחת קיומו של הגן המוחדר בצמח (PCR) ובהוכחה שהוא מיצר mRNA (RT-PCR). התוצאות מודגמות בתמונה 2.

השפעת הטרנספורמציה על אורך היום הקריטי

כדי לבחון מהו אורך היום הקריטי הנדרש ליצירת ענף תפוחת ומה חשיבות טיב האור בסוף היום לקביעת אורך היום הקריטי גידלנו את צמחי האסטר בפיטוטרון בעגלות שאפשרו לנו לחשוף את הצמחים לאור השמש לפרקי זמן רצויים ולהחשיך בשאר שעות היממה. בזמן ההחשכה יכולנו להוסיף אור מלאכותי כהמשך לזמן החשיפה לשמש (הארכת יום) או כשבירת לילה. להארכת יום השתמשנו באור מלאכותי, $20 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR, שהכיל אדום ואדום רחוק ביחס דומה לזה המצוי באור השמש אבל בעוצמה נמוכה פי 20 מזו של אור השמש. בתנאים אלה חשפנו צמחי סן-קרלו מועשרים בפיטוכרום A או B וצמחים בלתי מועשרים (צמחי ביקורת) ל-10 שעות אור שמש. תמונה 1 מראה שרק צמחים מועשרים בפיטוכרום A יצרו ענף פריחה ופרחים בתנאים אלה. מכאן העשרה פיטוכרום A קיצרה את אורך היום הקריטי בתהליך יצירת ענפי פריחה, שמונתה ביום-ארוך. כשחשפנו שני קווים מועשרים בפיטוכרום A ל-8 שעות אור שמש הקו AA7-4 יצר ענפי פריחה ופרח, כלומר בקו זה אורך היום הקריטי היה 8 שעות או פחות (טבלה 1). הארכת משך החשיפה לאור שמש ל-10 שעות זרזה את התהליך כפי שאפשר לראות מהירידה במספר עלי השושנת שנוצרו קודם ליצירת ענף הפריחה. הזירוז מצביע

על כך שלמרות קיצור אורך היום הקריטי הקו AA7-4 שמר על רגישות לתנאי יום ארוך. העובדה שהעשרה בפיטוכרום A הקטינה אבל לא ביטלה את הרגישות לשטף האור מודגמת במספר הקטן יותר של עלי שושנת שיצר הקו AA17-3 כששמונה שעות החשיפה לשמש הוארכו ל-10 בעזרת אור שמש לעומת אור מלאכותי. המסקנה שלנו היא שהעשרה בפיטוכרום A קיצרה את אורך היום הקריטי כך שהצמח "קרא" את תנאי היום הקצר כאילו הם תנאי יום ארוך. מעניין לציין שקיצור אורך היום הקריטי לא השפיע על תהליך יצירת הפרחים שהוא תהליך המושרה ביום קצר.

השפעת הטרוספורמציה על התגובה לשבירת לילה

באותן עגלות בפיטוטרון חשפנו את הצמחים ל-8 שעות אור שמש ושברנו את הלילה למשך 15 או 30 דקות בעזרת אור פלורוסנט, $2.4 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR, שמכיל אדום ואינו מכיל אדום רחוק, או אור להט $1.4 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR, שמכיל אדום ועשיר באדום רחוק. שני סוגי האור ניתנו בעוצמה נמוכה יחסית. התוצאות מוצגות בטבלאות 2-3. שבירת לילה קצרה (15 או 30 דקות) לא אפשרה יצירת ענף פריחה בצמחי סן-קרלו. אבל בצמחים מועשרים בפיטוכרום B (שאורך היום הקריטי שלהם ארוך מ-10 שעות) 15 דקות שבירת לילה באור להט או פלורוסנט אפשרה יצירת ענף תפוחית. השונוות במספר עלי השושנת בין צמחים שגדלו בתנאי שבירת לילה של 15 ו-30 מצביעה על כך שההעשרה בפיטוכרום B חיזקה את השפעת שבירת הלילה אבל לא ביטלה את אופייה הכמותי. מבין הקווים המועשרים בפיטוכרום A הקו AA4-7 פרח כבר בהשפעת אורך יום של 8 שעות והקו AA17-3 לא הגיב לשבירת הלילה שניתנה באור פלורוסנט חסר אדום רחוק והגיב לאור הלהט רק בשבירת לילה של 30 דקות. התגובה לאור אדום רחוק אופיינית לפיטוכרום A והתגובה החלשה יחסית יכולה להיות קשורה בהעשרה נמוכה יחסית של הקו AA17-3 או בצורך במשך אור מינימלי לתגובה של פיטוכרום A במסגרת ההשפעה האופיינית לשבירת לילה.

חשיבות תנאי היום הטבעי וההעשרה בפיטוכרום לתגובה לטיפול הארכת-יום.

כדי להעריך את חשיבות אור השמש להשפעת היום הארוך השתמשנו בימים טבעיים שונים באורכם ובשטף קרינת השמש אבל דומים בכך שכולם היו קצרים מכדי להשרות התפתחות ענף פריחה באסטר. את הימים הטבעיים השלמנו למספר קבוע של שעות אור בעזרת תאורה מלאכותית. עשינו שימוש בשני מחזורי ניסוי: האחד תחילתו בסתיו והשני תחילתו בחורף. השווינו בין פרק הזמן שנידרש ל-90% מענפי התפוחית להגיע לאורך של 55 ס"מ בכל אחד מהמחזורים. המחזור הסתווי התקיים ביום טבעי ארוך יחסית לחורפי ובקרינת שמש גבוהה יותר ולכן התגובה לתנאי הארכת היום הייתה צפויה להיות מהירה יותר. לאחר התארכות ענף התפוחית הועברו הצמחים ליום טבעי קצר לפריחה. השווינו גם בין משך כל מחזור הגידול של צמחים אלה לבין משך מחזור גידול שהתקיים כולו בתנאים של אורך יום מבוקר ל-10 שעות. האור סופק מנורות להט או פלורוסנט 41 בעוצמה נמוכה של $0.5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ PAR. התוצאות באיור 1 מראות שביום מבוקר ל-10 שעות הגיעו לפריחה רק צמחים מועשרים בפיטוכרום A. ההבדל בין משך מחזורי הגידול שלהם נובע מקרינת שמש חזקה יותר במחזור הגידול הראשון. הבדל זה קטן במרבית הקווים מההבדל במשך המחזור של הזן סן-קרלו בתנאי יום מוארך ל-16 שעות. מכאן, צמחים מועשרים בפיטוכרום A אינם זקוקים לתוספת תאורה מלאכותית בחורף כדי לפתח ענף פריחה ולפרוח, גם השפעת שטף קרינת השמש על פריחתם קטנה יחסית. איור 2 מתייחס רק לשלב התפתחות ענף

הפריחה ומראה שכשהארכת היום ניתנת מנורות להט בשטף נמוך הזן סן-קרלו זקוק ל- 16 שעות אור לשם תגובה והוא רגיש מאד לתנאי היום הטבעי בעוד שצמחים מועשרים בפיטוכרום B מגיבים כבר ל- 14 שעות אור ורגישותם לתנאי היום הטבעי יורדת מאד כשהיום מוארך ל- 16 שעות אור. לכן אפשר לסכם שבמשטר הארכת יום העשרה בפיטוכרום B מגבירה את קליטת האור לצורך התפתחות ענף תפוחית וע"י כך מקצרת את אורך היום הקריטי באותו תחום בו הוא מושפע מספקטרום ושטף האור. תמונה דומה מתקבלת גם מתגובת הצמחים להארכת יום באור פלורוסנט (איור 3) אלא שבמקרה זה גם הזן סן-קרלו מגיב ל- 14 שעות אור. השונות בתגובת סן קרלו להארכת יום בלהט לעומת פלורוסנט מלמדת על פעילות טבעית של פיטוכרום B בצמח זה.

ייחודיות השפעת שבירת לילה ותלותה בתנאי היום הטבעי

בתנאי החממה, היום הטבעי, והאור המלאכותי המתוארים בסעיף קודם ספקנו את התאורה המלאכותית כשבירת לילה למשך שעתיים בין השעות 23 ו- 24. בלילה. איור 4 מראה שכשמקור האור היה מנורות להט צמחי סן קרלו היו רגישים מאד לתנאי היום הטבעי: התפתחות ענף התפרחת זורזה מאד בסתיו והייתה איטית בתורף. מצב דומה ראינו בצמחים אלה גם בתנאים של הארכת יום. אם נניח ששבירת הלילה פעלה כהארכת יום ונספור שעות מהזריחה ועד סוף שבירת הלילה נקבל אורך יום של כ- 17 שעות שסופו באור הלהט. בתנאים אלה ההבדל בין שני מחזורי הגידול של הצמחים הטרנסגנים היה קטן בהרבה מזה של צמחי הביקורת, עדות נוספת לתפקיד ההעשרה בפיטוכרום בביטול התלות בתנאי היום הטבעי אם ע"י קיצור אורך היום הקריטי, אם ע"י ייעול קליטת האור ואם ע"י קליטת שבירת הלילה באור להט במסלול שונה מצמחי הביקורת. כשהאור בשבירת הלילה סופק מנורות פלורוסנט משך שני מחזורי הגידול של "סן-קרלו" היה דומה, כלומר התלות בתנאי היום הטבעי כמעט נעלמה. בהשוואה לאור להט המחזור הראשון היה איטי יותר והשני מהיר יותר. חוסר התלות בתנאי היום הטבעי מלמד על מנגנון שבו תנאי הפוטופריודה דומים בשני מחזורי הגידול. תנאים כאלה יכולים להיווצר אם שבירת הלילה הייתה התחלת יום וספירת שעות הפוטופריודה נמשכה באופן רצוף עד סוף היום הטבעי. בנתונים אלה הצמח ראה יום-ארוך שבסופו הוא נחשף לאור שמש שהוא היעיל ביותר בהשראת פריחה הן מבחינת הספקטרום והן מבחינת השטף.

השפעת העשרה בפיטוכרום על יכול ענפי פריחה בתנאי גידול מסחריים

בחממה בחוות הבשור נשתלו צמחי אסטר "סן-קרלו" וצמחים עם ביטוי יתר של פיטוכרום A או B בתנאי גידול מקובלים אצל מגדלי ישראל. השתילה הייתה ב- 15 לאוגוסט, שלושה שבועות מאוחר יותר הצמחים נקטמו והחל טיפול היום הארוך. האור ניתן מנורות להט בשטף זהה למקובל בתנאים מסחריים. הטיפול המסחרי היה הארכת היום הטבעי ל- 16 שעות אור, טיפולים נוספים היו הארכת היום ל- 14 שעות אור או גידול הצמחים ללא תוספת תאורה מלאכותית. בטיפולים שקיבלו תוספת תאורה מלאכותית הופסקה התאורה כשענפי התפרחת הגיעו לאורך 40 ס"מ כדי לאפשר התפתחות פרחים. הניסוי הסתיים עם סיום גל הפריחה השלישי, במאי. התוצאות מובאות בטבלה 4.

הקווים AA2-8 ו- AA4-7 שמועשרים בפיטוכרום A נתנו שלושה מחזורי קטיף ללא תוספת תאורה מלאכותית עם יכול שעלה על זה של הביקורת ב- 52% ו- 25%, בהתאמה. איכות הענפים הייתה דומה לזו של הביקורת. מעניין לשים לב לתוספת הגדולה של ענפי קטיף בגל השני של צמחים אלה, שכן גל זה התפתח במרכז החורף. במשטר של הארכת יום ל- 14 שעות הקו AA2-8 והקו AB3-1 המועשר בפיטוכרום B נתנו תוספת

יכול של 115% ו-94%, בהתאמה. גם במקרה זה איכות הענפים הייתה דומה לזו של ענפי הביקורת. תגובתו של הקו AA2-8 לתוספת שעות אור מראה שלמרות שינוי התגובה ליום טבעי-קצר העשרה בפיטוֹכרום A לא ביטלה את האפשרות של הצמחים להגיב כמותית להארכת יום.

מסקנות והשלכתיהן (דיון)

התגובה של אסטר להעשרה בפיטוֹכרום צריכה להבחן בהקשר ישיר לאסטר, לשלב בתהליך הפריחה שהושפע מההעשרה ולמנגנון שבאמצעותו שינתה ההעשרה את תגובת הפריחה של האסטר. בחינה כזו יכולה להוביל להסתכלות כללית על חשיבות ההעשרה של צמחי יום ארוך בפיטוֹכרום מעבר להשלכה הישירה על אסטר. אסטר הוא צמח שתהליך הפריחה שלו מבוקר באופן הדוק ע"י אורך יום כך שהתפתחות ענף התפרחת תחול באביב מאוחר וקִיץ, מצעית הפרח תפתח בסוף תקופה זו והפריחה תחול בסתיו. ההעשרה בפיטוֹכרום השפיעה על התהליכים המבוקרים ע"י יום ארוך וקשורים בעיקרם להתפתחות ענף התפרחת. תהליך יצירת הפרחים שמבוקר ע"י יום קצר לא הושפע, עובדה המצביעה על מנגנוני בקרה שונים לתהליכים המבוקרים ע"י יום ארוך ולאלה שמבוקרים ע"י יום קצר. האפשרות להשליך מתוצאות ממחקר זה לצמחים אחרים כפופה לדמיון בהשפעת היום הארוך על התפתחות ענף תפרחת בין הצמחים המושווים, כלומר לאפשרות להפריד בין השפעת היום הארוך על התפתחות ענף התפרחת לבין השפעתו על התפתחות הפרחים, או לחילופין להנחה, המבוססת על מחקרים בארבידופסיס, שקיימת בקרה דומה או משולבת של היום הארוך על התפתחות ענף הפריחה והפרחים. יחד עם זה, במקרים בהם רק התפתחות הפרח מבוקרת ע"י יום ארוך, ההשפעה של ההעשרה בפיטוֹכרום על התלות של התהליך ביום ארוך דורשת הוכחה נוספת.

כצפוי, העשרה בקולטני האור: פיטוֹכרום A ו-B הגבירה את קליטת פוטוני האור והקטינה את התלות של התפתחות ענף התפרחת בשטף האור הטבעי. למעשה עוצמת ההשפעה אפשרה לנו לעקוב אחר המנגנון באמצעותו היא באה לידי ביטוי. הקטנת התלות בשטף האור יכולה לנבוע משינוי אורך היום הקריטי שכן ככל שאורך היום ארוך יותר מהאורך הקריטי פוחתת התלות של עוצמת התגובה בשטף האור אבל הקטנת התלות בשטף האור יכולה לנבוע גם מייעול, במונחים של שטף אור, של העברת האור לשעון לצורך מתן אות של התחלת יום. בגבולות אורך היום הקריטי שינוי בשטף האור (או הגברת קליטת האור) יכולים לקצר את אורך היום הקריטי בסדר גודל דומה לזה שנגרם ע"י העשרה בפיטוֹכרום B (לא יותר משעתיים). ההשפעה של פיטוֹכרום A על אורך היום הקריטי (בסדר גודל של 6 שעות) יכולה להיות מוסברת ע"י שינוי מהותי במנגנון מדידת הזמן. שינוי כזה יכול להיגרם ע"י שינוי בריתמוס הביטוי של הגנים שקובעים את זמן הפריחה. בתנאי הניסויים שלנו אורך היום הקצר ביותר (8 שעות) אפשר התפתחות ענף תפרחת באסטר מועשר בפיטוֹכרום A ולכן לא ניתן היה לאבחן באותם צמחים רגישות לשבירת לילה קצרה ולא ניתן לאפיין את השפעת פיטוֹכרום A על מעבר האות לתחילת יום לשעון. ההנחה שההעשרה בפיטוֹכרום A תקטין את התלות בשטף קרינת השמש נתאמתה וניתן למצוא לה סימוכין גם אם משווים בין הביטוי הכמותי של הגן המוחדר ב mRNA לבין עוצמת התגובה של הקווים השונים לתנאי אורך יום ולשטף האור.

את השפעת שבירת הלילה על התפתחות ענף הפריחה ניסינו ליחס לאחד משני מנגנוני השפעת האור: השפעה אחרי השעון, על גובה ומשך שיא הביטוי של הגנים שקובעים את זמן הפריחה, בדומה להשפעה של

הארכת יום או השפעה באמצעות השעון שבה האור פועל כאות לתחילת היום וספירת משך תקופת האור נמשכת ברצף עד סוף היום הטבעי. כדי להבחין בין שתי צורות ההשפעה האפשריות השתמשנו בתגובה לשטף האור במחצית השניה של היום הארוך, תגובה אופיינית לצמחי יום ארוך. כמות האור במחצית השניה של היום תהייה קטנה יותר אם האור המלאכותי יפעל כהארכת יום וגדולה יותר אם הוא פועל כאות לתחילת יום. כשכמות האור במחצית השניה של היום נמוכה כל שינוי בכמות אור השמש בתקופה זו משפיע מאד על קצב התגובה. מכאן שבירת לילה שפועלת כאות לתחילת יום מקטינה את התלות של מהירות התגובה בתנאי אור השמש. בצמחים הלא מהונדסים של הזן סן קרלו שבירת לילה באור להט פעלה כהארכת יום ואילו שבירת לילה באור פלורוסנט פעלה כאות לתחילת יום. צמחים מועשרים בפיטוכרום B הראו רגישות גבוהה לשבירת לילה עם תגובה אופיינית לכיול השעון (הקטנת התלות בתנאי קרינת השמש), עובדה שתואמת את הממצאים המצביעים על תפקידו של פיטוכרום B בהעברת אור לשעון. כמו במקרה ההעשרה בפיטוכרום A גם הביטוי ב mRNA של הגן המוחדר והמקודד לפיטוכרום B תואם את עוצמת הביטוי שלו בצמח.

הממצאים המצביעים על השפעת הפיטוכרומים על מנגנוני בקרת היום הארוך כמו אורך יום קריטי והכוונת השעון מחזקים את ההנחה שגם צמחים בהם השפעת היום הארוך על הפריחה מתמקדת ביצירת הפרחים יגיבו באופן דומה להעשרה בפיטוכרום.

באופן ישומי לאסטר העשרה בכל אחד מהפיטוכרומים הגדילה במידה מפתיעה את יכול הענפים הפורחים. העשרה בפיטוכרום A ביטלה את הצורך בתוספת תאורה מלאכותית והעשרה בפיטוכרום B הקטינה מאד את משך השימוש בהארה מלאכותית.

פרסומים מדעיים:

תוצאות המחקר נשלחו לפרסום ב Plant Science והן משמשות בסיס לפטנט שנימצא בשלב ה-PCT.

והמסחור.

טבלה 1

השפעת אורך יום ושטף קרינת אור על התפתחות ענף פריחה באסטר מהזן "סן-קרלו" מועשר בפיטוכרום A. צמחים בפיטוטרון נחשפו לשמונה שעות קרינת שמש מארכות לעשר שעות אור בעזרת אור מלאכותי או אור שמש.

הקו הנבדק	מקור אור להארכת-יום	זמן לפריחה ימים	מספר עלי שושנת בזמן פריחה	אורך ענף תפוחת ס"מ
AA4-7	אין	72 ± 0.8	6.8 ± 0.5	60.7 ± 1.0
AA4-7	מלאכותי	76 ± 2.0	5.2 ± 0.4	70.1 ± 1.8
AA4-7	שמש	77 ± 0.4	4.8 ± 0.4	94.0 ± 1.6
AA17-3	אין	לא פרח	12.2 ± 1.0	אין
AA17-3	מלאכותי	88 ± 7	6.5 ± 0.7	59.2 ± 4.7
AA17-3	שמש	95 ± 4.5	3.8 ± 0.5	93.8 ± 4.5
סן-קרלו	אין	לא פרח	15.0 ± 1.2	אין
סן-קרלו	מלאכותי	לא פרח	14.8 ± 1.8	אין
סן-קרלו	שמש	לא פרח	15.7 ± 0.9	אין

טבלה 2

התפתחות ענף תפוחת ופרחים באסטר "סן-קרלו" מועשר בפיטוכרום A או B. צמחים בפיטוטרון נחשפו לשמונה שעות קרינת שמש ולשבירת לילה קצרה באור מגורת להט. AA מסמן צמחים מועשרים בפיטוכרום A, AB מסמן צמחים מועשרים בפיטוכרום B.

הקו הנבדק	משך שבירת הלילה דקות	זמן לפריחה ימים	מספר עלי שושנת בזמן פריחה	אורך ענף פורח ס"מ
AA4-7	15	76 ± 1.0	5.0 ± 0.4	66.5 ± 0.9
AA4-7	30	77 ± 1.5	3.8 ± 0.2	66.6 ± 3.5
AA17-3	15	לא פרח	10.7 ± 1.1	אין
AA17-3	30	98 ± 2.0	5.5 ± 0.6	50.8 ± 1.6
AB12-6	15	99 ± 4.6	8.6 ± 0.8	61.8 ± 2.6
AB12-6	30	99 ± 2.6	5.5 ± 0.6	78.2 ± 3.4
AB3-1	15	101 ± 1.0	4.8 ± 0.8	67.6 ± 6.9
AB3-1	30	100 ± 2.6	4.8 ± 0.2	72.8 ± 6.7
סן-קרלו	15	לא פרח	12.3 ± 0.9	אין
סן-קרלו	30	לא פרח	13.0 ± 2.1	אין

טבלה 3

התפתחות ענף תפוחית ופרחים באסטר "סן-קרלו" מועשר בפיטוכרום A או B. צמחים נחשפו לשמונה שעות קרינת שמש ולשבירת לילה קצרה באור מנורת פלורוסנט. AA מסמן צמחים מועשרים בפיטוכרום A, AB מסמן צמחים מועשרים בפיטוכרום B.

הקו הנבדק	משך שבירת הלילה דקות	זמן לפריחה ימים	מספר עלי בזמן פריחה	שושנת ס"מ	אורך ענף פורח
AA4-7	15	80 ± 1.3	6.4 ± 0.6	54.8 ± 1.2	
AA4-7	30	67 ± 1.6	4.7 ± 0.2	58.7 ± 1.3	
AA17-3	15	לא פרח	12.8 ± 0.4	אין	
AA17-3	30	לא פרח	13.9 ± 0.4	אין	
AB12-6	15	82 ± 2.6	6.5 ± 0.5	51.4 ± 1.7	
AB12-6	30	64 ± 1.6	4.9 ± 0.5	51.9 ± 2.6	
AB3-1	15	77 ± 1.7	7.4 ± 0.8	51.3 ± 2.6	
AB3-1	30	57 ± 2.1	6.0 ± 0.4	50.0 ± 3.0	
סן-קרלו	15	לא פרח	15.5 ± 0.7	אין	
סן-קרלו	30	לא פרח	16.8 ± 1.2	אין	

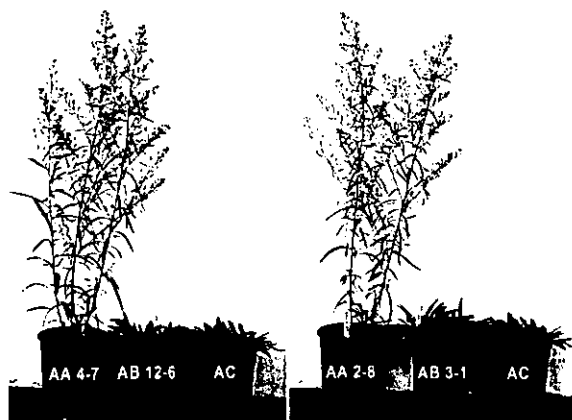
טבלה 4

יבול ואיכות ענפי קטיף של קווי אסטר מועשרים בפיטוכרומ A (AA), פיטוכרומ B (AB) או צמחי סן-קרלו לא מהונדסים. הצמחים גדלו בחממה בחוות הבשור וקיבלו טיפול מסחרי של הארכת יום ל 16 או 14 שעות אור, או גדלו ביום טבעי לא מוארך בין אוגוסט למאי. במהלך תקופה זו נקטפו שלושה גלים של ענפים פורחים.

הקו	אורך יום שעות	ענפי קטיף מספר \מ"ר			אורך ענף קטיף ס"מ			משקל ענף קטיף ג"ר		
		גל 1	גל 2	גל 3	גל 1	גל 2	גל 3	גל 1	גל 2	גל 3
סן קרלו	16	26	32	114	79	90	≥ 90	29	50	58
AA2-8	טבעי	33	64	164	75	89	≥ 90	32	71	50
AA2-8	14	28	92	251	77	90	≥ 90	36	81	67
AA4-7	טבעי	33	41	141	73	88	≥ 90	30	56	41
AB3-1	14	39	75	222	80	90	≥ 90	44	66	55
AB12-6	16	29	75	231	76	90	≥ 90	27	37	54

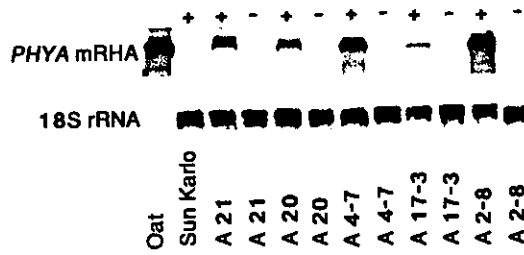
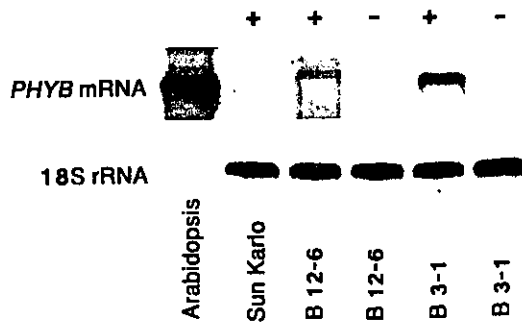
תמונה 1

צמחים אסטר מועשרים בפיטוכרומ A או B שגדלו בפיטוטרון באורך יום של עשר שעות חשיפה לאור שמש וטמפרטורה של $23/15^{\circ}\text{C}$, לילה/יום. בכל שלישיה: משמאל צמחים מועשרים בפיטוכרומ A שפתחו ענף פריחה ופרחו, במרכז צמחים מועשרים בפיטוכרומ B ומימין צמחים בלתי מועשרים של זן המקור (סן-קרלו). צמחי המקור והמועשרים בפיטוכרומ B נשארו במצב שושנת אופייני לתנאי יום-קצר.



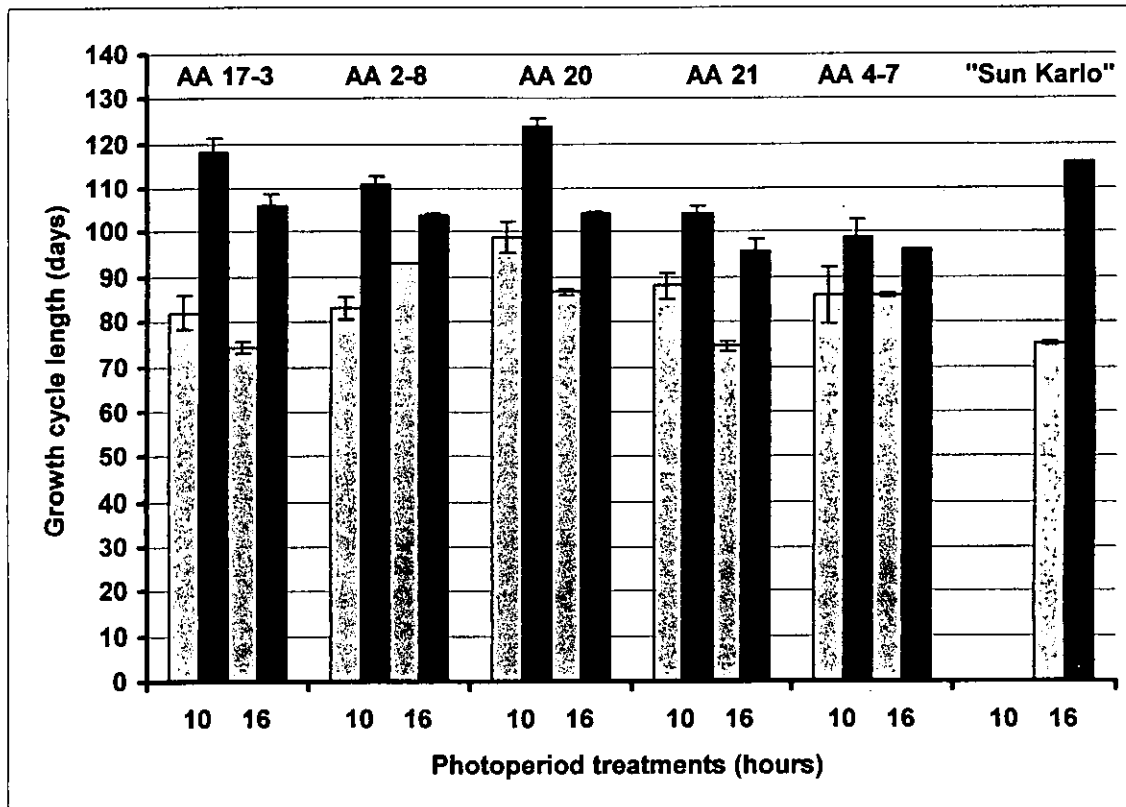
תמונה 2

mRNA של פיטוכרום A (*PHY A*) משיבולת שועל ושל פיטוכרום B (*PHY B*) מארבידופסיס כפי שנמדדו ב RT_PCR אחרי מיצוי כלל RNA מקווי אסטר מועשרים בפיטוכרום A או B. RNA ריבוזומלי שימש לקביעת הכמות הכללית של RNA בהפקה. + או - מציינים נוכחות או אי נוכחות של reverse transcriptase SuperScript II בזמן העתקת DNA על תבנית ה RNA.

A. *PHY A* mRNAB. *PHY B* mRNA

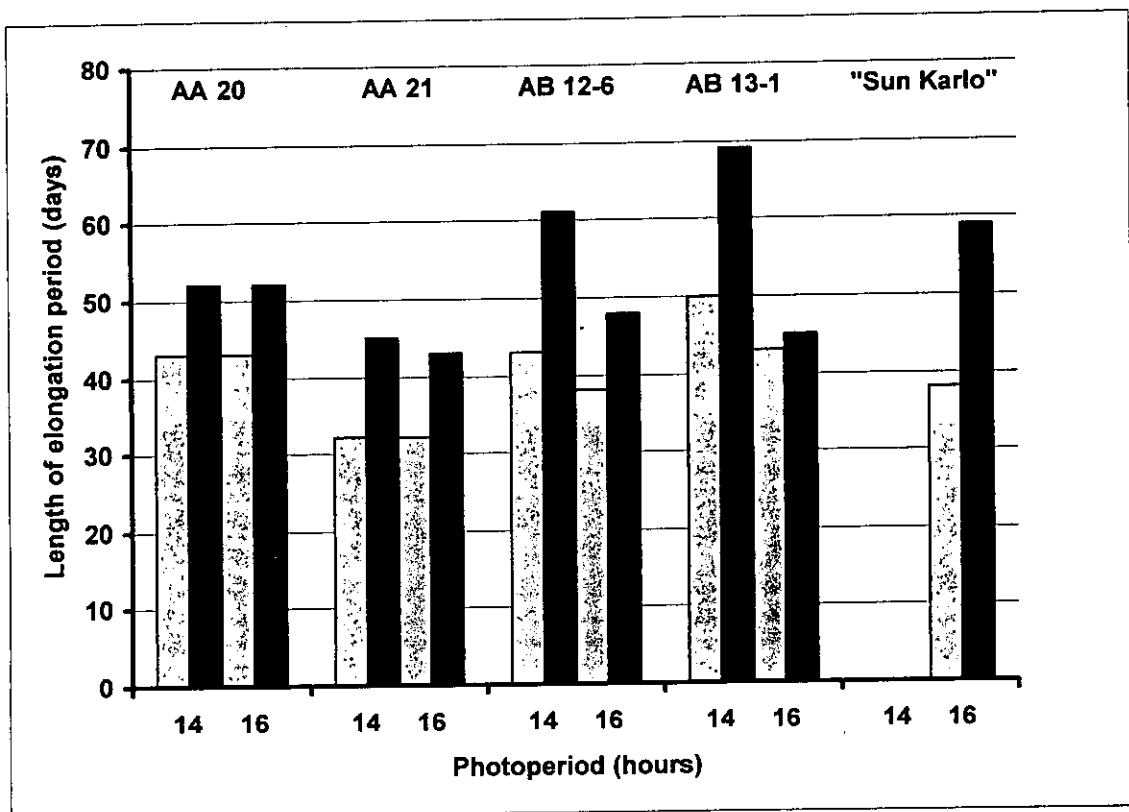
איור 1

השפעת תנאי היום הטבעי על משך מחזור הגידול של אסטר סן-קרלו מועשר בפיטוכרום A. בתקופת התפתחות ענף תפוחית הצמחים גדלו בתנאי אורך יום טבעי מוארכים ל- 14 או 16 שעות אור בעזרת אור מנורות להט והועברו לתנאי יום טבעי לפריחה, או שטופלו בתנאי אורך יום קבועים של 10 שעות חשיפה לאור שמש במשך כל מחזור הגידול. בכל אחד מהתנאים נערכו שני מחזורי גידול: סתיווי (עמודות אפורות) וחורפי (עמודות שחורות).



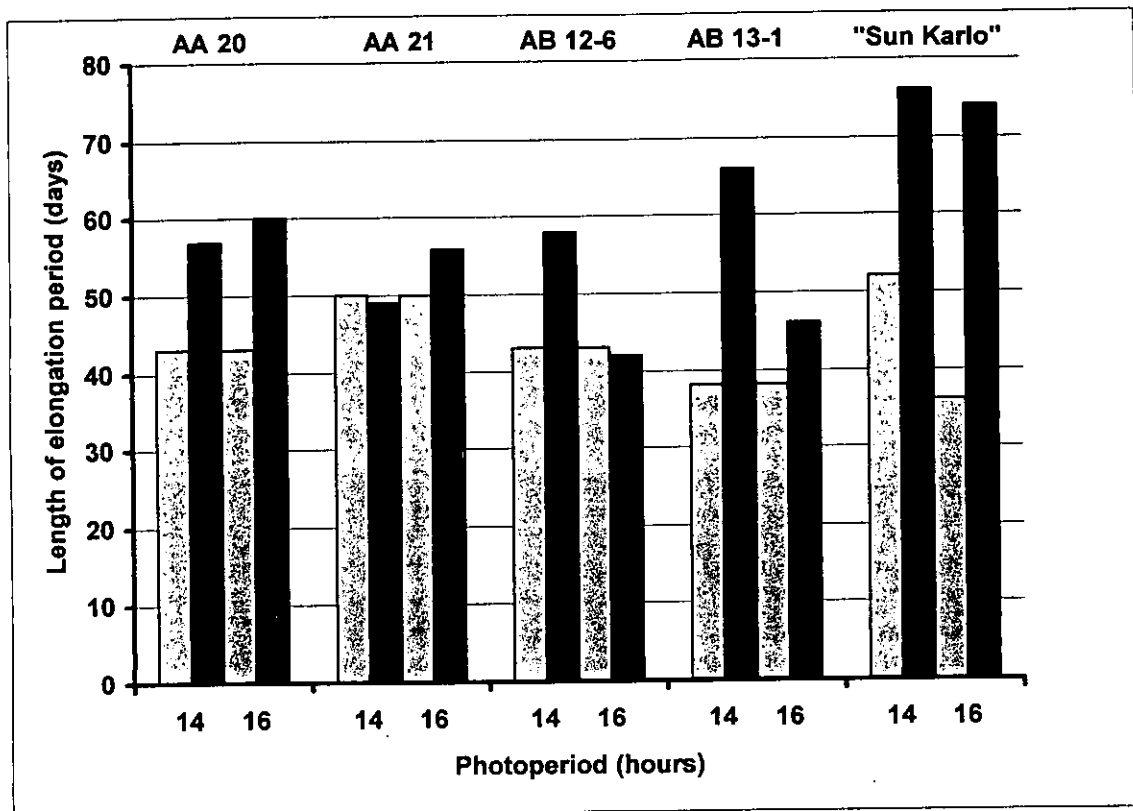
איור 2

השפעת אורך היום המלאכותי ותנאי היום הטבעי על הזמן הנדרש להתפתחות ענף תפוחית בצמחי אסטר "סן-קרלו" מועשרים בפיטוכרום A או B. הצמחים גדלו בחממה בשני מחזורי גידול, סתווי (עמודות אפורות) וחורפי (עמודות שחורות) בתנאים של יום טבעי מוארך ל- 14 או 16 שעות אור בעזרת אור מנורות להט. הקווים המסומנים ב-AA מועשרים בפיטוכרום A והקווים המסומנים ב-AB מועשרים בפיטוכרום B.



איור 3

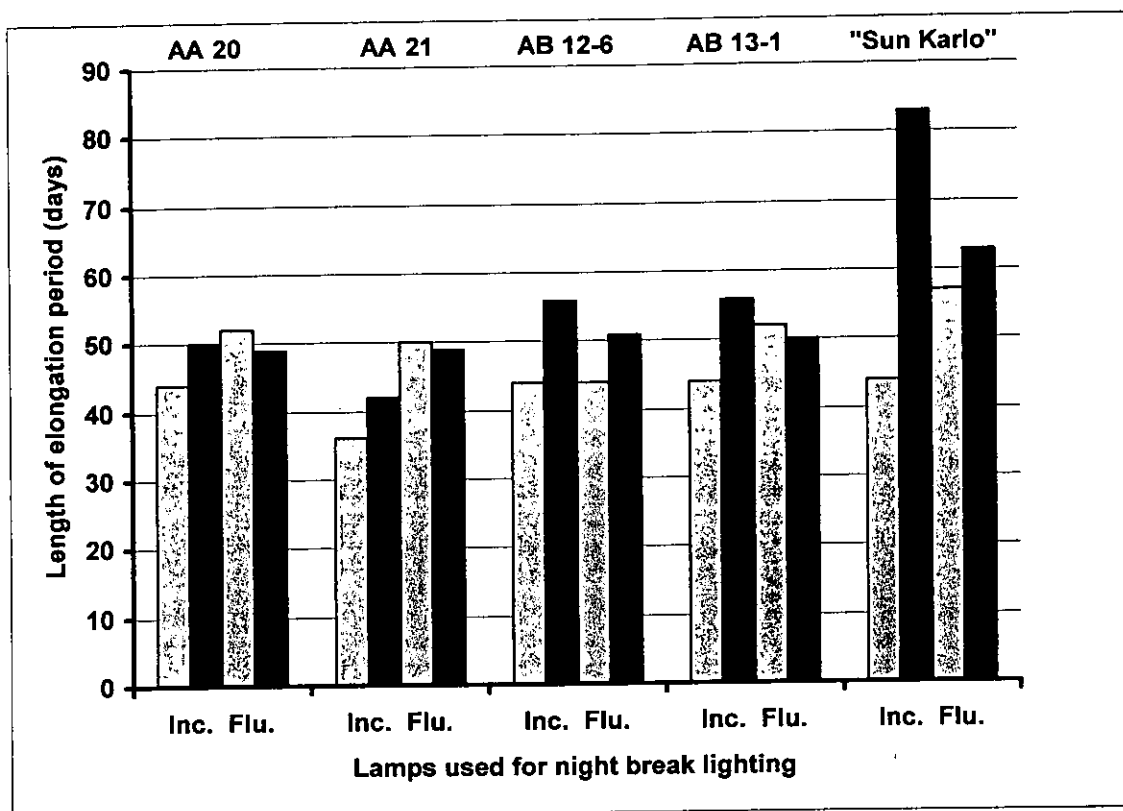
הזמן הנדרש, בתנאי הארכת יום טבעי, להתפתחות ענף תפוחית בצמחי אסטר "סן-קרלו" מועשרים בפיטוכרום A או B. הצמחים גדלו בחממה בשני מחזורי גידול, סתווי (עמודות אפורות) וחורפי (עמודות שחורות) בתנאים של יום טבעי מוארך ל- 14 או 16 שעות אור בעזרת אור מנורות פלורוסנט 41. הקווים המסומנים ב-AA מועשרים בפיטוכרום A והקווים המסומנים ב-AB מועשרים בפיטוכרום B.



איור 4

הזמן הנדרש, בתנאי יום טבעי מלווה בשכירת לילה למשך שעתיים, להתפתחות ענף תפוחת בצמחי אסטר "סן-קרלו" מועשרים בפיטוכרום A או B.

שכירת הלילה ניתנה באור מנורות להט או פלורוסנט 41. הטיפול ניתן בשני מחזורי גידול בסתיו (עמודות אפורות) ובחורף (עמודות שחורות). AA מסמן צמחים מועשרים בפיטוכרום A, AB מסמן צמחים מועשרים בפיטוכרום B.



סיכום עם שאלות מנחות

מטרת המחקר: ביטול או הקטנת התלות של הפריחה באסטר בשטף אור השמש ובתאורה מלאכותית בתקופת החורף ע"י העשרה בפיטוכרום הקולט את האור שמפעיל את מערכת הפריחה, תוך חיפוש השפעת ההעשרה על המנגנונים המשותפים למרבית צמחי היום הארוך לצורך הבנת כלליות המערכת.

עיקרי הניסויים והתוצאות: העשרה בשני הפיטוכרומים הקטינה את התלות בכמות אור השמש והגדילה מאד את היבול המסחרי של אסטר. פיטוכרום A קיצר את אורך היום הקריטי ואפשר יצירת ענפי פריחה בחורף ללא תוספת תאורה מלאכותית. פיטוכרום B ייעל מאד את התגובה לשבירת לילה. את פעולתו מיקמנו בתחום מעבר האור לשעון האנדוגני.

המסקנות המדעיות וההשלכות על יישום המחקר: התוצאות מצביעות על השפעה של העשרה בפיטוכרום על מנגנוני בקרה מרכזיים של מערכת הפריחה בצמחי יום-ארוך ובכך מאשרות את ההנחה שהשפעתם על צמחי יום ארוך אחרים תהייה דומה. ההשלכות המידיות על אסטר מתבטאות בתוספת גדולה של יבול ובחיסכון ניכר בהוצאות הגידול ע"י ביטול הצורך בתוספת תאורה. התוצאות מצדיקות בחינה של השפעת העשרה דומה גם על צמחים אחרים.

הבעיות שנותרו לפתרון: הבעיה המרכזית היא שאלת המסחור של צמחים מהונדסים. בחלקה הגדול יכולה בעיה זו להיפתר ע"י מחקר שיתמקד במרכיבי המבנה שמסיעים להחדרת הגן ולהפעלתו בצמח.

האם הוחל בהפצת הידע: תוצאות המחקר מהוות בסיס לרישום פטנט שנמצא בשלב PCT. ישנה התקשרות ראשונית בניסיון למסחור.