

דו"ח מסכם לתכנית מחקר מספר 203-1215-21

שנת מחקר 3 מתוך 3 שנים (2021)

שימוש בטיפוס שקד בעל עמידות טבעית לצרעת השקד להבנת מנגנון העמידות

ולהשבחה של זני שקד עמידים לצרעה

Using naturally resistant almond variety to the almond wasp for understanding the resistance mechanism and for breeding wasp resistant almond cultivars

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות
ע"י

דורון הולנד, מטעים, מנהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נוה יער
עירית בר-יעקב, מטעים, מנהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נוה יער
כאמל חטיב, מטעים, מנהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נוה יער
רתם הראל-בז'ה, מטעים, מנהל המחקר החקלאי, מרכז מחקר נוה יער
ליאורה שאלתיאל-הרפז, הגנת הצומח, מו"פ צפון/מיגל

Doron Holland, Fruit Culture, A.R.O., Newe Ya'ar Research Center, P.O.B. 1021,
Ramat Yishay 30095. vhhollan@agri.gov.il

Irit Bar-Ya'akov, Fruit Culture, A.R.O., Newe Ya'ar Research Center, P.O.B. 1021,
Ramat Yishay 30095. iritby@agri.gov.il

Kamel Hatib, Fruit Culture, A.R.O., Newe Ya'ar Research Center, P.O.B. 1021,
Ramat Yishay 30095. kamelk@agri.gov.il

Liora Shaltiel-Harpaz, Migal Galilee Research institute, P.O. Box 831, Kiryat
Shmona 11016, liora@migal.org.il

תקציר

הצגת הבעיה: צרעת השקד *Eurytoma amygdali* Enderlein הינה מזיק מפתח אשר מסוגל לחסל חלק גדול מהיבול במטע. התוצאה היא הכרח להשתמש בחומרי הדברה אשר פוגעים בסביבה ומהווים סכנה בריאותית לאדם, לאויבים טבעיים של מזיקים ולדבורים אשר חיוניות לחנטה. בשנים האחרונות קיימים פחות ופחות חומרי הדברה מותרים לשימוש היעילים כנגד הצרעה והתוצאה עלולה להיות עליה משמעותית בנזקים שלה, בעיה המחייבת פתרון בדרכים חלופיות. שיטות העבודה: מאגר טיפוסים השקדים בנוה יער נסרק ואותרו טיפוסים עמידים לצרעה. נעשה שימוש בטיפוס עמיד וזן רגיש בשני כיוונים מרכזיים: 1. השבחה של זני שקד עמידים לצרעה. 2. לימוד מנגנון העמידות כנגד הצרעה. זאת באמצעות אוכלוסיות מתפצלות ושיטות גנומיות וגנטיות שמטרתן למפות את האזורים בגנום השקד האחראיים לעמידות כנגד הצרעה מחד ומאידך בוצעו הכלאות מכוונות בכדי להכניס את

תכונת העמידות לזנים בעלי ערך מסחרי. המחקר בחן את מנגנון ההורשה של העמידות לצרעה. נוצרו אוכלוסיות מכלוא אשר ישמשו שלב ראשון בכיוון יצירת זני שקד עמידים לצרעה וכן למיפוי גנטי. במקביל נעשתה השוואה טרנסקריפטומית בין זן רגיש לטיפוס העמיד לאיתור גנים נבחרים וסמני SNP. תוצאות עיקריות: א. מכלואי F1: נמצאו צמחי F1 של מכלוא 'שניר' x 'מתן' עם עמידות משמעותית כנגד הצרעה (אחוזי נגיעות >1%). ב. שימוש בזנים עמידים ככנות ביניים: מקטע מעץ 'שניר' עמיד לצרעה שהורכב בין הכנה לרוכב 'מתן' הוריד את רמת הרגישות לצרעה. ג. מכלואים נוספים: יצרנו מכלואי F2 נוספים והרחבנו את אוכלוסיית F1 להמשך המחקר. ד. קביעת גנוטיפ של האוסף ומיפוי התכונה: אוסף השקד נסרק עם 5,000 סמני SNP. נמצאה תאחיזה בין ארבעה סמנים לרגישות לצרעה, סמנים אלו סמוכים, לפי גנום השקד, לגנים שנבחרו כמעניינים ע"פ ביטוי דיפרנציאלי בין זנים עמידים לזנים רגישים. המלצות להמשך מחקר: המשך בדיקת עמידות לצרעה בעותקים של מכלואי F1 ובעצים משולבים של 'מתן' ומקטע של 'שניר', סריקה של אוכלוסיות מתפצלות עם סמנים נבחרים.

מעריכים מומלצים לבדיקת הדו"ח המדעי

1. ד"ר רפי שטרן – מו"פ צפון
2. ד"ר מרטין גולדווי – מו"פ צפון
3. ד"ר ארנון דג – מנהל המחקר החקלאי, גילת

הצהרת החוקר הראשי

הממצאים בדו"ח זה הנם תוצאות ניסויים.
הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא.



חתימת החוקר

תוכן עניינים

מבוא (רקע מדעי ומטרות המחקר)	3
פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר	4
דיון ומסקנות	11
פרסומים מדעיים	12

מבוא (רקע מדעי ומטרות המחקר)

השקד נחשב מזון פונקציונאלי וענף השקד בישראל מקיף כ-65,000 דונם ומספק כשני שלישי מהצריכה המקומית. הגידול רווחי ומתרחב מדי שנה. שווי הייצור הוא כ-250 מיליון ש"ח במסחר הסיטוני. הדבקת הפער בין הצריכה לייצור מחייבת שמירה על הקיים תוך שיפור מתמשך בהעלאת הרווחיות. צרעת השקד (*Eurytoma amygdali* Enderlein (Hymenoptera: Eurytomidae)) הינה חרק מונופאגי שהפונדקאי היחיד שלו הוא השקד. זהו מזיק מפתח הפוגע בחנט השקד וגורם לנזק כלכלי משמעותי עקב פגיעה בגלעין הנאכל, ביבול ואף בעץ (Aharoni 1916; Klapperich 1970; Mentjelos and Atjemis 1964). הוא נמצא במדינות רבות בדרום מזרח אגן הים התיכון, דרום אירופה ובמרכז אסיה. הצרעה מקיימת דור אחד בשנה במטע: הבוגרת מטילה את ביציה במרץ-אפריל בתוך חנט השקד הצעיר, לאחר כשבועיים בוקע זחל הניזון מהגלעין, בחודש יוני נכנס הזחל לתרדמת חורף בתוך הגלעין ומתגלם בסוף החורף והצרעה הבוגרת מגיחה בפברואר-מרץ בשנה העוקבת (Plaut 1971, 1972; Plaut and Mansour 1973; Khanmohamadi et al. 2016). פרי שמתפתח בו זחל, משחיר ואינו נושר (מומיה) ובמשך הקיץ העלים על הענף סביבו מתייבשים. לא ידוע האם יש עמידות טבעית לצרעה בזני שקד ומה הם הגורמים המשפיעים על הרגישות לצרעה ולא אותרו בספרות דיווחים על טיפוסים שקד עמידים למזיק.

זני השקד העיקריים בישראל רגישים מאוד לצרעה וללא טיפול מתאים רוב היבול עלול להינזק. הטיפול כנגד הצרעה כולל שימוש בחומרי הדברה מסוכנים לאדם ולסביבה שפוגעים גם בחרקים מועילים כדוגמת דבורת הדבש החיונית להאבקת השקד ובאויבים טבעיים של חרקים מזיקים אחרים בשקד וכך גורמים להגדלת נזקיהם. בשנים האחרונות צומצם באופן משמעותי המגוון של חומרי ההדברה המותרים לשימוש כנגד הצרעה והחומרים המאושרים בעלי יעילות נמוכה יותר כנגדה. מגמת ההפחתה בשימוש בחומרי הדברה מסוכנים לאדם ולסביבה מחד ופיתוח עמידות של המזיק מאידך יובילו לעליה משמעותית בנזק שיגרם על ידה. בעקבות פעולת ניקוי המטע לאחר הקטיף מכל שרידי השקדים שעל הקרקע והעצים אובחנה ירידה מסוימת באוכלוסיית הצרעה במטע אך העלות הגבוהה של הסניטציה מפחיתה את הרווחיות.

במאגר גנטי של טיפוסים שקד שמקורם מישראל וממדינות אחרות ברחבי העולם, שנמצא בנוה יער, נבדקה הרגישות לצרעה של כ-60 טיפוסים שקד, במשך חמש שנים, ללא כל הדברה כימית של המזיק. אותרו באוסף הבדלים משמעותיים בין הטיפוסים מבחינת רגישותם לצרעת השקד כשהטיפוס P.Am.772-273 ('שניר') נמצא עמיד כמעט לחלוטין לצרעה אולם אינו מתאים לשימוש מסחרי כי הגלעין מריר ולא איכותי והיבול לא מספיק גבוה (איזנבר וחוב' 2020).

גילוי הטיפוס העמיד לצרעת השקד אפשר לייצר אוכלוסיית מכלוא בין הטיפוס העמיד לזן מסחרי רגיש לצרעה. אוכלוסייה כזו היא אבן בסיס ללימוד המנגנון הגנטי האחראי לעמידות ולהשבחה של זני שקד עתידיים. בכדי לאפשר ייצור אוכלוסיית F2, ובשל איכותו הגבוהה, נבחר הזן 'מתן' כהורה השני במכלוא. הפריה עצמית מתאפשרת בשקד כתוצאה מנוכחות האלל הדומיננטי *Sf*, והזן 'מתן' נושא אלל זה. שמונה מכלואי F1 בין הזן 'מתן' הרגיש לטיפוס 'שניר' העמיד יחסית, מהווים את הבסיס הראשוני לעבודה זו. העבודה שבצענו הביאה להבנה מה הם הגורמים הגנטיים הקשורים למנגנון

העמידות לצרעה ולמצב מתקדם של השבחה לקראת זנים עמידים לצרעה. כמו כן, ניתן יהיה בעתיד ליישם את הידע הגנטי לצרכי פיתוח אמצעי הדברה ידידותית כנגד הצרעה. עבודה זו חשובה לעצם קיום הענף ולהפחתת שימוש בחומרי הדברה מסוכנים לאדם ולסביבה.

מטרות המחקר:

מטרת המחקר ארוכת הטווח (מעבר לטווח המימון של תכנית זו) היא לפתח זני שקד בעלי עמידות או סבילות גבוהה לצרעת השקד, בעלי יכול גבוה של פרי איכותי ומותאמים לגידול בישראל. שאלת המחקר היא להבין כיצד מורשת תכונת העמידות לצרעת השקד ולמפות את הגנים המבקרים תכונה זו.

פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר

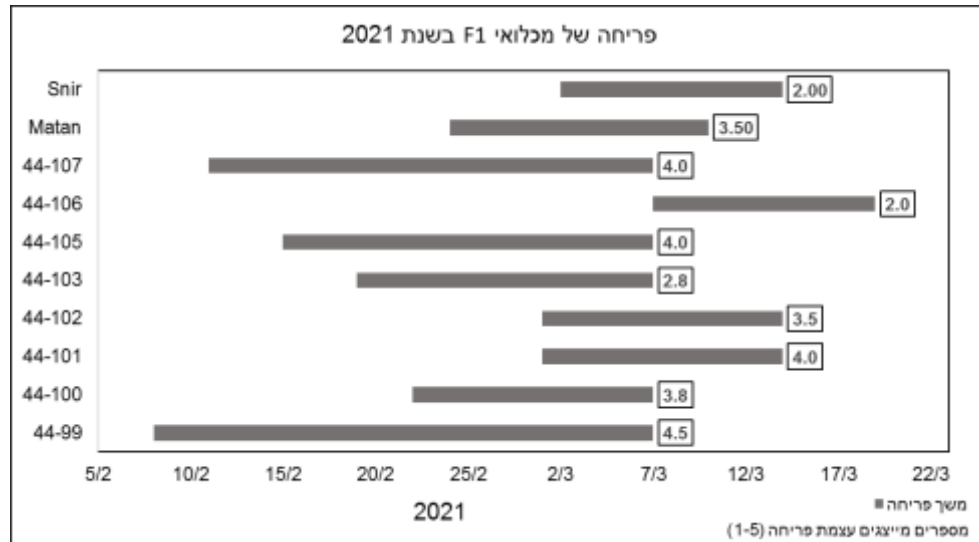
יצירת אוכלוסיית F2. זרעי המכלוא בין 'מתן' ל'שניר' (F1) נושאי הגן *Sf* ולכן בעלי יכולת הפריה עצמית. במהלך שנות המחקר נסגרו בכל עץ F1 מספר ענפים ברשת נגד חרקים ונאספו מאות זרעי מכלוא F2 (טבלה 1). סה"כ אוכלוסיית F2 מונה 296 צמחים משישה צמחי F1 שונים (טבלה 1), עשרים שתילים נטועים במטע ו-276 יעברו מהמשתלה למטע בחורף 2022. הרחבת אוכלוסיית F1 לצורך הגדלת אוכלוסיית F1 נעשו ב-2019 הכלאות נוספות בין 'שניר' ל'מתן'. 32 שתילים של הכלאות אלו נמצאים במטע.

טבלה 1. אוכלוסיית מכלוא F2 שנוצרה בשנים 2018-2020

מכלוא	שתילים במטע	שתילים במשתלה
44/99	8	41
44/100	-	66
44/101	-	65
44/102	1	9
44/103	2	70
44/105	9	25
סה"כ	20	276

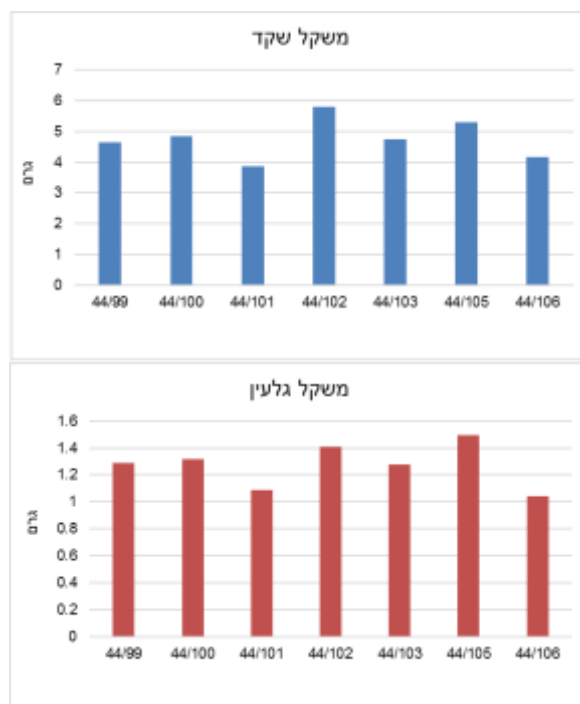
איסוף עלים מאוכלוסיית F2 לשימור ולהפקת DNA. עלים מתאימים להפקת DNA נאספו מצמחי F2 במשתלה ובמטע, שמורים במקפיא לקראת הפקת DNA. איפיון צמחי F1 לאיכות פרי, יכול, איכות נייעור, מועד פריחה וצימוח. אפיון פנולוגי של פריחה ולבלוב נעשה בשנים 2020 ו-2021 לצמחי F1. ישנם הבדלים בצימוח בין הצמחים, שישה עצים חזקים, אחד מאוד חלש, אחד מצמחי F1 המקוריים מת, אך יש ממנו עותקים בחלקה נוספת. בשנת 2021 נתוני פנולוגיה נאספו מחמישה עצי המקור, ומשני מכלואים (44-106, 44-107) הנמצאים בעותקים. הנתונים שנאספו היו על המועדים של פרח ראשון, 10% פריחה, סיום פריחה, דרגת פריחה (1 פריחה דלה – 5 פריחה שופעת), מועדי 10% כיסוי עלווה וכיסוי עלווה מלא ודרגת הכיסוי (1 כיסוי דליל – 5 כיסוי צפוף). דרגת הפריחה בשתי השנים היתה בין 2 ל-4.5, מועד תחילת הפריחה היה עם שונות בין הצמחים, מכלוא מקדים מתחיל פריחה בשבוע הראשון של פברואר ואילו המאחר בשבוע הראשון של מרץ. בהתאמה היה גם מועד סיום הפריחה מהימים הראשונים

של מרץ ועד אחרי אמצע החודש. נתונים על הפריחה בשנת 2021 מוצגים באיור 1. דרגת כיסוי עלווה היתה טובה מאוד בכל המכלואים בשנת 2021. מועד תחילת ההנצה משתנה בין הצמחים מסוף פברואר ועד שבוע ראשון של מרץ, אך בכיסוי המלא של העלווה לא היה הבדל משמעותי בין העצים.



איור 1. משך הפריחה של צמחי F1, 'מתן' ו'שנir' ב-2021. מספרים במסגרות מייצגים עוצמת פריחה (1-5).

אפיון ראשון לפרי של צמחי F1 נעשה בשנים 2020 ו-2021 (טבלה 2). לכל הצמחים פרי עם קליפה קשה כמו להורה 'שנir'. מועד ההבשלה השתנה בין הצמחים השונים מאמצע יולי ועד אמצע אוגוסט. כמו כן ישנה שונות בגודל וצורת הגלעין (איור 2). יש אי התאמה בין השנים בצורת השקד של שני מכלואים, יעשה ברור נוסף בנושא בפירות של שנת 2022. אין הערכת יבול למכלואים לשנת 2021 בגלל שהיתה פעילות רבה של ציפורים שפגעו ביבול ולכן לא ניתן היה לבצע חישובי יבול. יחד עם זאת ע"פ הערכות, ניתן לשער כי למספר מכלואים היבול גבוה.

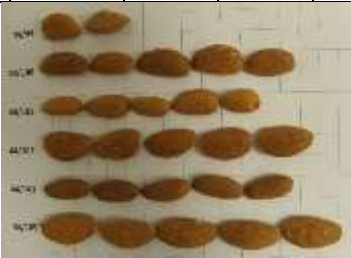


איור 2. משקל ממוצע של שקד וגלעין של מכלואי F1. הנתונים הינם ממוצעי משקלים של השנים 2020 ו 2021. אופן ביצוע המדידות לא אפשר לחשב סטיית תקן.

טבלה 2. תכונות פרי של צמחי מכלוא F1 ממוצע של השנים 20-21 ותמונה של הגלעינים

הזריע	מראה שקד 1-5	צבע הקליפה	מראה הקליפה	קשיות הקליפה	שלמות הקליפה	הערות על השקד	משקל שקד בודד גרם	משקל גלעין בודד גרם	גודל גלעין	אורך הגלעין מ"מ	רוחב הגלעין מ"מ	עובי הגלעין מ"מ	גודל הגלעין 1-5
44/99	4.88	בהיר	יפה חלק	קשה	שלם		4.6	1.3	28.8	2.58	1.26	0.66	4.55
44/100	4.75	בהיר	יפה חלק	קשה מאוד	שלם		4.8	1.3	27.1	2.55	1.35	0.74	4.38
44/101	4.8	בהיר	יפה חלק	קשה	שלם		3.9	1.1	28.3	2.16	1.16	0.60	4.27
44/102	4.8	בהיר	יפה חלק	קשה	שלם	שפיץ	5.8	1.4	24.3	2.57	1.44	0.68	4.68
44/103	4.63	בהיר	יפה חלק	קשה	שלם		4.7	1.3	27.6	2.51	1.33	0.70	4.28
44/105	4.53	בהיר	יפה חלק	קשה	שלם		5.3	1.5	28.0	2.68	1.29	0.66	4.68
44/106	4.4	חום בהיר	יפה	קשה	שלם	שפיץ קטן	4.2	1.0	25.0	-	-	-	4.6

הזריע	מראה הגלעין 1-5	צבע הגלעין	שרטוט	צבע הגלעין 1-5	טעם 1-5	מרירות 0-3	כפולים	מצומקים	נגועים
44/99	4.38	חום בהיר	חלש מאוד	4.45	3.8	0.4	5.0	0.0	3.3
44/100	4.48	חום בהיר	זניח	4.52	4.2	0.0	0.0	0.0	5.0
44/101	4.23	חום בהיר	זניח	4.5	4.3	0.0	25.6	3.3	6.7
44/102	4.43	בהיר	יש חלש	4.58	3.8	0.5	0.0	1.7	5.0
44/103	4.37	חום בהיר	זניח	4.6	4.4	0.1	1.7	0.0	0.0
44/105	4.42	חום בהיר	זניח	4.57	4.5	0.0	10.0	0.0	0.0
44/106	4.40	חום מעט בהיר	אין	4.6	4.4	0.0	-	-	-



גלעינים 2021



גלעינים 2020

ניטור אוכלוסיית מכלוא F1 לרגישות לצרעה. ארבעה עותקים (מורכבים על כנה GF.677) של שמונה מכלואי F1 נשתלו בינואר 2019 בחלקה רחוקה מהמטע הוותיק. בנוסף נשתלו באותה חלקה ארבע חזרות של ההורים, 'מתן' ו'שנר', שני עצים בכל חזרה. החלקה לא רוססה נגד צרעת השקד.

מעקב אחר העותקים של צמחי F1 העלה חשד שחלקם לא דומים למקור. לצורך ויזוי נערך אפיון לכל המכלואים ולעותקים עם שלושה סמני SSR, נמצא כי חמישה צמחים שונים מהמקור והם לא כוללים באנליזות השונות.

במהלך 2021 נערך ניסוי של בדיקת רגישות לצרעה במכלואי F1 וההורים. לכל עץ הוצמדה סלסלה עם חמש עשרה מומיות שנאספו ע"י הצוות של ליאורה שאלתיאל-הרפז במטעים שונים. הצוות של ליאורה בדק אחוזי הגחה מהמומיות כדי לוודא שתהיה פעילות של צרעות במטע. חיבור הסלסלה

עם המומיות נעשה במהלך הפריחה (10% עד פריחה מלאה), רוב העצים היו עם 60% פריחה. יש לציין שמכלוא 44-102 קיבל את הסלסלות עם הצרעות בסוף הפריחה. יחד עם זאת נצפתה פעילות של הצרעות בכל המטע. ניתן היה לראות נגיעות מאוד גבוהה של עצי 'אום אל פאחם' הנטועים במטע שלא קיבלו את הצרעות בצמוד לעץ. במהלך האביב נצפתה הגחה של צרעה מ 56% מהמומיות. באמצע יולי נקטפו כל הפירות (שלב ירוק) מכל עץ לחוד. לאחר הקטיף הופרדו המומיות, ונרשם מספר הפירות והמומיות לכל עץ. בנוסף נלקחה דגימה של 5 מומיות מכל עץ לנוכחות זחלים של צרעה. במקרה ומדגם של 5 היה קטן מעשר, נלקחו עשר מומיות או כולן לבדיקה.

תוצאות:

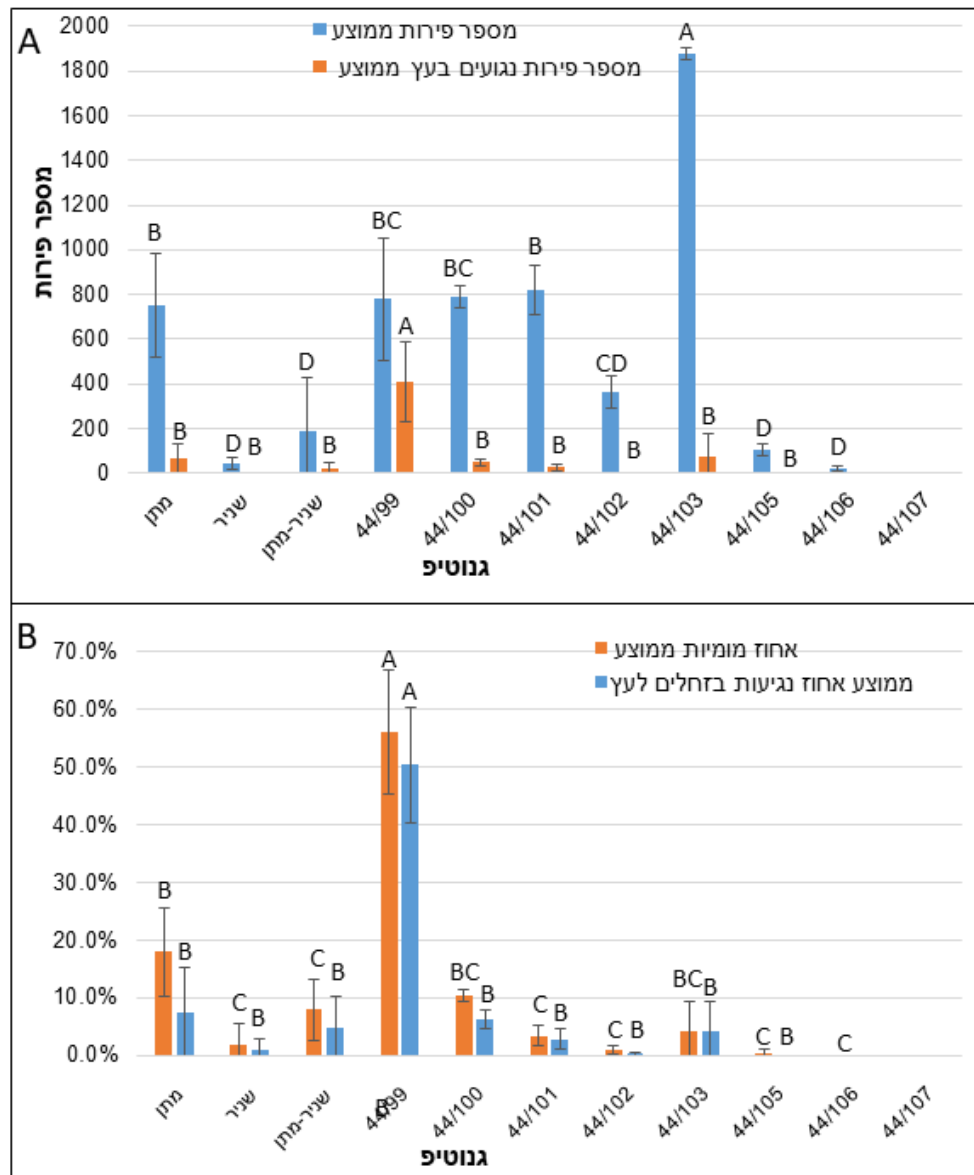
ישנם הבדלים בפוריות של העצים (טבלה 3 ואיור 3A). שני מכלואים לא הניבו, אחד כלל לא הניב ואילו השני היה עם 20 פירות בממוצע לעץ. מענין לציין שעצי המקור של מכלואים אלו לא התפתחו ואחד מהם אף מת. ששת המכלואים האחרים היו עם מאות פירות לעץ, מ 103 פירות בממוצע לעץ ועד 1877. בשלושה מכלואים היבול היה דומה לשל 'מתן' ואילו לאחד המכלואים (44-103), היה יותר מפי 2 פירות. 'שניר' ההורה השני של המכלוא נתן מעט מאוד פרי ב-2021, ככלל זהו עץ עם יבול נמוך.

נמצאו הבדלים משמעותיים בין מכלואי F1 ברגישות לצרעה (איור 3B ואיור 4). מכלוא אחד, 44-99, היה עם רגישות גבוהה לצרעה, 56% מהפירות היו מומיות מתוכן מעל 80% היו עם זחלים של צרעה. המכלואים האחרים היו עם רגישות נמוכה לצרעה, נמצאו אחוזים בודדים של מומיות מכלל הפירות של העץ (טבלה 3), שני מכלואים אף היו עם פחות מאחוז מהפירות שהם מומיות. ההורה הרגיש, 'מתן', היה עם 18 מומיות מכל הפירות ואילו ההורה העמיד, 'שניר', היה עם 2. במכלואים עם הרגישות הנמוכה לצרעה רוב המומיות (< 50) היו עם זחלים. מענין לציין שנערכה הערכת של הנגיעות לכל עץ בתחילת יולי והיתה קורלציה גבוהה ($r = 0.80$) בין ההערכה לאחוזי המומיות שחושבו.

טבלה 3. ממוצעים וסטיות תקן של מספר פירות, אחוזי מומיות ונגיעות בצרעה של עותקים של

מכלואי F1. אותיות מציינות הבדלים משמעותיים ע"פ מבחן Tukey-Kramer HSD

מספר פירות		אחוז מומיות		אחוז נגיעות בזחלים לעץ		מספר פירות נגועים בעץ		אחוז מומיות נגוע בזחל		
ממוצע	StdDev	ממוצע	StdDev	ממוצע	StdDev	ממוצע	StdDev	ממוצע	StdDev	מכלוא
779 ^{BC}	272.1	56 ^A	10.8	50.4 ^A	10	408.35 ^A	178.96	90.1 ^A	5.71	44/99
791 ^{BC}	48.4	10.4 ^{BC}	1.1	6.3 ^B	1.7	50.1 ^B	15.02	60 ^{AB}	10	44/100
820 ^B	112.9	3.4 ^C	1.8	2.8 ^B	1.7	24 ^B	16.9	79.17 ^A	9.56	44/101
364.7 ^{CD}	72.3	0.8 ^C	0.8	0.2 ^B	0.3	0.67 ^B	1.15	33.33 ^{AB}	57.73	44/102
1877.5 ^A	29	4.1 ^{BC}	5.3	4 ^B	5.4	74.67 ^B	100.88	77.8 ^{AB}	31.39	44/103
103 ^D	28.2	0.4 ^C	0.6	0 ^B	0	0 ^B	0	0 ^B		44/105
20.5 ^D	13.8	0 ^C	0	0 ^B	0	0 ^B	0			44/106
0										44/107
751.3 ^B	229.8	18 ^B	7.6	7.5 ^B	7.7	62.23 ^B	67.52	37.64 ^{AB}	26.19	מתן
43.9 ^D	28.5	1.9 ^C	3.7	0.9 ^B	1.9	0.37 ^B	0.74	14.6 ^B	27.37	שניר
184.1 ^D	244.28	7.9 ^C	5.2	4.7 ^B	5.6	19.67 ^B	26.66	50.3 ^{AB}	37.4	שניר-מתן

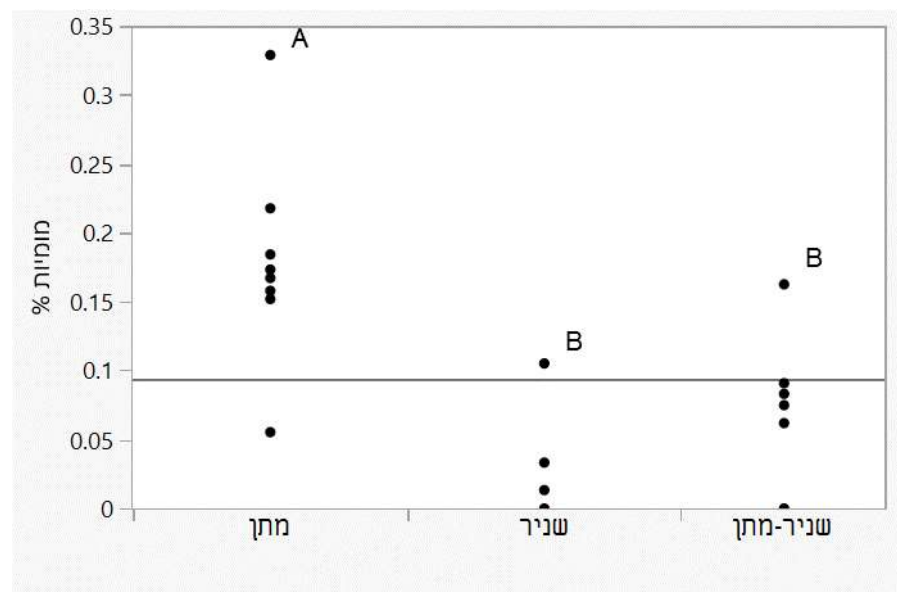


איור 3. מספר פירות ואחוזי נגיעות בצרעה בעותקים של מכלואי F1. (A) ממוצעים של מספר הפירות הממוצע לעץ ומספר הפירות הנגועים בצרעה לאחר חישוב אחוז המומיות והנגיעות של המומיות בצרעה. (B) ממוצעים של אחוז המומיות מכלל הפירות ואחוז של הפירות הנגועים בצרעה. $\pm$ סטיית תקן. אותיות מציינות הבדלים בין הגנוטיפים השונים ע"פ מבחן Tukey-Kramer HSD.



איור 4. פירות ומומיות של שני מכלואי F1 בקטיפ. (A) מכלוא 44-99 עם אחוזי מומיות גבוהים. (B) מכלוא 44-103 עם כמות מומיות נמוכה. ניתן לראות פרי ירוק בצד ימין ומומיות בצד שמאל של כל פאנל.

הרכבות סנדוויץ' של 'מתן' ו'שנir'. בחלקה בה נבדקו מכלואי F1 בארבעה עותקים, נשתלו בינואר 2019 גם עצי סנדוויץ' של 'מתן' ו'שנir' בארבע חזרות, שני עצים בכל חזרה. עצים אלו בנויים מכנה GF.677 עליה מורכב מקטע של 'שנir' שעליו מורכב 'מתן'. המקטע של 'שנir' כולל ענף אחד. עצים אלו השתתפו בניסוי רגישות לצרעה של מכלואי F1 כמפורט בפרק הקודם. כמות הפרי בעצים אלו היתה נמוכה משמעותית (טבלה 3 ואיור 3A) מעצי הביקורת של 'מתן'. יתכן והסיבה לכך היא, שהם הורכבו יותר מאוחר והנוף שלהם עדין יותר צעיר. יחד עם זאת צריך לבדוק בהמשך אם אין השפעה של מקטע של 'שנir' על הפוריות. התוצאות של רגישות לצרעה היו מפתיעות (טבלה 3 ואיור 5), נמצאו הבדלים משמעותיים (במבחן Tukey-Kramer HSD) בין עצי הסנדוויץ' ל'מתן' ברגישות לצרעה. נראה כי המקטע של 'שנir' גרם להורדת הרגישות. תוצאה זו מחייבת חזרה בשנים נוספות.



איור 5. אחוזי מומיות בעצי סנדוויץ' שנir-מתן. אחוז המומיות מכלל הפירות של עצי סנדוויץ' שנir-מתן ושל 'מתן' ו'שנir'. A ו B מציינים הבדלים משמעותיים במבחן Tukey-Kramer HSD.

סריקה עם סמנים גנטיים. במהלך שנות המחקר נמצאו מספר רצפים גנטיים שהראו קשר לתכונה של רגישות לצרעת השקד. בדו"ח של שנת 2020 דווח על ארבעה סמנים (טבלה 4) הנמצאים בתאחיזה מובהקת לרגישות לצרעה באוסף השקד (נבדק במבחן Wilcoxon / Kruskal-Wallis Test ($p < 0.05$). סמנים אלו נמצאים בארבעה כרומוזומים שונים (1,6,7,8). כמו כן סמנים אלו נמצאו קרובים לגנים, השייכים למסלול הטרפנים והפלבנואידים, שנמצאו נבחרים בטרנסקריפטום, (טבלה 4). דיון על הטרנסקריפטום והתוצאות מניסוי זה דווחו ב 2019.

טבלה 4. סמנים בתאחיזה ($p < 0.05$) במבחן Wilcoxon / Kruskal-Wallis Tests לעמידות לצרעה וגנים נבחרים הקרובים אליהם

SNP	Year	Prob > ChiSq	Close gene ID P.dulcis Texas v2	Chromosome	blast2GO	Type
AP019297-1_33870552	2017	0.0312	Prudul26A019082	Chr1	carotenoid 9,10-cleavage dioxygenase	Terpen; Carotenoid
AP019302-1_12814214	2015	0.0441	Prudul26A007263	Chr6	neomenthol dehydrogenase	Terpene
AP019303-1_16312855	2017 & Average	0.0343	Prudul26A007050	Chr7	flavonoid 3 - monooxygenase	Flavonoids
AP019304-1_14006891	2017	0.0039	Prudul26A004068	Chr8	flavonol synthase flavanone 3-hydroxylase	Flavonoids

סריקה של צמחי F1 עם סמני SNP. פותחו סמנים לסריקה ע"י ריצוף במעבדה לארבעת הסמנים המתוארים בפרק הקודם. שמונה צמחי F1 נסרקו עם סמנים אלו. לא נמצאה תאחיזה בין ארבעת הסמנים למדדים השונים.

צמחי F1 נסרקו עם 18 סמני SNP נבחרים כמתואר בדו"ח לשנת 2020, לא נמצאה תאחיזה בין סמנים אלו ורגישות לצרעה שנמדדה בשנת 2021. כמו כן לא נמצאה תאחיזה למדדים האחרים שנלקחו.

דיון ומסקנות

יצירת אוכלוסיית F2 נעשתה בשלבים. האוכלוסייה מורכבת מכמה הורים מדור F1 ובנייתה נמשכה מספר שנים. בסה"כ ישנם כמה מאות זרעים של מכלואי F2 שהונבטו ב 2021 וישתלו במטע בחורף 2022.

בשנת 2021 נעשה לראשונה ניסוי לרגישות לצרעה בעצים בוגרים נושאי פרי. בניסוי נבחנו שמונה מכלואי F1 של 'שניר' ו'מתן'. כל מכלוא היה בארבעה עותקים. נמצאו הבדלים בין המכלואים בפוריות וברגישות לצרעה. אותרו ארבעה מכלואים עם פוריות גבוהה, לפחות כמו בזן 'מתן'. נמצאו ארבעה מכלואים עם פחות מחמישה אחוז מהפרי נגוע בצרעה, בשניים מהם היה פרי עם פחות מאחוז נגיעות. גודל ואיכות הפרי הם טובים וטעימים אך לא מצטיינים.

הרגישות לצרעה בעץ 'מתן' הכולל מקטע של 'שניר' (סנדוויץ') היתה נמוכה משל 'מתן' ללא המקטע. צריך לחזור על הניסוי, עם התבגרות העץ ולבדוק השפעה על יבול ואיכות הפרי.

בריצוף הטרנסקריפטום שנעשה ב-2019 והשוואה בביטוי השונה בין הזנים, אותרו 53 גנים בעלי עניין לסריקות בהמשך. נמצאו SNP על גנום השקד בקרבה לגנים אלו. הסמנים נסרקו באוסף זני השקד. ארבעה סמנים סמוכים לגנים מעניינים נמצאו בתאחיזה לרגישות לצרעה באוסף השקד. התאחיזה אמנם לא מובהקת במבחן permutation, אך בהינתן, שמבחן התאחיזה נעשה באוסף גנטי ובכך שמדידת רגישות לצרעה היתה שונה משנה לשנה, יש בתוצאות אלו בסיס טוב להמשך. הסמנים שבתאחיזה נמצאים על הגנום בקרבה לגנים נבחרים ממסלול הטרפנים והפלבנואידים. חומרים נדיפים ממשפחת הטרפנים ידועים בספרות כחומרים הגורמים דחייה או משיכה של חרקים ואף כחלק

מפעילות הגנה של הצמח כנגד חרקים מזיקים (Huang et al. 2010; Nawade et al. 2019). פלבנואידים משתתפים בתהליך יצירת הליגנין והשעווה המוכרים כחומרים פעילים במהלך התפתחות העץ והפרי כחלק ממנגנון התקשות דפנות התאים. מחקר אחר שנעשה ביחידה הראה שיתכן ויש קשר בין אופן התקשות החנטים לבין מידת רגישותם להטלות הצרעה.

צמחי F1 נבחנו עם מספר סמנים שנבחרו מההשוואה הטרוסקריפטומית וכאלו שנמצאו בתאחיזה באוסף. נמצאה שונות גנוטיפית בין הצמחים, אך לא נמצאה תאחיזה לרגישות לצרעה. יש לציין שהמבחן עם הסמנים נעשה עם מעט מאוד סמנים ומעט מאוד צמחי F1. לכן התוצאות מצריכות זהירות מיוחדת. לאור זאת כבר בצענו מספר דברים: 1. עשינו עוד כמה עשרות צמחי F1. 2. עשינו כשלוש מאות צמחי F2 מהכלאות עצמיות של טיפוסים עמידים של F1. 3. איתרנו כ-7000 סמני SNP חדשים (Brukenthal et al. 2021). הצמחים נשתלו במטע נווה יער. הסריקה לרגישות לצרעה תחל משנת 2024 כשהצמחים יתנו פרי. בהקשר זה מתוכננות להגשה תכניות לקרן מדען וקרנות אחרות לשם השלמת התכנית לאיתור סמנים.

ביצוע התכנית בשנתה השלישית עמדה במשימות שהצבנו בתכנית המחקר. המשכנו להקים את התשתית להמשך המחקר הן בפן הגנטי והן בפן הטיפוחי לכיוון עמידות לצרעת השקד.

פרסומים מדעיים

איזנברך א., בר-יעקב ע., חטיב כ., הראל-בז'ה ר., דג א., ראובני ח., שאלתיאל-הרפז ל., איבדאח מ., הולנד ד. 2020. מחקר ביולוגי אנטומי וגנטי על רגישות פרי השקד לצרעת השקד. עלון הנוטע, 74, עמ' 18-23,54

Hillel Brukental, Adi Doron-Faigenboim, Irit Bar-Ya'akov, Rotem Harel-Beja, Ziv Attia, Tamar Azoulay-Shemer and Doron Holland (2021). Revealing the Genetic Components Responsible for the Unique Photosynthetic Stem Capability of the Wild Almond *Prunus arabica* (Olivier) Meikle. *Front. Plant Sci.* 12(2583).
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.779970>

רשימת ספרות

איזנברג א., בר-יעקב ע., חטיב כ., הראל-בז'ה ר., דג א., ראובני ח., שאלתיאל-הרפז ל., איבדאח מ., הולנד ד. 2020. מחקר ביולוגי אנטומי וגנטי על רגישות פרי השקד לצרעת השקד. עלון הנוטע, 74, עמ' 18-23,54

Aharoni, J. (1916). *Eurytoma* sp., ein neuer mandelschadling in Palastina. *Tropenpflanzer* 19, 317-322.

Huang, M., Abel, C., Sohrabi, R., Petri, J., Haupt, I., Cosimano, J., Gershenzon, J., & Tholl, D. (2010). Variation of herbivore-induced volatile terpenes among *Arabidopsis* ecotypes depends on allelic differences and subcellular targeting of two terpene synthases, TPS02 and TPS03. *Plant Physiology*, 153(3), 1293-1310.

Khanmohamadi, F., Khajehali, J., & Izadi, H. (2016). Diapause and cold hardiness of the almond wasp, *Eurytoma amygdali* (Hymenoptera: Eurytomidae), two independent phenomena. *Journal of Economic Entomology*, 109(4), 1646-1650.

Klapperich, J. (1964). Die mandelsamenwespe (*Eurytoma amygdale* end. *Chalcididae hymenoptera*), ein schadling in den mandelkulturen jordanies. *Gesunde Pflanzen*. 16, 73-78.

Mentjelos, J., Atjemis, A. (1970), Studies on the biology and control of *Eurytoma amygdale* in Greece. *Journal of Economic Entomology*. 63, 1934-1936.

Nawade, B., Yahyaa, M., Reuveny, H., Shaltiel-Harpaz, L., Eisenbach, O., Faigenboim, A., Bar-Yaakov, I., Holland D., & Ibdah, M. (2019). Profiling of volatile terpenes from almond (*Prunus dulcis*) young fruits and characterization of seven terpene synthase genes. *Plant Science*, 287, 110-187.

Plaut, H.N. (1971). On the biology of the adult of the almond wasp, *Eurytoma amygdali* End.(Hym., Eurytomidae), in Israel. *Bulletin of Entomological Research*, 61(2), 275-281.

Plaut, H.N. (1972). On the biology of the immature stages of the almond wasp, *Eurytoma amygdali* (Hym., Eurytomidae) in Israel. *Bulletin of Entomological Research*. 61, 681-687.

Plaut, H.N., & Mansour, F. (1973). Studies of the behaviour, dispersal and damage potential of the almond wasp, *Eurytoma amygdali*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 16, 415-421.

סיכום דו"ח ל-2021:

1. **אנא פרט מהם הניסויים שנעשו תוך השוואה לתכנית העבודה המתוכננת והתאמתם למטרות המחקר כפי שהופיעו בהצעה המקיפה.**

בוצעו רוב הניסויים שתוכננו: המשך הקמת אוכלוסיות מכלוא עם כ 300 צמחי F2. נאספו עלים מכל צמחי F2, צמחי F1 נסרקו עם מספר סמנים, איפיון פנולוגי ושל הפרי של צמחי F1. ניסוי רגישות לצרעה בעותקים של צמחי F1 ועצי 'מתן' עם מקטע של 'שניר'. כל זאת לקראת מטרת ההבנה של הגנטיקה של העמידות והשבחה לזן עמיד לצרעת השקד.

2. **מהם עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח?**

נבנתה אוכלוסיית F2 גדולה. ארבעה סמנים שנמצאו בתאחיזה באוסף ואף נמצאים בסמיכות לגנים נבחרים לא נמצאו בתאחיזה בצמחי F1. נמצאה שונות ברגישות לצרעה בין מכלואי F1. מקטע של עץ 'שניר' בעץ מתן תורם להורדת הרגישות לצרעה.

3. **בעקבות הניסויים שנעשו, אנא פרט והסבר כיצד הושגו מטרות המחקר בתקופת הדו"ח או חלק מהן.**

הניסויים בשנה ג' כוונו להקמת תשתית להבנת הגנטיקה של העמידות לצרעה, לבחינה של השונות לרגישות לצרעת השקד בין מכלואי F1. אלה מתאימים למטרות המחקר שהוצהרו בתכנית.

4. **בהתאם להצעה המקיפה, ציין מה התבצע מתוך טבלת המשימות ואבני דרך, כולל אבני דרך כמותיות (סעיפים IV-VI) ומהם הקריטריונים שפורטו בהצעה המקיפה כבוחן להצלחת המחקר אכן הושגו.**

משימות שנה ג'. ניטור לעמידות לצרעה באוכלוסיית F1: **בוצע, מומלץ לחזור על הניסוי.** סיכום וניתוח תוצאות רב שנתיות של ניטור העמידות באוכלוסיית F1: **הניסוי בוצע בצורה שונה בשנת 2019 ו 2021 ולכן קשה להשוות. מומלץ לחזור עוד שנה.** הקמת אוכלוסיית F2: נטיעה של שתילי האוכלוסייה: **בוצע, קיימים כ 300 שתילים של צמחי F2.** סיום קביעת גנוטיפ מאגר גנטי והמשך קביעת גנוטיפ אוכלוסיית F1 ואוכלוסיית F2: **סריקה גנוטיפית מקיפה לאוכלוסיות F1 ו F2 תתבצע בתחילת שנת 2022.** בהתאם לזאת סעיפים 5 ו 7 יבוצעו בהמשך. חיפוש תאחיזה בין סמנים גנטיים לעמידות לצרעה על בסיס הממצאים מאוכלוסיית F1 ואוסף גנטי: **בוצע, סמנים שנמצאו בתאחיזה באוסף נסרקו באוכלוסיית F1, אבל לא נמצאה תאחיזה לרגישות לצרעה.** איפיון הפרטים באוכלוסיית F1: **בוצע בצמחי המקור ללא ניעור.**

5. **מהן המסקנות המדעיות ומהן ההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו בעתיד?**

תוצאות עיקריות של השנה השלישית: 1. הרחבת אוכלוסיית F2 במאות שתילים 2. אפיון השונות במכלואי F1 ברגישות לצרעה 3. מציאת מכלואי F1 עם רגישות נמוכה לצרעה 4. עץ 'מתן' עם מקטע של 'שניר' פחות רגיש לצרעה. אנו אופטימיים שמיפוי תכונת העמידות לצרעה לקראת השלמה.

6. **מהן הבעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה ומה אמורה להיות ההתייחסות בהמשך**

יש להשלים את המיפוי הגנטי. יש להשלים את איפיון הורשת העמידות בפרטים החדשים של האוכלוסייה. איפיון הרגישות באוכלוסיית F2 יאפשר חיפוש סמנים איכותיים לתכונה.

7. הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב, פטנטים, הרצאות וימי עיון (ציטוט

ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מדעי). חלק מהידע פורסם כבר במאמרים ובעבודת התזה של אורי

אייזנברך. דיווח מיוחד ימסר בתחילת 2022 ביום עיון שנתי של ענף השקד

8. פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח:

* ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) * חסוי – לא לפרסום (לצורך מכתב הסבר).