דו"ח לתכנית מחקר מספר **261-0780-12**

איתור מוטציות לפרתנוקרפיה דומיננטית בעגבניה

Induction and selection of dominant mutations for parthenocarpy in tomato

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ולמועצת הצמחים ע"י:

רבקה ברג- המכון למדעי הצמח, מכון וולקני, מינהל המחקר החקלאי
יחיעם זלץ - המכון למדעי הצמח, מכון וולקני, מינהל המחקר החקלאי
אילן פארן – המכון למדעי הצמח, מכון וולקני, מינהל המחקר החקלאי
שרה שבתאי – המכון למדעי הצמח, מכון וולקני, מינהל המחקר החקלאי
ילנה בורובסקי- המכון למדעי הצמח, מכון וולקני, מינהל המחקר החקלאי

Rivka Barg- Inst. Plant Sciences, Volcani center, ARO. – rivkab@volcani.agri.gov.il
Yehiam Salts - Inst. Plant Sciences, Volcani center, ARO – ysalts@ volcani.agri.gov.il
Ilan Paran - Inst. Plant Sciences, Volcani center, ARO - iparan@volcani.agri.gov.il
Sara Shabtai - Inst. Plant Sciences, Volcani center, ARO - saras@volcani.agri.gov.il
Yelena Borovsky - Inst. Plant Sciences, Volcani center, ARO. borovsky@volcani.agri.gov.il

תקציר:

הצגת הבעיה: פרתנוקרפיה מהווה פיתרון מועדף ליצירת פירות בעגבניה בתנאי סביבה המונעים הפריה. הבעיה היא שהמקורות הגנטיים הקיימים לוקים במגבלות המונעות את שילובם בזני עילית של עגבניות, בעיקר מכיוון שהם נשלטים ע"י מערכות גנים רצסיביים. **מטרת העבודה** להשרות מוטציות בקו עגבניה הטרוזיגוטי לגן גרעיני לעקרות זכרית באמצעות הקרנת האבקה, ולערוך סלקציה של קוים פרתנוקרפיים מבין הצמחים העקרים זכרית, בדור M_0 כלומר לסרוק למוטציות דומיננטיות. **שיטות העבודה**: הקרנת אבקה של קו העכבניה 244N שנושא גן לעקרות זכרית גנית ובקרבתו גן סמן מורפולוגי של תת-פסיג ירוק, האבקת צמחים עקרים של אותו זן באבקה מוקרנת, ואיתור צמחים חונטים מבין הצמחים העקרים. **התוצאות העיקריות:** לאחר שנקבע שהקרנת אבקה בקרינת גאמה במנה של 10Gy גורמת נזק מינימאלי לשיעור חנטת הזרעים, במשך שנתיים הוכנו זרעים מהפריה באבקה מוקרנת במנה זו. בשנה הראשונה נבחנו בשדה כ- 3400 צמחים, ומתוכם נבחרו שני חשודים. לגבי אחד מהם לא הוכחה תורשתיות התכונה, והצאצאים של השני עדין בבדיקה. בשנה השניה נסרקה אוכלוסיה של כ- 6000 צמחים. מתוכם הוכחה, עד עתה, תורשתיות התכונה בצמח אחד. בנוסף, מהצמחים הפוריים שמוצאם מההקרנה נאספו זרעים שיהוו אוכלוסיית מוטגנאזה חדשה בעגבניה. **מסקנות** הראנו שהגישה המוצעת להשראה וזיהוי של מוטציות דומיננטיות באמצעות הקרנה במנה נמוכה, אכן הניבה מוטנטים מהסוג המבוקש. עתה יש לקדם את איפיון ומיפוי המוטציות החדשות.

יוני 2013

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: /לא מחק את המיותר *

חתימת החוקר _ _ *

דוח המחקר –מסכם

מבוא

פרתנוקרפיה מהווה פיתרון מועדף ליצירת פירות בעגבניה בתנאי סביבה הפוגמים ביצור אבקה ובהפריה. הבעיה היא שהמקורות הגנטיים הקיימים לוקים במגבלות המונעות את שילובם בזני עילית של עגבניות, בעיקר מכיוון שהם נשלטים ע"י מערכות גנים רצסיביים שביטויים מושפע מתנאי הסביבה והרקע הגנטי. הפתרון המועדף הוא איתור גנים צמחיים דומיננטיים העשויים להשרות חנטה פרתנוקרפית אלא שכיום לא מוכרים מוטנטים כאלו. בעגבניה מעוניינים במוטציות שישרו פרתנוקרפיה פקולטטיבית כך שיתאפשר ריבוי של הזנים מזרעים, אולם זיהוי וודאי של מוטציות כאלו קשה משום שהוא מחייב סלקציה בתנאים שמונעים באופן מוחלט חנטת פירות נושאי זרעים. בתוכנית המחקר הזו נעשה ניסיון ליצור מוטציות דומיננטיות ע:י הקרנת אבקה של קו הטרוזיגוטי לעקרותזכאיתגניתהמלווה בסמן מורפולוגי בשלב הנבט, וחיפוש מוטנטים לפרתנוקרפיה מבין הצאצאים שיתפתחו מזרעים שיתפתחו מהאבקת ההורה העקר הזכרי באבקה המוקרנת.

מטרת תוכנית המחקר

1. להשרות מוטציות בקו עגבניה הטרוזיגוטי לגן גרעיני לעקרות זכרית באמצעות הקרנת האבקה.
2. לערוך סלקציה של קוים פרתנוקרפיים מבין הצמחים העקרים זכרית.

פירוט עיקרי הניסויים שבוצעו וכלל התוצאות שהתקבלו לתקופת הדוח (דוח מסכם)

1. כיול רמת ההקרנה של האבקה: (פורט בדוח לשנה ראשונה): מראש הכוונה היתה לחפש מוטנטים מתוך אוכלוסיה שתוקרן במנה מינימאלית כדי לצמצם ככל הניתן את שיעור היווצרות חסרים גדולים שהשפעתם תהיה לטאלית**.** כדי לכייל את מנת ההקרנה, נעשתה סדרת ניסויי הקרנות בקרינת גאמה של אבקה (=גמטות זכריות) שנאספה מצמחי עגבניה הטרוזיגוטים לגן לעקרות זכרית (*MS26/ms26*), שבהם האלל לעקרות (*ms26*) מלווה בסמן מורפולוגי סמוך (במרחק של- 3CM בלבד) לחוסר אנטוציאנין (*aw*). האבקה המוקרנת שימשה להפריית צמחים עקריים זכריים (*ms26aw/ms26aw*) מאותו מקור גנטי, הכוונה היא שזרעים שיתקבלו מהפריה באבקה מוקרנת יזרעו במגשי חישתיל. על-פי צבע תת-הפסיג יזוהו בקלות הצמחים העקרים הזכריים (בשיעור צפוי של 50%) כבר כשתילים צעירים, ורק צמחים אלו יועברו לגידול לשם סלקציה בשדה**.** בניגוד למדווח בספרות לגבי מינון הקרנת אבקה של זני עגבניות אחרים נמצא שהזן הזה רגיש במיוחד, ונמצא שיש לרדת למנה של 10Gy כדי לקבל לשיעור גבוה של זרעים בפירות שנוצרו מאבקה מוקרנת (תמונה 1). אף שבמנה זו כבר נראו הרבה עוברים מופלים (זרעים זעירים, טבלה 1) לעומת זאת, ושוב בניגוד למדווח בספרות, שיעור זה של הקרנה (10Gy) גרם ללא יותר מ-10% ירידה בשיעור נביטת הזרעים שמוצאם בזרעים בעלי משקל ומופע תקינים בהפריה באבקה מוקרנת (טבלה 2). מנה זו נבחרה כמנת ההקרנה עקרים זכריים הראשונה..

2. הכנה איפיון וסריקה של אוכלוסיית המוטגנאזה הראשונה: ב-1 ביולי 2011 נזרעו במגשי חישתיל בזריעה ידנית כ- 11000 זרעים שמוצאם באבקה מוקרנת. כעבור כארבע שבועות (ב-27/7/11) ניסרקו המגשים והשתילים הופרדו למגשים נפרדים עפ"י צבע ההיפוקוטיל (אדום -סמן לפורה זכרי, וירוק- עקר זכרי). סה"כ גם בניסוי הגדול הערכה היתה שכ- 10% מבארות הזריעה היו

ריקות. להפתעתנו שיעור הנבטים בעלי ההיפוקוטיל הירוק היה הרבה פחות מהצפוי סה"כ כ- 3400 נבטים, בעוד שציפינו ל-50% עקרים (כלומר קרוב ל- 5000 שתיל). ב- 1 באוגוסט נשתלו הצמחים בשדה בשטח של 4 דונם במושב בית עזרא. כאשר הפוריים והעקרים נשתלו בשורות נפרדות. (+ צמחי ביקורת פוריים ועקרים מאותו הזן). המחשבה הייתה שבתנאי חום קשים אולי נצליח לזהות מוטנטים לחנטה פרתנוקרפית גם ע"ג הצמחים הפוריים אם החום יפגע בהתפתחות האבקה

סריקת השדה לזיהוי חנטה פרתנוקרפית בשנת 2011

במהלך החודשים אוגוסט-ספטמבר נסרק השדה מספר פעמים. מכיון שהצמחים שלא חנטו פיתחו מהר נוף מאד סבוך, חששנו שאנו לא מבחינים בצמחים בודדים שכן חונטים. כדי ליעל את אמינות הסריקה בתאריך הסריקה האחרון (25-26/8/2011) כל הצמחים העקרים (כ- 3400 שתילים), נעקרו ונבחנו אחד-אחד לחנטה. מכ- 20 צמחים עקרים שנשאו יותר מפרי אחד ביותר מקומה אחת נלקחו יחורים מהשדה והובאו למרכז וולקני למטרות ריבוי והאבקה לבחינת הפנוטיפ בצאצאים. מתוך אוכלוסיה זו שני צמחים המשיכו לחנוט פירות פרתנוקרפיים מהפרחים שהתפתחו ע"ג היחורים. צמח אחד שכונה YC נראה מבטיח מאד (תמונה 1 מצורפת) . הבעיה היתה שהצמח היה נגוע בצהבון אמיר (ראה התיחסות בהמשך לבעיה זו). הוכנו ממנו יחורים וכל הפירות שהתפתחו על היחורים היו פרתנוקרפיים. המבנה של נוף הצמח גם הוא השתנה ביחס לקו המוצא, ומזכיר מאד טיפוס שמגיב ביתר או "רואה" יותר ג'יברלין באופן קונסטיטוטיבי (תמונה 3). מכיון שהצמח עקר לא ניתן להצילו באמצעות איסוף אבקה שלו. פרחים שנראו נורמאלים האבקנו באבקה של M82 , אלא שכל הפירות שהתפתחו היו פרתנוקרפיים לחלוטין. זאת אף שניסינו להאביק פרחים בשלבי פתיחה שונים (כלומר לפני, בזמן, ולאחר אנטזיס), סה"כ למעלה מ-30 פרחים. עם הזדקנות היחורים ניסינו לשמר את הגנוטיפ ע"י העברה לריבוי בתרבית. רוב החומר היה מזוהם, אך לבסוף הצלחנו לייצב צמח אחד מהתרבית שהועבר לחממה להמשך גידול. במהלך השנה האחרונה נעשה מאמץ להפרות פרחים שלו באבקה מצמח הטרוזיגוטי מאותו הזן. הפירות שהתפתחו הן הפרתנוקרפיים ובמיוחד אלו שהכילו זרעים (בעיקבות ההפריה) היו בעלי מופע דמויי בקבוק (תמונה 4). הפירות המואבקים הכילו מספר נמוך מאד של זרעים, אבל בסופו של דבר נאספו כ- 100 זרעים מכל הפירות ביחד. שיעור נביטת הזרעים הללו היה נמוך במיוחד. עתה , במועד הגשת הדוח, גדלים בחממה 15 צמחים שהיו בעלי תת-פסיג ירוק ומתוכם נמצאו שניים פוריים זכרית (למרות שעקרונית היה צפוי שיעור של 1.5% רקומבינציה בלבד). מתוך 13 הצמחים העקרים, רק אחד מהם חנט עד עתה פרי אחד, מכיון שהפרי עדין לא האדים הוא לא נקטף עדין,. כדי לבחון האם הוא אכן פרתנוקרפי (תמונה 4, לוח תחתון). יתר הצמחים העקרים לא חנטו כלל. בחממה גודלו גם 3 צמחים בעלי תת פסיג אדום. אלו, כצפוי, פוריים זכרית ונושאי זרעים. כדי לחלק את הסיכון, זרעים נוספים נזרעו מאוחר יותר ולאחר שישתלו כולם ניתן יהיה לבחון האם המוטציה הזו הורשה לצאצאים.

צמח נוסף (שכונה – Gr-2), חנט מספר פירות פרתוקרפיים בשדה, והמשיך לחנוט פירות פרתנוקרפיים על גבי היחורים שגודלו במרכז וולקני. צמח זה היה בעל מופע וגטטיבי שאינו שונה מזה של זן המוצא, וגם הפירות נראו דומים לפירות נושאי זרעים של זן המוצא. גם פה רוב הפירות שהתפתחו מפרחים מופרים (באבקה של M82) לא נשאו כלל זרעים או נשאו מעט מאד זרעים. חלקם הונבטו בתערובת קרקע, אך אף אחד מהם לא נבט. אחרים הונבטו ע"ג נייר סינון רטוב, גם פה

הנביטה היתה מועטה ורובם הזדהמו. צאצא אחד גדל עכשיו בחממה. הוא כמובן פורה, ולא נראה שיש לו נטיה לחנטה פרתנוקרפית (לכל היותר היה סיכוי של 50% שהצאצא ירש אלל למוטציה דומיננטית לפרתנוקפיה). לאחר "דעיכה" של היחורים שהוכנו מהצמח שהובא מהשדה , הצלחנו לייצב בהמשך יחורים נוספים בעלי און צימוח טוב למדי. פרחים שהתפתחו על יחורים אלו הואבקו, אולם עד עתה אף אחד מהצאצאים לא נמצא פרתנוקרפי.

בסיכום, מסריקה של כ- 3400 צמחים, שניים הראו פנוטיפ ברור לפרתנוקרפיה שזה שיעור לא מבוטל (של 0.06%). כאמור נשתלו בשדה גם צמחים פוריים. בסריקה בראשית עונת הצימוח לא זיהינו צמחים חונטים. בהמשך, כל הפירות שבדקנו חנטו כתוצאה מהאבקה שכן הם נשאו זרעים. יש לזכור שהקיץ של שנת 2011 היה מתון יחסית, כך שרק הצמחים העקרים היו באמת אינפורמטיביים. בעיה חמורה שהתגלתה היתה הינגעות קשה בצהבון האמיר כבר שבועות ספורים לאחר השתילה בשדה, וזאת למרות משטר ריסוסים מאד אינטנסיבי כנגד כנימת עש הטבק, (הנשא של הוירוס). יש לזכור שהזן ניבחר לניסוי משום שהוא מכיל סמן צבע בקרבת הגן לעקרות (אכן מצאנו כצפוי שכ- 1.5% מהצמחים הירוקים הין פוריים כתוצאה מרקומבינציה ונשאו פירות בעלי זרעים). אולם בהיותו זן ותיק הוא אינו נושא כל גנים לסבילות לצהבון האמיר.

הערכת שיעור מוטציות באוכלוסיה שהוקרנה במנה של 10Gy: באיפיון חזותי (ויזואלי) של הצמחונים במשתלה בזמן ההפרדה בין הירוקים לאדומים הופרדו גם נבטים בעלי מופע לא תקין. צמחונים אלו הובאו למעבדה להמשך איפיון לזיהוי מועמדים בעלי פנוטיפים מעניינים אחרים, וביניהם צמחונים קטנים באופן מיוחד. מתוכם חיפשנו כאלו שאינם מגיבים לג'יברלין. לאחר ריסוס ב- GA3 (100 μM), רובם המכריע התארכו, ורק-7 כמעט ולא הגיבו . מביניהם, שלושה שרדו, הם הואבקו עם אבקה של זן M82 והתקבלו מספר זרעים. כך שנוכל לבדוק בדור הבא האם התכונה הורשה, ואם כן האם כתכונה דומיננטית. אלו הם מועמדים לבחינת מוטציות בגנים המתווכים את התגובה להורמון, למשל, בגן המקדד לחלבון הבקרה DELLA , או לקולטן GID1. כמו-כן זוהו שלושה צמחים בעלי ארכיטקטורת נוף שונה, שהתבטאה בסיעוף יתר של הנוף. מתוכם שניים שרדו והואבקו באופן דומה, ומהם יש לנו זרעים שיאפשרו לברר אם זיהינו מוטנטים חדשים לסיעוף יתר, תכונה מבוקשת בעיקר בזנים מורכבים. היה שיעור גבוה יחסית (קרוב ל-80) של נבטים בעלי מריסטמה קודקודית פגומה (נבטים בעלי פסיגים שלא פיתחו עלים אמיתיים), וכן נמצא צמח כלורוטי אחד שלא שרד. במהלך השתילה בשדה נפסלו עוד כ 50 צמחים שנראו קטנים מיתר הצמחים, כולם התארכו בתגובה לטיפול בג'יברלין. בהערכה זהירה כ- 0.6% מהצמחונים נראו בעלי פנוטיפ שונה משל כלל האוכלוסיה כבר בשלב הנבט. גם בהנחה מחמירה שרק 10% מתוכם מיצגים מוטציות ולא שונות פיזיולוגית, הרי שמדובר בשיעור של כ- 0.06%, ולאור העובדה שזוהו שני טיפוסים שחנטו פרתנוקרפית, כבר מתוך אוכלוסיה זו, נראה שמשטר ההקרנה מתאים, ועל כן הוכנה במהלך השנה האחרונה אוכלוסית זרעים נוספת באמצעות הקרנה באותה מנה. שני שיקולים נוספים הכריעו נגד הגדלת מנת הקרינה. האחד, שמצאנו שמנה של 20Gy פגעה מאד בשיעור ההתפתחות של זרעים חיוניים במשקל נורמאלי לזן (טבלה 1) , והשני, שבניגוד למנת קרינה גבוהה שידוע שמשרה חסרים גדולים, במנת קרינה נמוכה,

קיים סיכוי יותר גבוה שלא יושרו חסרים גדולים, אלא שהמוטציות ינבעו מטעויות וחסרים זעירים שיווצרו בזמן תיקון שברי DNA שמשרה ההקרנה, וזהו סוג המוטציות בו אנו מעוניינים.

הכנת אוכלוסיית מוטגנאזה שניה: .לאור שכיחות הפנוטיפים החשודים כמוטנטיים מתוך סריקת האוכלוסיה שהוכנה ונסרקה במחזור הראשון (בקיץ 2011) , הוחלט שהמחזור הבא של מוטגנאזה יערך באותו משטר הקרנה. ובהמשך במהלך שנת המחקר הוכן באופן דומה מחזור נוסף של כ-18,000 זרעים שנאספו עד לקיץ 2012. בעיה חמורה שהתגלתה בזמן סריקת האוכלוסיה שגודלה בשדה בקיץ 2011 היתה הינגעות קשה בצהבון האמיר כבר שבועות ספורים לאחר השתילה בשדה, וזאת למרות משטר ריסוסים מאד אינטנסיבי כנגד כנימת עש הטבק (הנשא של הוירוס). יש לזכור שהזן N-244 ניבחר לניסוי משום שהוא מכיל סמן צבע בקרבת הגן לעקרות (אכן מצאנו כצפוי שכ-1.5% מהצמחים הירוקים הין פוריים כתוצאה מרקומבינציה ונשאו פירות בעלי זרעים). אולם בהיותו זן ותיק הוא אינו נושא כל גנים לסבילות לצהבון האמיר. לאור בעיית הנגיעות הקשה בוירוס, הוחלט שמחזור הסריקה הבא יבוצע על צמחים בגידול בבית רשת.

סריקת אוכלוסיה שגודלה בית רשת לזיהוי חנטה פרתנוקרפית - מחזור שני קיץ 2012

האוכלוסיה הנוספת שהוכנה נזרעה במגשי חישתיל בתאריך 18-19/6/2012. בדיקת חיוניות הצביעה על כ- 90% נביטה (אבל נביטה נמוכה משמעותית של העקרים/ תת-פסיג ירוק). הצמחים מוינו (7-8/7/2012) והופרדו למגשי שתילה נפרדים על-פי צבע תת-הפסיג (ירוק-עקרים / אדום-פוריים). זוהו והופרדו צמחים בעלי פנוטיפ פגום : חסרי קודקוד צמיחה, בעלי ארכיטקטורת צמח שונה/ ננסיים/ כלורוטיים. חלקם הובאו למכון וולקני לבחירת פנוטיפים מעניינים ע"י קבוצות מחקר נוספות. טבלה 3 מסכמת את ממצאי מיון הנבטים במגשי השתילה, ובתמונה 5 מוצגות דוגמאות של נבטים עם עיוותים התפתחותיים שנגרמו ככל הנראה כתוצאה ממוטציות שהושרו ע"י הקרנת האבקה במנה של 10 Gy. כאמור, התופעה של שיעור נמוך מהצפוי של צאצאים עקרים זכריים (תת פסיג ירוק) נצפתה גם במחזור שתילה זה.

כ- 6150 שתילים בעלי תת- פסיג ירוק (לגביהם קיים סיכוי של 98.5% שהם עקרים זכריים) נשתלו ב- 12/7/2012 בבית רשת (50 מש) בבית עזרא בשטח של כ-2 דונם. הצמחים בעלי תת-הפסיג האדום (פוריים זכריים) נשלחו לשתילה ברמת הנגב בעזרת צוות המחקר של ד"ר ארי שפר, נאסף פרי בודד לצמח מתוך כ-4000 מהשתילים שגדלו ברמת נגב, מכל פרי בנפרד הופקו ונאספו זרעים (בנוסף לבדיקת pH ותכולת מוצקים מסיסים בכ"א מהפירות– שמוטציות לתכונות אלו מעניינות את קבוצת המחקר שלו) . זרעים אלו מהווים אוכלוסיית מוטגנאזה חדשה שתוכל להיסרק בהמשך לתכונות רצויות ונוספות.

סריקת בית הרשת לזיהוי חנטה בחום נעשתה במהלך חדש ספטמבר 9-11/9/2012. מכיון שהצמחים יצרו נוף סבוך, כזה שלא איפשר להבחין ביניהם, במהלך שלושת ימי הסריקה כל אחד מהצמחים נעקר, הופרד משכניו ונבדק לנשיאת פרי (מעבר לתפרחת ראשונה) ולעקרות זכרית (תמונה 6). כצפוי נמצאו צמחים שחנטו פירות כיון שלא היו עקרים זכריים (שהם תוצרי רקומבינציה בין הסמן והגן לעקרות) (תמונה 7). אבל נמצאו גם שישה צמחים שחנטו מספר פירות אף שהיו

עקרים זכריים, אלו הם החשודים כמוטנטים לפרתנוקרפיה דומיננטית. שישה הצמחים הללו הובאו למרכז וולקני, צולמו ותועדו מבנה נוף הצמח,עקרות הפרחים, וכן צולמו ותועדו מספר הפירות, והמבנה הפנימי שלהם (תמונות 8,9). מכל אחד מששת מהצמחים החשודים יוצרו מספר ייחורים. שניים מתוכם המשיכו לחנוט פרתנוקרפית ע"ג היחורים (מספר 1 ו-8). בהמשך הסתבר שצמח שהובא עבור קבוצת מחקר אחרת, ושנבחר בגלל מיעוט הסתעפות של הנוף, חונט פרתנוקרפית. כך שבסה"כ נמצאו 7 צמחים חשודים, ושלושה מביניהם המשיכו לחנוט פירות פרתנוקרפיים ע"ג היחורים.

לצערנו, הצלחנו לקבל זרעים רק מהפריית הצמח Gr 1208 באבקת ההורה ההטרוזיגוטי לעקרות זכרית (N244). (יחורי יתר הצמחים אבדו בגלל מחלות לפני שהצלחנו לקבל פירות מהפרחים המופרים). הזרעים הראשונים שהונבטו מהפריה זו התפתחו לצמחים שגדלים עכשיו בחממה בבית דגן. מדובר ב- 7 צמחים בעלי תת-פסיג ירוק ו-3 בעלי תת-פסיג אדום. אחד מהירוקים הוא פורה זכרי, לאחד אחר אין פירות כלל ולחמשת הצמחים העקרים הנוספים (1,3,5,6,7) יש מעט פירות והם פרתנוקרפיים (תמונה 10) . העובדה שנמצאו במכלוא (F1) צאצאים פרנוקרפיים מאששת הורשת תכונה דומיננטית. בינתיים הונבטו זרעים נוספים, שיבחנו באופן דומה, ובצמחים הפוריים זכריית יסורסו פרחים כדי לבחון האם מי מהם נושא גם הוא את המוטציה לחנטה פרתנוקרפית.

דיון , מסקנות והמלצות: קבלת צאצאים פרתנוקרפיים מהצמח Gr 1208 מעודדת ביותר גם אם הפנוטיפ של פירות הצמח Gr 1208 וצאצאיו אינו מזהיר. אבל הצלחנו להוכיח שניתן להשרות באמצעות הקרנת אבקה טיפוסים פרתנוקרפיים, ושעל רקע של עקרות זכרית אפשר לזהות מוטנטים כבר בדור הראשון ושהתכונה הדומיננטית עשויה להיות מורשת. השלב הבא יהיה העברת המוטציה לרקע גנטי מתקדם ומיפוי וזיהוי הגן המוטנטי האחראי לתכונה באמצעות HTS . אנו עדין ממחכים לגידול יתר צאצאי המכלוא עם הצמח YC שעשוי להיות מקור מענין נוסף, במידה ונמצא צאצאים שמראים את התכונה.

מבחינת הערכת שכיחות המוטציות, בהערכה מחמירה , לפחות הצמחים Gr1201 & Gr1208 הראו מופע פרתנוקרפי ברור גם ע"ג היחורים, ולגבי הצמח Gr1208 הראנו גם הורשה של התכונה. מדובר אם כן, בהערכה זהירה, במציאת שני מוטנטים מבטיחים מתוך כ- 6000 צמחים שנסרקו בקיץ 2012 דהיינו 0.033% , שהוא שיעור כלל לא מבוטל.

לדעתנו אחת המסקנות וההמלצה שעולה ממחקר זה שתוכניות להשראת מוטציות חדשות לגבי כל תכונה שהיא עדיף שיעשו באמצעות טיפול מוטגנאזה מתון ככל האפשר. זיהוי טיפוסים בעלי ארכיטקטורת צמח שונה, (מסתעפים ביתר או בעלי דיכוי הסתעפות) או בעלי תגובה שונה לג'יברלין כפי שזוהו במסגרת מחקר זה, ויצירת אוכלוסיית המוטגנאזה מהצמחים הפוריים כל אלו יהוו תשתית וחומר מוצא מעניין למגוון מחקרים ותוכניות השבחה עתידיים בעגבניה.

פירסומים: עדין אין.

טבלה 1: השפעת מנת הקרינה על שיעור העוברים המופלים (= זרעים קטנים).

Irradiation dose (Gy)	# Seeds / Fruit		% aborted
	Normal	Aborted	
0	160	N.D (very few)	-
5	158	N.D (very few)	-
10	100	60	37
20	40	120	75

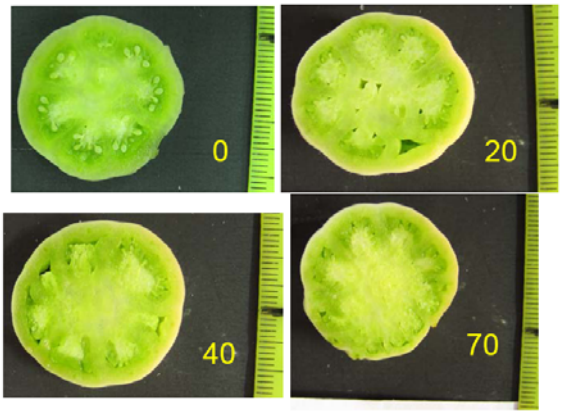
טבלה 2: בחינת השפעת מנת הקרינה על הקצב ושיעור הנביטה. (*) מרמות ההקרנה נזרעו רק זרעים בעלי גודל ומופע תקינים. להערכת ההשפעה על קצב הנביטה, המגשים נספרו בתאריכים (בשנת 2010) המצוינים בטבלה.

Gy	0		5		*10		*20	
date	sum	ratio	sum	ratio	sum	ratio	sum	ratio
29.8	217	0.85	234	0.92	238	0.93	209	0.82
31.8	227	0.89	241	0.95	244	0.95	225	0.88
2.9	233	0.91	243	0.95	247	0.96	229	0.89
6.9	237	0.93	245	0.96	249	0.97	230	0.90
13.9	246	0.96	246	0.96	251	0.98	234	0.91
# sown	256		254		256		256	

טבלה 3: תאור ממצאי מיון הנבטים שהתקבלו מהפריה באבקה מוקרנת . הזרעים נזרעו ידנית זרע בודד לתא, במשתלת "חישתיל". בקיץ 2012

סיכום מיון מגשי השתילה (7-8/7/12) (שיעורי פסילה לשתילה)		
	ירוקים - עקרים זכריים (בית-רשת במושב בית עזרא)	**אדומים - פוריים זכריים שתילה בשדה (מו"פ רמת נגב)**
סה"כ לשתילה בשדה/ בבית הרשת	**36 מגשים (~ 6156 צמחים כולל גמדיים)**	**56 מגשים (~ 9576 צמחים)**
מס' נבטים מעוותים	**224**	**64**
מתוכם חסרי מריסטמה קודקודית	**168**	**30**
% מופע חריג	**0.91%**	**0.36%**

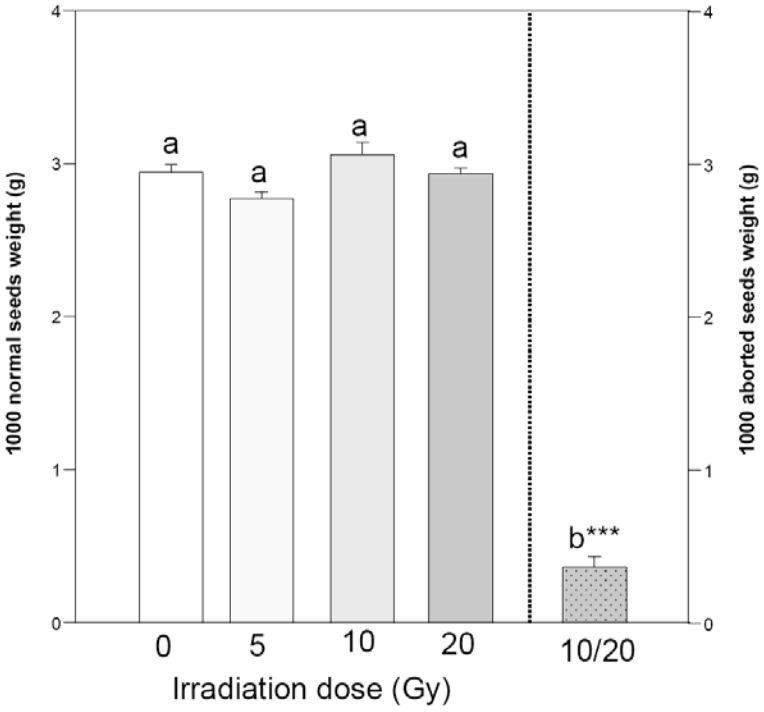
תמונה 1: השפעת רמות הקרנה של האבקה על התפתחות זרעים:



לוח עליון : השפעת רמות קרינה בטווח שבין 20 ו- 70Gy: התמונה צולמה 15 יום לאחר ההפריה. בצילום רואים שכבר ברמה של 20 Gy חלה ירידה חמורה בהתפתחות העוברים בהשוואה להפריה באבקה לא מוקרנת.

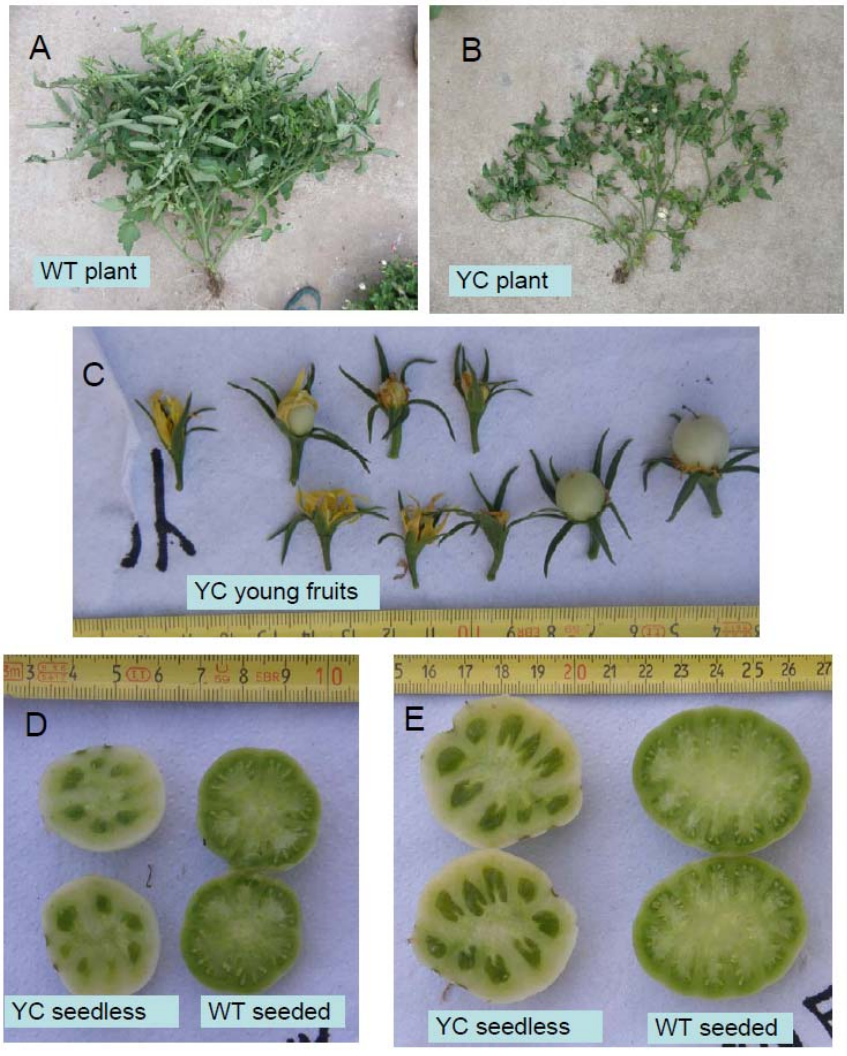
לוח תחתון: השפעות הקרנה ברמות שבין 5 ל- 20Gy על התפתחות הזרעים. במנה הגבוהה ביותר יש ירידה חדה בכמות הזרעים בעלי מופע תקין.
:

תמונה 2: השפעת מנת הקרינה על גודל הזרעים. נקבע בניפרד גודל הזרעים בעלי המופע התקין וגודל הזרעים הקטנים שמיצגים כנראה עוברים מופלים.

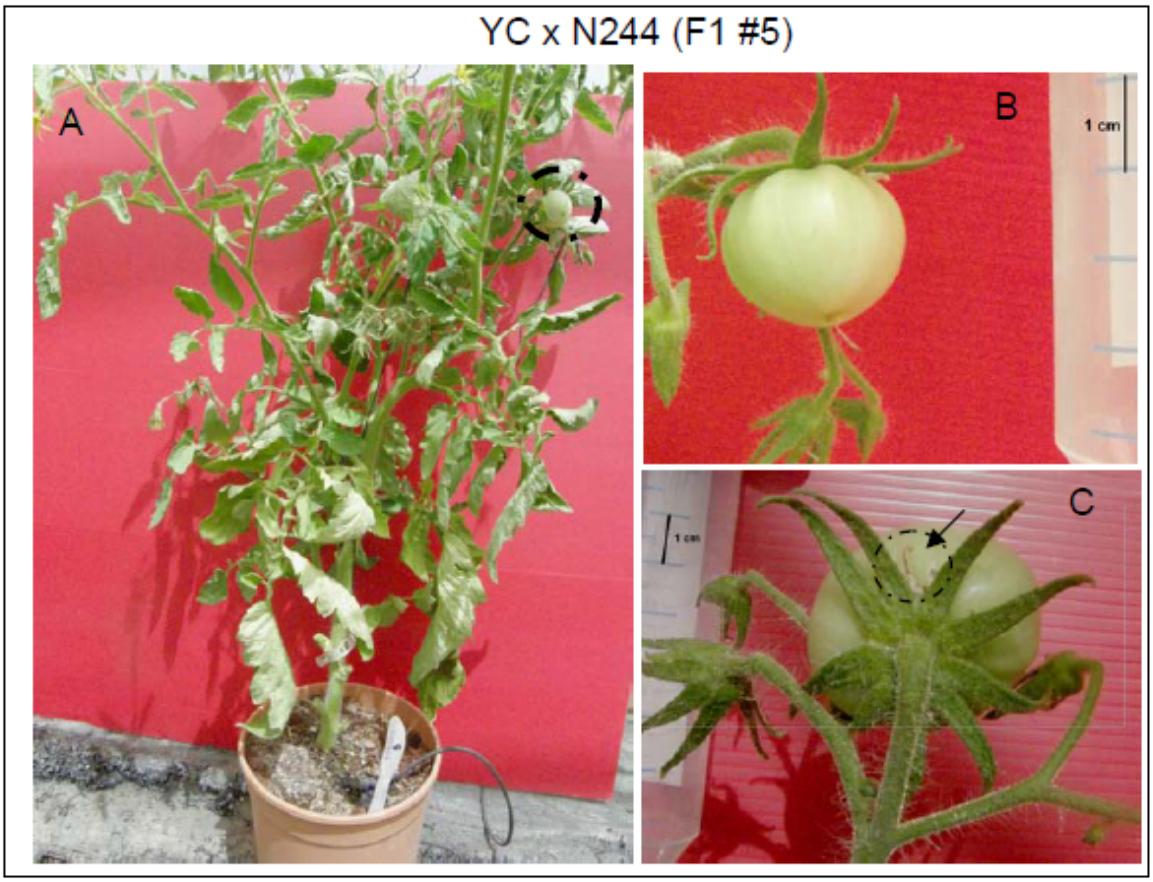


תמונה 3:: המוטנט הפרתנוקרפי YC , זוהה בסריקת השדה בקיץ 2011

A) הנוף של צמח הביקורת מסועף וצפוף, B) בעוד הנוף של המוטנט יותר "פתוח". C) פירות צעירים של YC שומרים את עלי הכותרת כאופייני לפירות פרתנוקרפיים. D, E) השוואת פרי פרתנוקרפי של הצמח YC לפרי בגודל דומה נושא זרעים של קו המוצא. D) פירות בקוטר של כ- 3 ס"מ. E) פירות בקוטר של כ- 4.5 ס"מ. בשני הצילומים הפירות הפרתנוקרפיים "מפצים" על העדר הזרעים בקולומלה יותר גדולה, אך אינם חלולים.



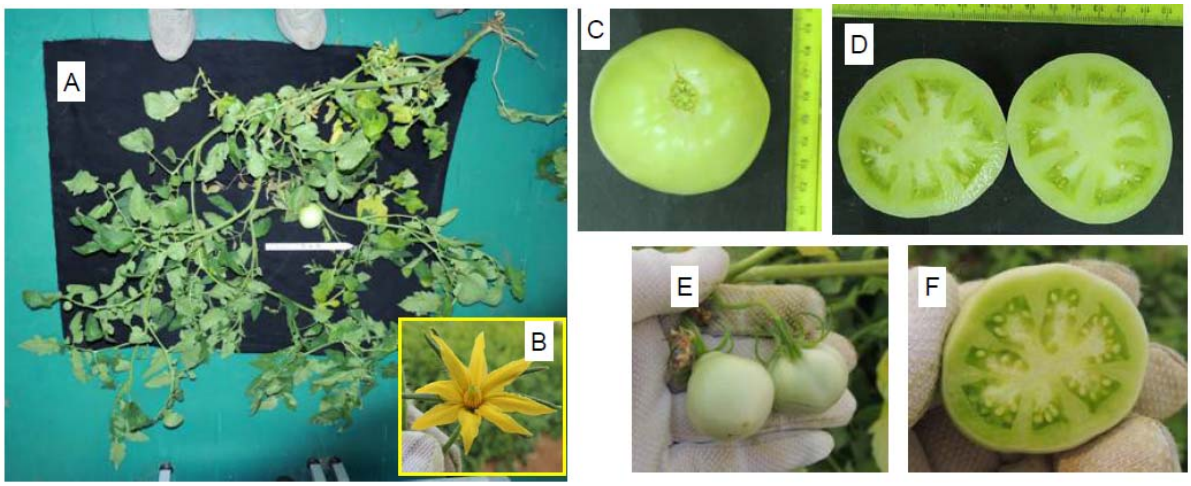
תמונה 4 : הצמח שהתפתח מריבוי בתרבית של רקמה מהצמח YC . הצמח המשיך לשמור על מבנה כמעט לא מסועף, עלים מעוגלים ומופע פרי "בקבוקי:". (צולם בתאריך 12-12-25 בחממה בבית דגן).
לוח תחתון: ע"ג צמח אחד מצמחי המכלוא העקרים (YC x N244,F1 # 5) מתפתח עכשיו פרי , העובדה שעדין נשמרו עלי הכותרת היבשים (מודגש בעיגול וחץ ב- C) אופיינית לפרות פרתנוקרפיים.לצמח עצמו מופע אופייני לקו N244 (A). צולם ב- 13-6-30



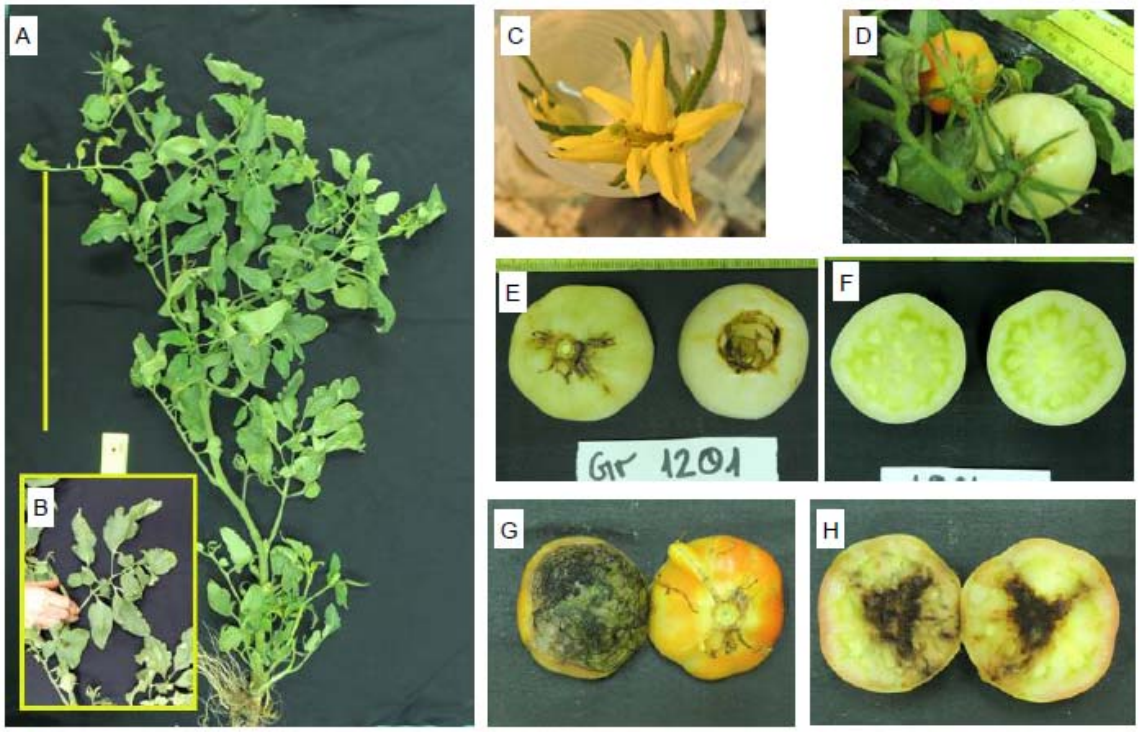
תמונה 5 : נבטים מעוותים שמוינו במשתלה בקיץ 2012. (A מגש עם צמחונים מעוותים. (B-F) צילומי תקריב של נבטים מעוותים.

תמונה 6: : מופע הצמחים העקרים הזכריים שגדלו בבית הרשת במושב בית עזרא בקיץ 2012 (לוח עליון) עקירה ובחינת הצמחים העקרים לחנטה פרתנוקרפית (לוח תחתון).:

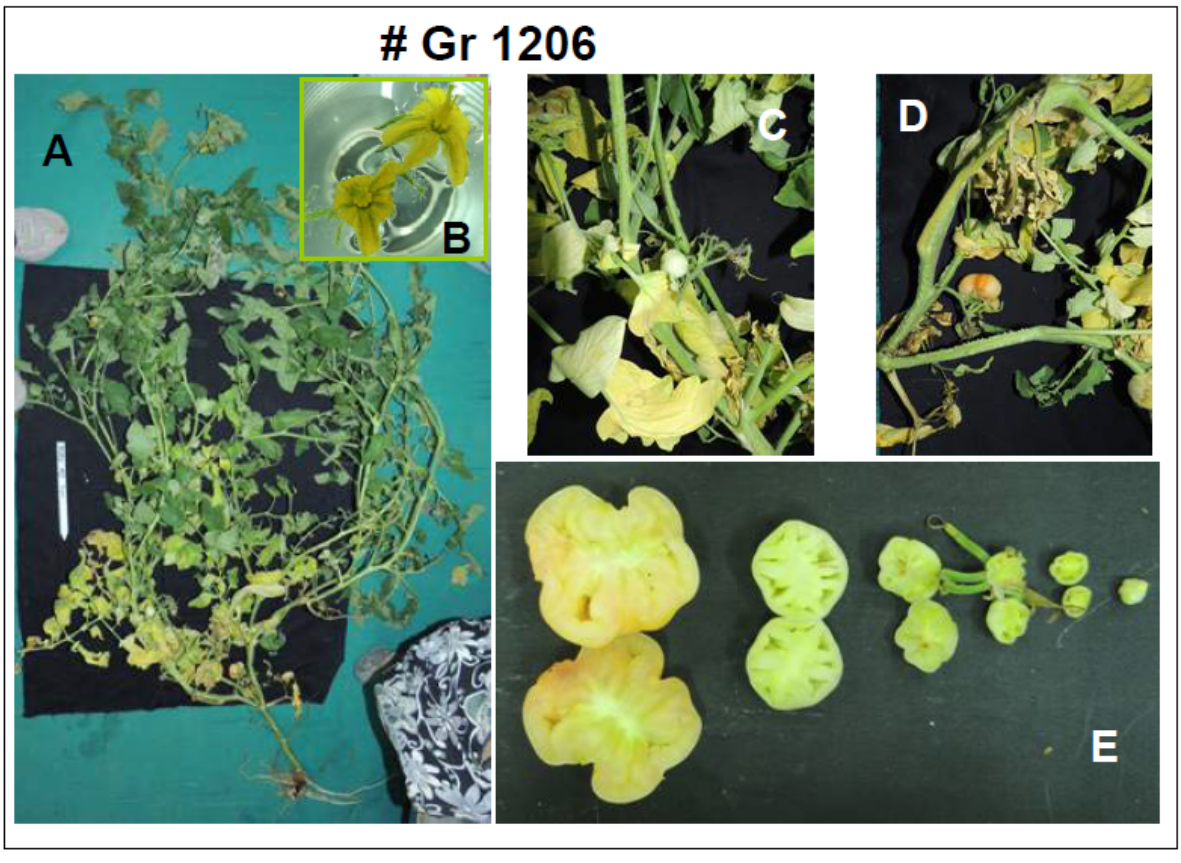
תמונה 7: צמח רקומביננטי (תת פסיג ירוק –פורה זכרית) חנט פרי נושא זרעים בית הרשת בקיץ 2012: (A) צמח נושא שלושה פירות. (B) הפרח פורה זכרי. (D-C) ו- (E-F)-פירות שנחתכו ונמצאו נושאי זרעים.



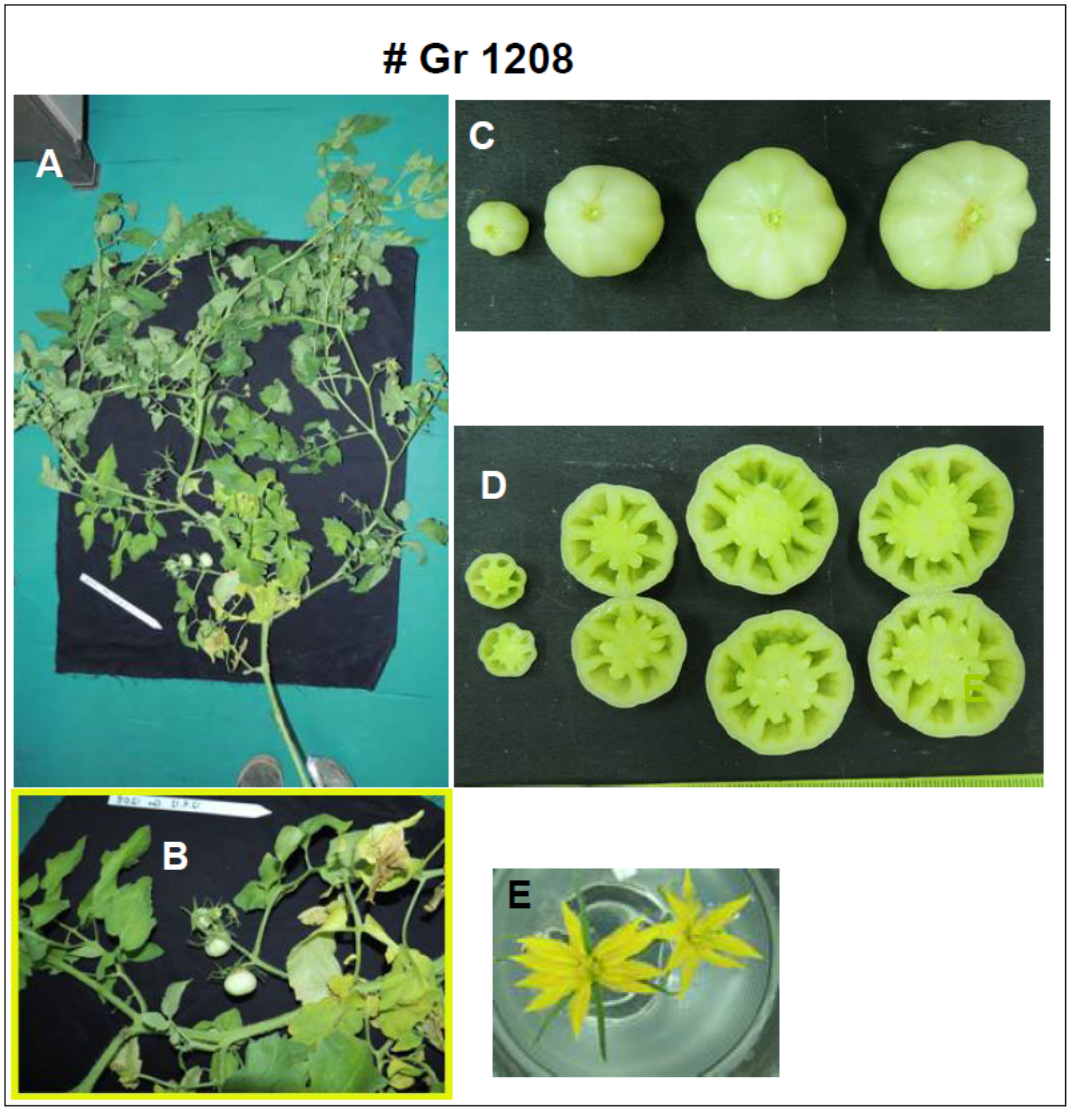
תמונה 8: צמח Gr-1201 נושא פירות חסרי זרעים. (A) הצמח כולו- מופע דומה במקצת ל- GA-constitutive . (B) העלים מעוגלים מאשר בקו המוצא. (C) הפרחים עקרים זכריים). D) פירות ע"ג הצמח. (E-F) ו H-G פירות פרתנוקרפים עם פיטם מצולק בדומה לזה של פירות המושרים ע"י טיפול בג'יברלין. לוח תחתון: יחורים נושאי פירות בבית רשת במרכז וולקני. היחורים התמוטטו ממחלות לפני שהצלחנו לאסוף זרעים משני הפירות שחנטו לאחר האבקה עם ההורה ההטרוזיגוטי לעקרות זכרית.



תמונה 9: צמחים מספר Gr 1205 , Gr 1206, Gr1207, Gr 1208 שנבחרו בקיץ 2012 כחשודים לפרתנוקרפיה. לגבי כל צמח,מוצגה צמח שנעקר והובא לבית דגן (A) וכן צילום פרחים עקרים, והפירות שעל גביהם. מצמחים אלו הוכנו יחורים שהושרשו בבית רשת בבית דגן. .



A
B
Gr 1207
C
D
E


Gr 1208
A
C
D
B
E

תמונה 10 : פירות פרתנוקרפיים שהתפתחו על צמחי מכלוא של Gr1208 X N244 (MS/ms)
(צולמו ב 30-6-13).

סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס לכל השאלות בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).

שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.

הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
1. להשרות מוטציות בקו עגבניה הטרוזיגוטי לגן גרעיני לעקרות זכרית באמצעות הקרנת האבקה. 2. לערוך סלקציה של קוים פרתנוקרפיים מבין הצמחים העקרים זכרית.
עיקרי התוצאות.
נמצא שאבקה מוקרנת במנה של 10Gy מאפשרת הפריה ויצירת זרעים תוך פגיעה מינימאלית בחיוניות. במהלך סריקת צאצאי ההקרנה במשל שנתיים זוהו מספר צמחים החשודים כמוטנטים דומיננטיים לפרתנוקרפיה. לגבי אחד מהם הוכחה תורשתיות הפנוטיפ לצאצאים. בנוסף הוכנה אוכלוסיית מוטגנאזה חדשה מצאצאי הצמחים הפוריים.
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדו"ח?
הושגו מטרות המחקר במובן שנמצא מוטנט מהסוג שהיתה כוונה לאתר. אבל לא הושלם איפיון מוטנט מבטיחנוסף. כדי ליישם את ממצאי המחקר יהיה צריך לאפיין, למפות ולזהות את המוטציה שנמצאה. במחקר דומה בעתיד, רצוי לגבות את הריבוי של המוטנטים גם בתרבית.
בעיות שנותרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן,
כאמור יש להמשיך באיפיון המוטנטים שנמצאו
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: **פרסומים בכתב** - ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי;
.
פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)
➢ ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)
➢ חסוי – לא לפרסום: **יש לצרף אישור ומידע ממוסד המחקר**
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי -

*יש לענות על שאלה זו רק בדו"ח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדו"ח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש שנים