

דוח לתוכנית מחקר מס' 11-0852-256

חסכון בידיים עובדות בריבוי וגטיבי של ייחורים מצמחי נוי ע"י ייעול השתרשות

Man power saving by improving the efficiency of rooting of cuttings from ornamental Plants
מוגש לקרן המדען הראשי של משרד החקלאות

ע"י

עינת שדות, המחלקה לפרחים וצמחי נוי, המכון למדעי הצמח, מרכז וולקני, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן
מיכל שמיר, המחלקה לפרחים וצמחי נוי, המכון למדעי הצמח, מרכז וולקני, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן
סימה קגן, המחלקה לפרחים וצמחי נוי, המכון למדעי הצמח, מרכז וולקני, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן
יוסי ריוב, למדעי הצמח ע"ש רוברט סמית, הפקולטה לחקלאות, האוניברסיטה העברית בירושלים, רחובות
רון אופיר, המחלקה לעצי פרי. המכון למדעי הצמח, מרכז וולקני, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן
משה ראובני, המחלקה לפרחים וצמחי נוי, המכון למדעי הצמח, מרכז וולקני, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן
אליעזר שפיגל, אגף הפרחים, שרות ההדרכה והמקצוע, משרד החקלאות

Einat Sadot, Ornamental Horticulture, Bet-Dagan POBox 6 50250 vhesadot@agri.gov.il

Michal Shamir, Ornamental Horticulture, Bet-Dagan POBox 6 50250 vhshamir@agri.gov.il

Sima Kagan, Ornamental Horticulture, Bet-Dagan POBox 6 50250 simak@agri.gov.il

Joseph Riov, Faculty of Agriculture, Rehovot 76100. Riov@agri.huji.ac.il

Ron Ophir, Fruit trees, -Dagan POBox 6 50250 ron@agri.gov.il

Moshe Reuveni, Ornamental Horticulture, Bet-Dagan POBox 6 50250 yhmoshe@agri.gov.il

Eliezer Spiegel, extension service, Ministry of Agriculture, elispi@shaham.moag.gov.il

November 2012

כסלו תשע"ג

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.
הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: פ-ך/לא מחק את המיותר*
*חתימת החוקר _____

תקציר

הצגת הבעיה כשר השתרשות נמוך של צמחי נוי מהווה צוואר בקבוק במשתלות עציצים וחומר ריבוי ומצריך כח אדם רב בשלבי הייצור. **מטרות המחקר** של תוכנית זו הן לפתור בעיות ריבוי של צמחי נוי בעלי חשיבות כלכלית על מנת להקטין את כח האדם במשתלות. **שיטות העבודה** בהן אנו נוקטים מתחלקות לשלוש קטגוריות: א. טיפולים מקדימים בצמחי האם על מנת להגדיל אחוזי השתרשות. ב. הצעת צמחי אם וריבוי בתרבות רקמה של צמחים שלא ניתן להשרישם באופן אחר. ג. מחקר מולקולרי מעמיק של המנגנונים העומדים בבסיס התמיינות שורשים אדוונטיבים בצמחים קשי השתרשות על מנת לפתח בעתיד פתרונות ביוטכנולוגיים לעידוד השתרשות בצמחים כאלו. **תוצאות עיקריות:** בתחום הטיפולים בצמחי האם נמצא שגידול צמחי גרווילאה תחת רשתות צבעוניות שיפר את יכול הענפים יחסית לצמחים שגודלו תחת רשת שחורה. בנוגע להטרומליס נמצא שרשת הפנינה הגדילה את יכול הייחורים ואחוזי ההשתרשות שלהם. רשת הפנינה העלתה גם את אחוזי ההשתרשות של ייחורי צמח עלי הדפנה בצורה משמעותית. בתחום הריבוי בתרבות רקמה כוייל פרוטוקול לריבוי איקליפטוס מון לגון וכיול פרוטוקולים למגינית מגוונת ולצמחי וורוניקה נמצא בשלבים מתקדמים. בנושא המחקר המולקולרי נערך ניסוי רב היקף שכלל 32 שבבי דנ"א באמצעותם נבדקו פרופילי ביטוי שונים של גנים מאיקליפטוס גרנדיס, בין ייחורים צעירים, בעלי כושר השתרשות לבוגרים חסרי כושר השתרשות. בשתי הקבוצות הושוו גם ייחורי ביקורת לייחורים שטופלו באוקסין. נמצא שביום השישי לאחר חיתוך הייחורים והטיפול, נראים ההבדלים הגדולים ביותר בביטוי גנים בין דוגמאות הייחורים השונות. הגנים חולקו לקבוצות תיפקוד שונות פרופיל הביטוי של חלקם אושרר באמצעות שיטת ננוסטרינג. עבור מספר גנים בודד cDNA באורך מלא וכן רצף הפרומוטר. כמו כן בודדו הגנים האורטולוגים מארבידופסיס. כרגע נבדקת האפשרות שגנים אלו יכולים לזרז התמיינות שורשים אדוונטיבים (עדיין אין תוצאות). בהמשך לשינוי בביטוי של גנים הקשורים למערכת המיקרוטובולי, נמצא שעירעור עדין של מיקרוטובולי באמצעות אוריזלין תוך כדי טיפול באוקסין משפר השתרשות בייחורי איקליפטוס.

מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות עדין אין

מבוא

בעיית כח אדם בחקלאות לא יורדת מסדר היום הציבורי והלאומי כבר זמן רב. אחד מענפי היצוא היציבים והמצליחים בתחום צמחי הנוי הוא ענף העציצים וחומר הריבוי. ענף זה נשען במידה רבה על יכולתם של צמחי הנוי לפתח שורשים מוספיים מגבעולים. תכונה זו מאפשרת ריבוי קלונלי של תוצרת מצטיינית בצורה אחידה. בזמן שיעילות השתרשות היא תכונה חשובה, ישנם צמחי נוי רבים וחשובים מבחינה כלכלית שהם חסרי תכונה זו. לכן ההתמודדות עם צמחים אלו במשתלות דורשת יותר ידיים עובדות. כל זה מכיוון שאחוז ההשתרשות נמצא בקורלציה הפוכה למספר הייחורים שיש להכין על מנת לעמוד במכסת ייחורים מושרשים. ככל שאחוז ההשתרשות גבוה יש להכין פחות עודף של ייחורים מעל לאלו שהוזמנו. השרשת ייחורים נעשית עבור שני תחומים בענף צמחי הנוי: (א) יצוא של חומר ריבוי ו-(ב) ייצור

שתילים לתחומים שונים של ייצוא צמחי נוי. בתחום הייחורים המושרשים ליצוא ישנה מגמה של הגדלת מספר המינים, וענף העציצים הראה יציבות יתרה בזמן המשבר הכלכלי העולמי והמשבר בענף שנגזר ממנו.

כשר השתרשות מושפע מפרמטרים שונים. לדוגמא: המצב הפיזיולוגי של צמח האם, העונה, הטיפול בייחור, תנאי הלחות והטמפרטורה בזמן ההשרשה ועוד. טיפולי הצללה או אטיולציה ושינוי אורך היום נמצאו כיעילים לשיפור כושר ההשתרשות (1-4). בארץ נעשה שימוש בהצללה של צמחי אם במשתלות העוסקות בצמחים מעוצים. הירידה הדרסטית בעוצמת האור משפיעה על האנטומיה של הייחור: ישנה פחות ליגניפיקציה של דפנות התאים והתפתחות מועטת יחסית של סקלרנכימה ולכן קימת כנראה אפשרות טובה יותר להתפתחות תחיליות של שורשים (5). ישנן גם עדויות לכך שהצללה גורמת לירידה ברמת הציטוקינינים, הנחשבים למעכבי השתרשות (6).

בצמחים מעוצים ידוע שכשר ההשתרשות יורד בצורה דרמטית עם המעבר של הצמח מהשלב הצעיר לבוגר. למעשה, המעבר מהשלב היובנלי לבוגר במעוצים הנו מכריע בקשר לשתי תכונות עיקריות: פריחה והשתרשות. המחקרים בהשרשת ייחורים מצמחים מעוצים בוגרים עדיין לא הניבו פתרונות מספקים. לכן, הבנה מעמיקה של שלבי ההתבגרות במעוצים הינה הכרחית לפיתוח שיטות להצערה ולריבוי וגטטיבי. בספרות מדובר על ארבעה שלבים של התבגרות (7, 8): 1. השלב העוברי; 2. השלב הצעיר (post embryonic; juvenile vegetative phase); 3. השלב הבוגר הוגטטיבי; 4. השלב הבוגר הרפרודוקטיבי. עד כה אופיינו רק מעט מהשינויים הפיזיולוגיים, הביוכימיים והמולקולריים המלווים את המעבר בין השלב היובנלי לבוגר בצמחים מעוצים (7).

הצערה בתרבות רקמה היא אחת השיטות להתגבר על אובדן כשר השתרשות בצמחים מעוצים (9).

מטרות המחקר

מטרת המחקר המקורית היתה מציאת דרכים לחסכון בידיים עובדות בתהליך יצירת ייחורים מושרשים ע"י

שיפור היבטים שונים של ההשתרשות.

מטרות המשנה לטווח הקצר היו:

1. הגדלת מספר ייחורים ליחידת צמח אם ושיפור השתרשותם באמצעות טיפולים בצמחי האם או סלקציות לקלונים בעלי כושר השתרשות גבוה יחסית.
 2. שיפור האחידות ושיעור ההשתרשות באמצעות טיפולים בייחורים עצמם.
- מטרות המשנה לטווח הארוך היו:

1. לימוד המנגנונים המולקולריים המבקרים את ההתמיינות של שורשים אדוונטיבים.
2. פיתוח שיטות ביוטכנולוגיות לעידוד היווצרות שורשים אדוונטיבים בצמחים קשי השתרשות.

בעבודה זו נקטנו במגוון שיטות על מנת להעלות יעילות השרשה בצמחי נוי שונים כדי להפחית את שיעור הידיים העובדות במשתלות.

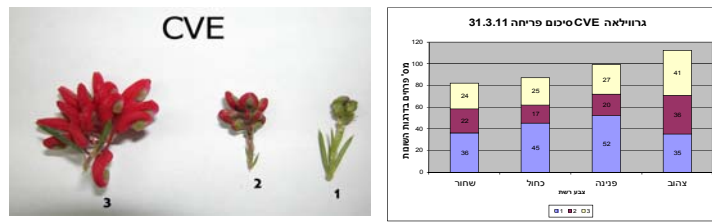
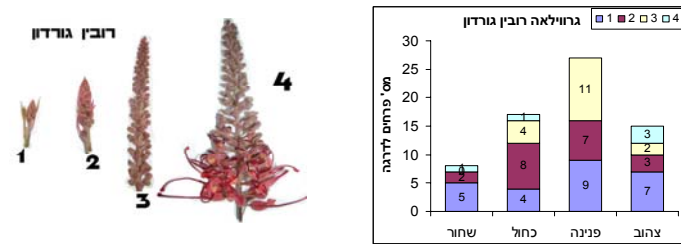
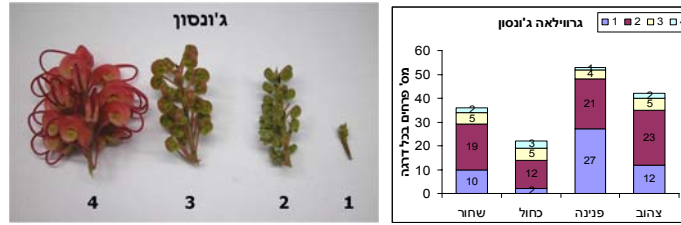
פירוט עיקרי הניסויים

- א. במחקר לבחינת השפעת הצללה של צמחי אם עם רשתות צל צבעוניות התמקדנו במספר גידולים:
1. שלושה זני גרבילאה ('ג'ונסון', 'רובין גורדון' ו-'CVE') המשמשים לצמחי עציץ ולענפי קישוט ירוקים ופורחים: זנים אלו רגישים לעודפי זרחן ולמחסור בברזל ולכן מקובל להרכיבם על כנת 'גרבילאה חסונה' עמידה.
 2. צמחי הטרומליס המשמשים לענפי קישוט ירוקים וענפים נושאי פירות. צמחים אלו קשים להשרשה.
 3. צמחי עלי דפנה המשמשים לצמחי עציץ ולצמחי תבלין.
- צמחים אלו קשים להשרשה. מקובל להשרישם רק בחודש אוגוסט. הקלון שנבחן בעבודה ייחודי בכך שהוא משריש במידה מסוימת גם ביתר חודשי השנה.
- מטרת העבודה הייתה לשפר מדדי שתלנות בעזרת רשתות הצל ועל ידי כך לחסוך בעבודה ידנית בטיפול בצמחים ובריבויים. צמחי האם גודלו בעציצים במנהרות צל המכוסות ברשתות צבעוניות, שחורה, כחולה, צהובה ופנינה מתוצרת חברת 'פולישק'. רשתות אלו נבחרו על סמך תוצאות מעבודות קודמות לגבי השפעתם על מידת ההסתעפות של צמחים ועל וקצב השתרשות ייחורים. כול הרשתות הצלילו 50% מאור השמש בתחום PAR. בכול הניסויים נשתלו חמשה עציצים מכול זן בכול מנהרה.
- להלן הממצאים העיקריים מהטיפול ההצללה, השרשה והרכבה של צמחים אלו:

1. צמחי גרבילאה

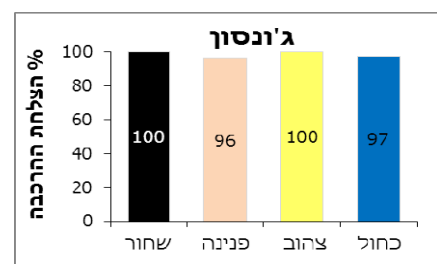
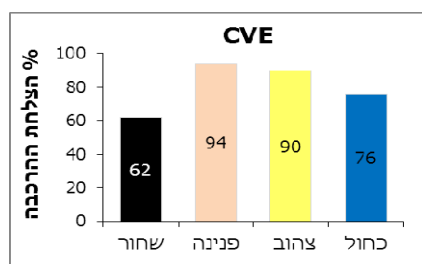
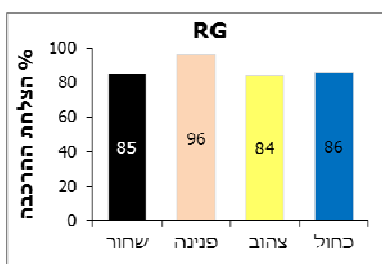
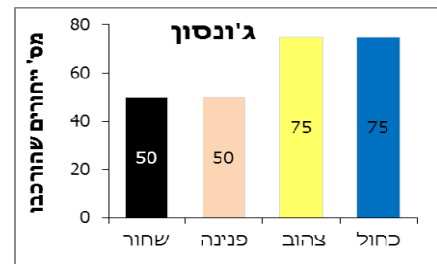
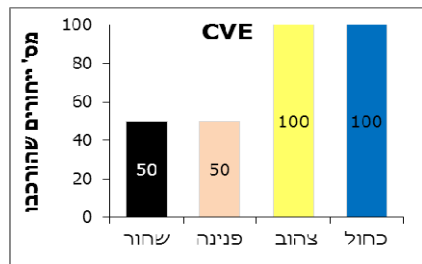
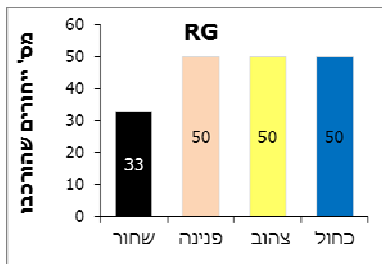
העבודה עם צמחי גרבילאה היא בשיתוף פעולה עם משתלת גצלר ועם משתלת אדמוב. שתילים מורכבים של שלושת הזנים נשתלו בעציצים במנהרות צל המכוסות ברשתות צבעוניות. במעקב אחר השפעת הרשתות על התפתחות הצמחים והפריחה שלהם, נמצא שבצמחי 'ג'ונסון', רשת הפנינה גרמה להתארכות והסתעפות מוגברים במעט ביחס לרשת השחורה הניטרלית, אך כמעט ולא השפיעו על מדדי צמיחה בשני הזנים האחרים (תוצאות לא מוצגות). לעומת זאת לרשתות הייתה השפעה ברורה על מספר הפרחים ודרגת התפתחותם (איור 1). **בכול הצמחים לרשת הפנינה היה יתרון ברור על מספר הפרחים לצמח ומידת התפתחותם.** בצמחי CVE גם הרשת הצהובה הגבירה באופן משמעותי את כמות הפרחים. מבחינת השפעת הצללה ברשתות צבעוניות על יכול הרוכבים ועל הצלחת ההרכבות, הצמחים נגזמו להורדת רוכבים להרכבה מצמחי האם שגדלו תחת הרשתות הצבעוניות והורכבו על כנות 'גרבילאה חסונה' במשתלת גזלר. שני המועדים לניסויים אלו היו אפריל-מאי וספטמבר, כמקובל במשתלות. ניסויים אלו נערכו בצמחי 'ג'ונסון' ו'רובין גורדון' (RG) כבר בשנה השנייה בחודש מאי. בשנה השלישית הניסויים נערכו בשלושת הזנים בשני המועדים. **איור 2** מסכם את תוצאות ניסוי ההרכבות של ספטמבר 2012. מבחינת יכול ענפים רוכבים יש יתרון משמעותי לרשתות הצבעוניות על הרשת השחורה בכול שלושת זני הגרבילאה. הרשתות הכחולה והצהובה בלטו ביכול גבוה ביחס לרשת השחורה בכול הזנים, ובצמחי RG גם רשת הפנינה העלתה מאוד את היכול. הרשת הצהובה העלתה באופן ניכר את יכול הענפים בכול שלושת הניסויים בצמחי ג'ונסון ושני הניסויים בצמחי

CVE. חשוב להדגיש שענפים מתאימים כרוכבים הם ענפים ארוכים יחסית ומעוצים. הצמחים תחת הרשתות הצבעוניות ששיפרו יכול רוכבים בלטו בנוף גדול יותר וענפים ארוכים ואיכותיים להרכבות.



איור 1. השפעת הצללה ברשתות צבעוניות על פריחת זני

מבחינת שיפור תהליך ההרכבה, בצמחי ג'ונסון לא היה מקום לשיפור איכות ההרכבות מכיוון שכולם הצליחו גם בצמחים שגדלו תחת הרשת השחורה. הרשתות הצבעוניות לא פגעו ביכולת זו. לעומת זאת הרשתות ה**צהובה והפנינה** שיפרו באופן ניכר את אחוזי ההצלחות של ההרכבות עם הכנה העמידה. הרשת ה**צהובה** בלטה ביתרון בהצלחת

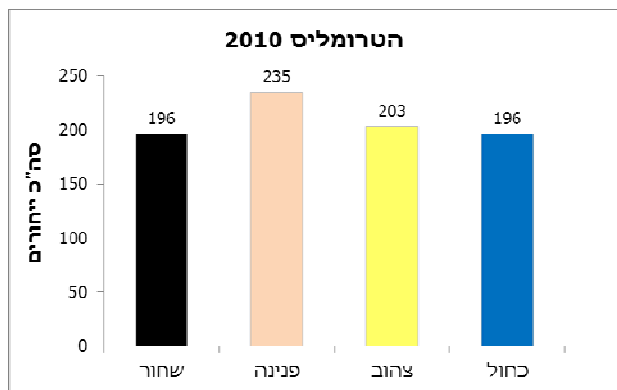


איור 2. השפעת הצללת צמחי אם ברשתות צבעוניות על יכול הרוכבים והצלחת ההרכבות על צמחי 'גרבילאה חסונה'.

הרכבות בצמחי CVE בשני הניסויים שנערכו עם צמחים אלו. בצמחי RG, למרות אחוז הצלחה גבוה גם תחת הרשת השחורה, לרשת הפנינה היה יתרון משמעותי בהצלחת ההרכבות בשניים מהניסויים בצמחים אלו. מכאן שהרשת שמעלה יכול ואחוזי הצלחת הרכבות בצמחי CVE היא הצהובה ובצמחי RG היא רשת הפנינה.

2. צמחי הטרומליס

בדומה לצמחי גרבילאה, צמחי הטרומליס גודלו תחת רשתות צל צבעוניות (צהובה, כחולה, שחורה ופנינה) במנהרות בבית דגן. הצמחים הוכנסו למנהרות השונות ביוני 2009, ובמשך עשרה חודשים נקטפו ייחורים לבחינת השפעת הרשתות על יכול הייחורים לצמח. רשת הפנינה בלטה ביכול ייחורים גבוה ביותר עם עליה של כמעט 20% במספר הייחורים ביחס לרשת השחורה הנישראלית (איור 3). מכאן שאם צמחי אם של הטרומליס יכוסו ברשת פנינה, ניתן יהיה לגדל פחות צמחי אם לקבלת אותו יכול ייחורים.



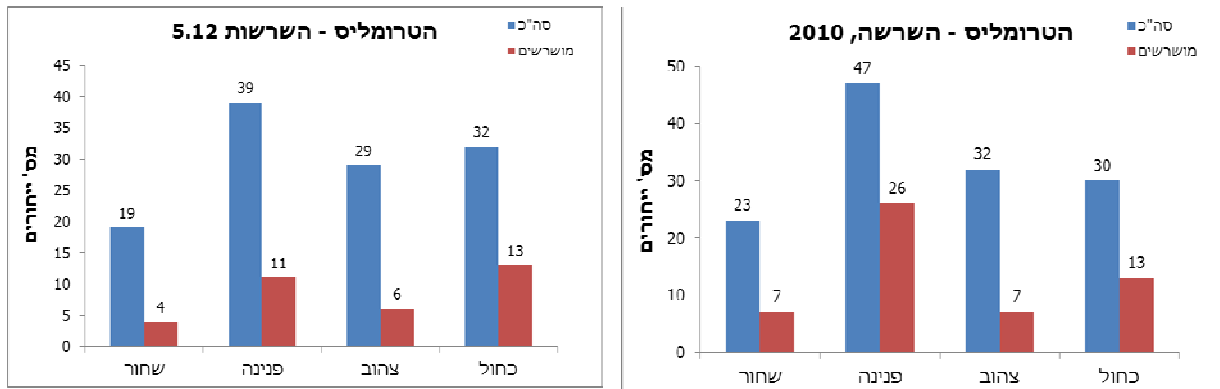
איור 3. השפעת הצללת צמחי הטרומליס ברשתות צבעוניות על יכול הייחורים לצמח.

בבחינת השפעת הרשתות על השתרשות הייחורים, בחנו תחילה מספר טיפולים לקבלת השרשה טובה ביותר: טיפול ב-IBA5 במצע כבול, טיפול ב-IBA5 והשרשה בפלגים עם פרלייט, טיפול ב-IBA10 ו-T8, וטיפול ב-IBA15 ו-T8. ההשרשות נבחנו בפוגר בעונות שונות של השנה. מבין הטיפולים להשרשה, הטיפול המוצלח ביותר היה עם הורמוני IBA15 ו-T8 באביב. איור 4 מסכם תוצאות של שני ניסויים מיצגים, האחד משנת 2010 (בחודש מרץ) והשני משנת 2012 (בחודש מאי), בהם עקבנו אחר יעילות ההשתרשות של ייחורי הטרומליס שצמחי האם שלהם גדלו תחת רשתות צל צבעוניות. בשני הניסויים נקבעו מספר הייחורים הכללי מהצמחים בכול רשת ומספר הייחורים שהשרישו כעבור חודשיים. בשני הניסויים יכול הייחורים היה הגבוה ביותר תחת הרשת פנינה, ואחוז הייחורים שהשתרש היה גבוה יותר ברשתות הכחולה והפנינה ביחס לרשת השחורה והצהובה.

3. צמחי עלי דפנה

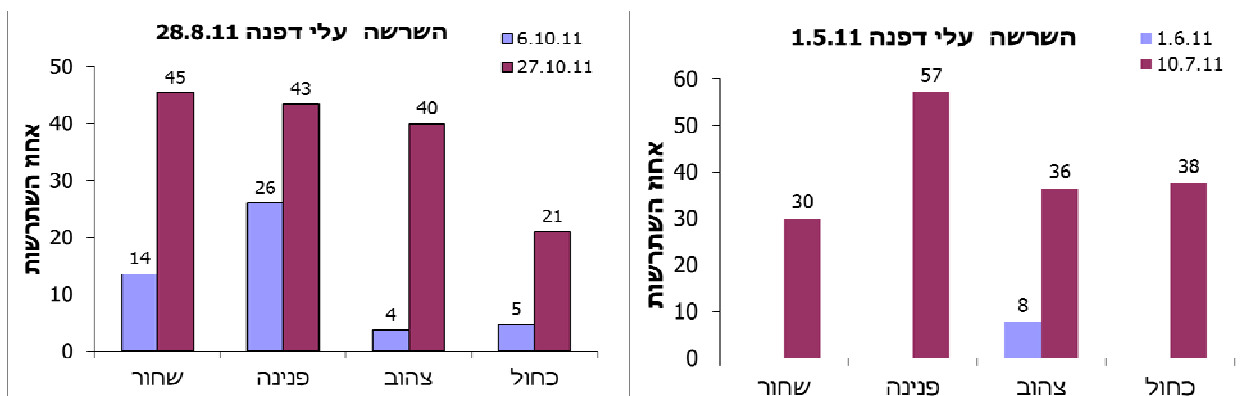
מכיוון שצמחי עלי דפנה משתרשים בקושי רב ובשנת המחקר הראשונה קבלנו יכול נמוך מאוד משלושה צמחים צעירים, בשנה השנייה הוכנו 6 צמחים בוגרים לכול מנהרה לבחינת השפעת הרשתות על יעילות השתרשות הייחורים. הצמחים הוכנסו למנהרות באמצע חודש דצמבר, ונגזמו בסוף חודש דצמבר. בסיכום השפעת הרשתות על השתרשות

ייחורים בחודשים מאי, יוני ואוגוסט, התקבל יבול של בין 40 ל-60 ייחורים מכול רשת. איור 5 מסכם שני ניסויים משנת 2011 בהם נבחנה יעילות ההשתרשות של ייחורים מצמחי אם שגדלו תחת הרשתות השונות. בניסוי



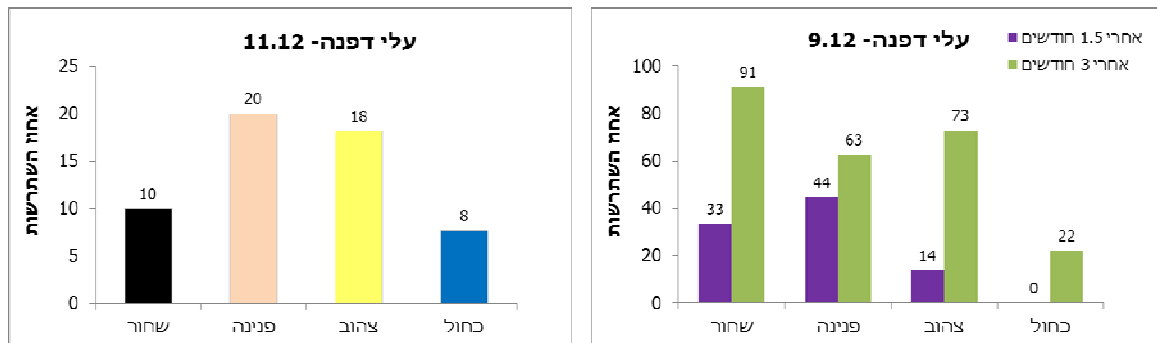
איור 4. השפעת הצללה ברשתות צבעוניות על יבול ומידת ההשתרשות של ייחורי הטרומליס.

מחודש מאי 2011 אחוז הייחורים המושרשים נקבע כעבור חודש וחודשיים מתחילת הניסוי. ניתן לראות שכעבור חודשיים ייחורים מצמחי אם תחת רשת הפנינה השרישו באופן משמעותי יותר מאשר מהרשתות האחרות. גם בניסוי אוגוסט, הייחורים מרשת הפנינה הקדימו בהשתרשות שלהם.



איור 5. השפעת רשתות הצל הצבעוניות על השתרשות ייחורי צמחי עלי דפנה.

הקדמת ההשתרשות של ייחורי צמחי עלי דפנה נראית גם בניסויים בשנת 2012 (איור 6). בניסוי בספטמבר 2012 ניתן לראות שלמרות שאחוזי ההשתרשות של ייחורים מהרשת השחורה הייתה יחסית טובה, הייחורים מרשת הפנינה הקדימו בהשתרשות שלהם והיו גבוהים ביותר ביחס לרשתות האחרות בבדיקה כעבור חודש וחצי. בבדיקה כעבור שלושה חודשים, אחוזי ההשתרשות מייחורי הרשת השחורה היו הגבוהים ביותר. ישנה חשיבות רבה בקיצור זמן ההתרשות למניעת מחלות ורקבונות של הייחורים ולחסכון בעבודה ידנית. בניסוי שהחל בנובמבר 2012 הנתונים הם רק כעבור חודש וחצי, כי ניסוי זה עדין בעיצומו. פה נראה בבירור שוב שהייחורים תחת רשת הפנינה הקדימו באופן ניכר את אלו תחת הרשת השחורה הנטראלית. בניסוי זה גם לרשת הצהובה היה יתרון ברור. **כסיכום ניתן לקבוע שלייחורי עלי דפנה מצמחים שגדלו תחת רשת הפנינה יתרון ביעילות ההשתרשות שלהם ביחס לרשת השחורה.**

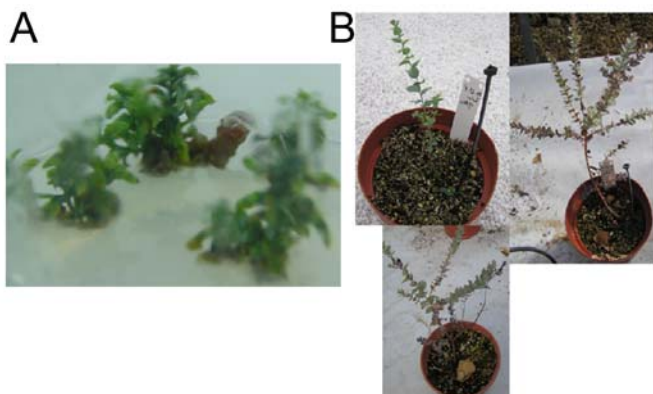


איור 6. השפעת רשתות הצל הצבעוניות על יעילות השתרשות ייחורי צמחי עלי דפנה.

ב. ריבוי בתרביות רקמה נעשה למספר צמחים נבחרים:

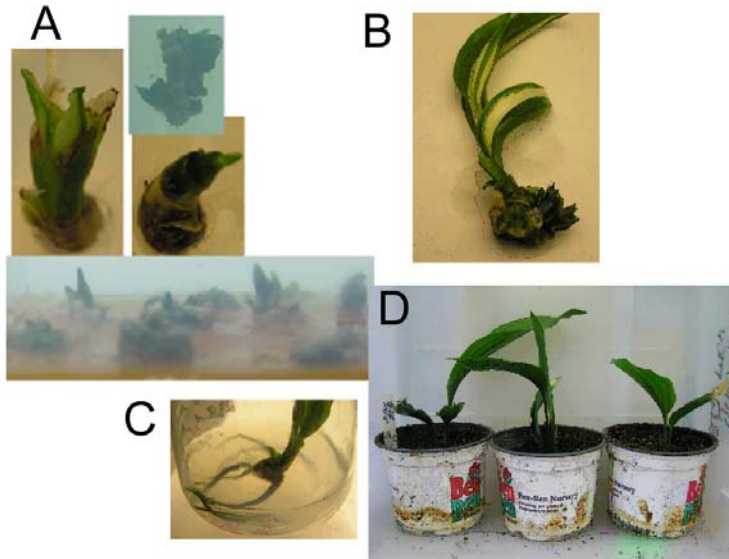
1. איקליפטוס מון לגון. אקליפטוס מון לגון (Moon lagoon) הוא היברידי שיחי בעל עלים צרים יחסית בצבע ירוק כחול בשלב הצעיר שלו. הצמח עמד ליובוש ומשמש כצמח נוי וגם ענפי קישוט בשלב הצעיר כאשר העלים כחולים יחסית. אנו קיבלנו כמה קווים קשי השתרשות השונים במופעם העלוותי. הכנסנו מריסטמות חייקיות מהצמחים למצעים שונים על מנת לקבל ריבוי בתרבית אשר יאפשר גם הצערה והשתרשות של הצמחים. מתוך 3 הקלונים אשר קיבלנו לריבוי רק 2 התרבו על המצעים השונים. קלון אחד לא התרבה כלל. קלון 2 התרבה באיטיות ניסינו מספר מצעים המבוססים הן על woody plant medium והן מצעים המבוססים על MS. כמו כן ניסינו להקטין השחת המצע על ידי הוספת PVP. סך הכול נוסו 8 הרכבי מצע שונים. קלון 2 ממשיך לגדול ולהתפצל אבל באיטיות מרובה. עוד לא מצאנו את המצע שיעודד ריבוי מהיר. קלון מספר 1 של אקליפטוס מון לגון (Moon lagoon) הראה ריבוי מהיר על מצע WPM-D1 עם ממוצע ריבוי של 2 נצרונים נוספים לנצרון קיים כל 4 שבועות לערך (תמונה 1).

צמחוני האיקליפטוס השתרשו ללא בעיות ברגע שהגיעו לגודל מעל 4 סנטימטר. גודל זה היה הכרחי להשתרשות. צמחונים מושרשים של איקליפטוס הועברו למספר מצעי עציץ בתערובות שונות של כבול, ורמיקוליט וקוקוס ללא הצלחה. על מצעים אלו כל הצמחונים המושרשים מתו. מכון שחשבנו שמצעי עציץ אלו מכילים חומרים אשר מזיקים לצמחוני האיקליפטוס העברנו צמחונים מושרשים למצע של ורמיקוליט נקי ללא תוספות תחת התזה יומית במתקן הריבוי במחלקה לפרחים. הסתבר שהורמיקוליט הנקי פתר את בעיית ההקשחה וקיבלנו צמחים מוקשחים בעציצים. לאחר השהות בורמיקוליט הועברו הצמחים למצע גן רגיל בעציצים.



איור 7. מראה צמחוני אקליפטוס על במצע ריבוי (A) ולאחר הקשחה (B).

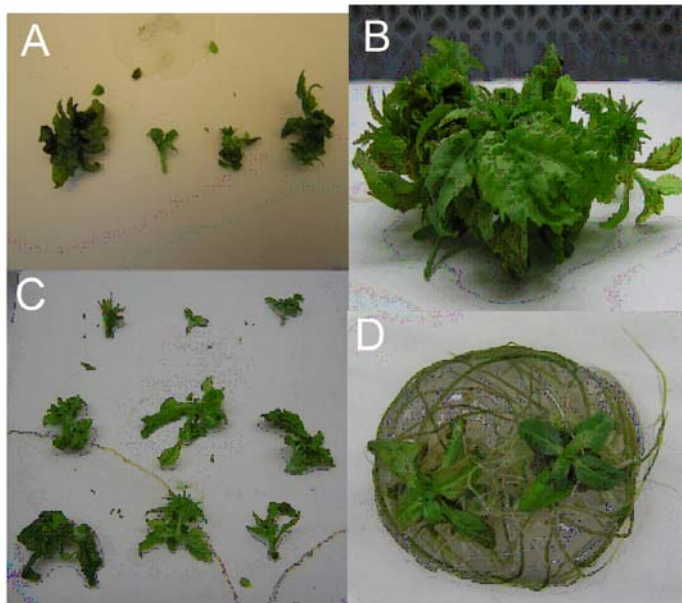
2. מגינית מגוונת. מגינית מגוונת היא צמח נוי אשר עליו משמשים גם כעלי קישוט. הצמח המגוון הוא קשה ריבוי והשתרשות וקצב גידולו איטי יחסית למגינית רגילה. הוכנסו לתרבית עשרות מריסטמות של מגינית על שורה של מצעים שהכילו אנטיביוטיות שונות על מנת להפטר מהזיהומים אשר הצמח הזה מתאפיין בהם. רוב החומר הצמחי שהוכנס לתרבית הזדהם ונזרק כאשר חלק קטן המשיך בתהליך לאחר שנוקה מפתוגנים. כרגע אנו רק בשלב של תחילת ריבוי של מגינית בתרבית אבל כפי שנראה באיור 8 המגינית שומרת על מצבה המגוון



איור 8. מגינית מגוונת (A) במצע ריבוי. (B) לאחר גידול במבחנה. (C) לאחר שהועברה למצע השתרשות ללא הורמונים לאחר שהגיעה לאורך של מעל 5 ס"מ. (D) לאחר השתרשות העברו צמחי המגינית לעציצים עם תערובת גן משופרת.

3. ורוניקה סגולה. על מנת לפתח מערכת ריבוי מהיר לורוניקה

הוסרו ניצנים חייקיים מגבעולים והונחו על מגוון מצעי ריבוי. בכמה מצעים החל ריבוי של ניצנים מניצנים החייקיים (איור 9). קצב הריבוי במצע המייטבי הוא כ-5 צמחונים ממריסטמה לחודש. בקצב כזה ניתן לגדל מאות צמחים ממונטנט בודד אשר מתגלה בשדה. בנוסף תהליך הריבוי בתרבית מנקה את הצמחים הקיימים מפתוגנים כגון פטריות וחידקים אנדוגנים. הצמחונים המושרשים הועברו לעציצים עם תערובת גן משופרת שם הם גדלים כעת



איור 9. התפתחות צמחוני ורוניקה בתרבית.

(A) ניצנים שהתפתחו בחייקי העלים. (B) גושי צמחונים. (C) צמחונים מופרדים. (D) התארכות והשתרשות במצע השתרשות.

ג. מחקרים מולקולאריים להבנת המנגנונים העומדים בבסיס אובדן כשר השרשה בייחורים בוגרים לעומת ייחורים צעירים בצמח המודל איקליפטוס גרנדיס:

זה סיכום הניסויים והתוצאות

1. הוקמה חלקת ניסוי בבית רשת ובה נשתלו 60 עצי איקליפטוס גרנדיס, מהם 30 נגזמו נמוך: 10-15 ס"מ מהקרקע ו-30 הגיעו לגובה 150-200 ס"מ. מניסיונו, ענפים הפורצים מהגזע נמוך משתרשים באחוזים ניכרים בעוד שענפים מגובה של 150-200 ס"מ כמעט ואינם משתרשים. הנמוכים שומרים על תכונות יובנליות ואילו הגבוהים נחשבים לבוגרים (10).

2. תוכנן ניסוי השרשה כדלקמן: ייחורים בוגרים וצעירים נגזמו, מחציתם טופלו באוקסין (6000 ppm) ומחציתם לא. הייחורים נשתלו במגשי השרשה בשולחן מחומם עם התזה במרכז הריבוי של המחלקה לפרחים. הייחורים נקצרו ב-6 נקודות הזמן הבאות לאחר הטיפול: 0, 1, 3, 6, 9, 12 ימים. כאשר לאחר 12 יום כבר הופיעו שורשים ב-80% מהייחורים הצעירים שטופלו באוקסין. טבלה מס' 1 מתארת את מערך הניסוי:

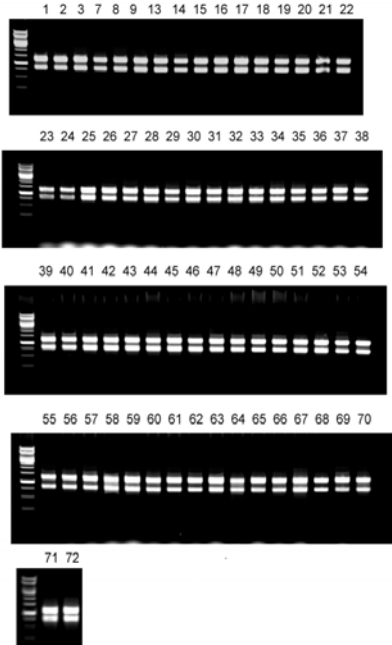
ייחור	אוקסין	0 ימים	1 יום	3 ימים	6 ימים	9 ימים	12 ימים
צעיר	-	60	60	60	60	60	60
צעיר	+		60	60	60	60	60
בוגר	-	60	60	60	60	60	60
בוגר	+		60	60	60	60	60

טבלה מס' 1. מערך הניסוי לשבב דור שני. ייחורים צעירים ובוגרים נדגמו מיד לאחר הטיפול או לאחר מספר ימים בשולחן השרשה. ייחורים שלא טופלו באוקסין מהווים ביקורת לגנים שביטויים לא רלוונטי לטיפול באוקסין ולהתמינות השורשים. מכל טיפול נדגמו 60 ייחורים כאשר כל 20 ייחורים נלקחו מקבוצת עצים אחרים אשר מהם הוכן רנ"א בנפרד כך שבסה"כ בכל נקודה שלוש חזרות ביולוגיות. סה"כ 66 דוגמאות.

3. בכל נקודת זמן הוצאו הייחורים וחלקו התחתון של כל ייחור (1 ס"מ) הוקפא מיד בחנקן נוזלי. רנ"א הופק מכל הדוגמאות (איור 15) לפי פרוטוקול שכוויל במעבדה ודווח במסגרת דוח לתוכנית 256-0776-08.

4. תכנון השבב: בעבודה קודמת תוכנן שבב הדנ"א דור ראשון לאומדן ביטוי דיפרנציאלי של הגנים בין ייחור צעיר לבוגר בשלב הגיזום (שלב 0). שבב זה הכיל כ-24,000 גנים שיוצגו על ידי 40,000 גלאים (probes). השבב שתוכנן עבור עבודה זו, יקרא דור שני, והוא שבב ממוקד יותר ומבוסס על הידע מההיברדיזציות שנעשו עם שבב דור ראשון ומאינפורמציה חדשה של גנום הצפצפה (11) שהוא העץ הקרוב ביותר לאיקליפטוס שהגנום שלו רוצף. בשלב ראשון נלקחו כל הגלאים שהראו ביטוי משמעותי בהברדיזציות של ייחור מאיקליפטוס בוגר כנגד ייחור מאיקליפטוס צעיר, ונבחר נציג מהם עבור כל גן/רצף קונסנזוס. סך הגלאים היה 12409 והם יכוננו להלן קבוצה ראשונה. בשלב שני נלקחו כל שאר הגלאים להם לא נראה ביטוי משמעותי בהברדיזציות הראשונות ונבחר נציג אחד לכל קבוצת גלאים שדומה ברצף שלהם לגן מגנום הצפצפה ובתנאי שלגן זה אין נציג

בגלאים מהקבוצה הראשונה. סך הגלאים היה 4529 והם יכוננו להלן קבוצה שנייה. כל הגלאים מהקבוצה הראשונה הודפסו על השבב דור שני. מהקבוצה השנייה נבחרו 2800 גלאים באופן אקראי על מנת למלאות שבב של 15,209 גלאים.



איור 10. שישים ושש דוגמאות של רנ"א מאיקליפטוס גרנדיס מהטיפולים המפורטים בטבלה 1, מוכנות להיברידיזציה על השבבים שתוכננו כמפורט.

5. ההיברידיזציה נעשתה במכון ויצמן למדע: דוגמאות הרנ"א סומנו ועברו היברידיזציה שתוכננה ב-loop design כמתואר בטבלה מספר 1. על מנת לאפשר השוואה טובה של כל דוגמא לכל יתר הדוגמאות ולנטרל את האפקט של הצבע עצמו.

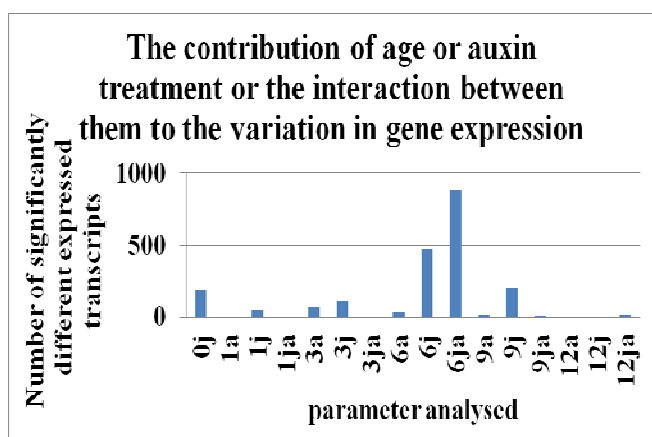
6. התוצאות נותחו בשתי גישות. בגישה הראשונה ניתחנו סטטיסטית ע"י מודלים לינארים כל נקודת זמן ושאלנו על ההבדלים בביטוי גנים הנובעים

מאפקט הגיל (מבוגר מול צעיר; j), אפקט הטיפול (Auxin מול ביקורת; a) והאינטראקציה ביניהם (סינרגיזם ואנטגוניזם; ja). תיקון השונות הנובע ממספר המדגם הנמוך נעשה בשיטת של Hierarchical Bayesian. איור 11 מראה את כמות הגנים שעלו בכל זמן בגורמים השונים. בתוך כל זמן בנפרד עבור כל אחד מהגורמים נבחרו גנים שהביטוי שלהם היה שונה באופן משמעותי סטטיסטית, כלומר שהראו ערך ($p\text{-value} < 0.05$); ערך מתוקן להשוואות מרובות). מטרת התיקון להשוואות מרובות הוא להוריד את מספר ה false positives. בתוך כל נקודת זמן מתקבלת התמונה המתוארת באיור מס 11. נראה שבנקודת זמן של שישה ימים לאחר חיתוך היחורים והטיפול באוקסין ישנה ההשפעה הגדולה ביותר של הגיל (6j) ושל האינטראקציה בין הגיל והטיפול (6ja). כתוצאה מכך, יש עליה במספר הגנים שמראים הבדל בין היחורים הצעירים לבוגרים (j) וכן עליה במספר הגנים שמראים הבדלים ספציפיים ליחורים צעירים שטופלו באוקסין לאלו שלא טופלו באוקסין (ja). מכיוון שרק בייחורים הצעירים שטופלו באוקסין נוצרו פרימורדיות של שורשים אנו יכולים להסיק שביום השישי מתרחשים התהליכים המשמעותיים להתמיינות השורשים האדוונטיבים בייחורים אלו. גישה שנייה היא לזהות גנים שפרופיל הביטוי שלהם דומה לאורך הזמנים בטיפולים השונים. גנים כאלו קובצו ביחד בעזרת QT-cluster. את האפקטים העיקריים המשפיעים על ביטוי הגנים אפשר לראות מקלסיפיקציה של הדוגמאות השונות (זמן, טיפול, גיל) עבור כל הגנים שהראו שנוי משמעותי. קלסטר של כל אוכלוסיות הגנים שביטויים השתנה באופן משמעותי בלפחות דוגמא אחת מראה שהאפקט העיקרי המשפיע על ביטוי הגנים הוא זמן הטיפול בשולחן הריבוי כיוון שמרבית הצברים (קלסטרים) מכילים דוגמאות מאותו הזמן גם בוגר וגם צעיר עם טיפול וללא טיפול באוקסין. (איור 12).

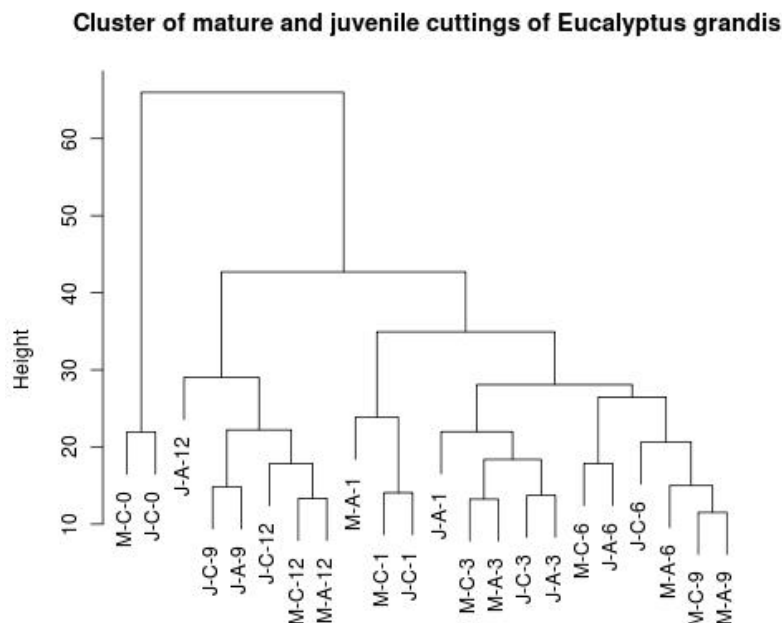
Array	Sample1 Cy3	Sample2 Cy5	Array	Sample1 Cy3	Sample2 Cy5
Array1	J-C-1-1	J-A-1-1	Array17	J-A-6-3	J-A-9-1
Array2	J-A-1-2	M-A-1-1	Array18	M-A-9-1	M-A-6-3
Array3	M-A-1-2	M-C-1-1	Array19	M-C-6-3	M-C-9-1
Array4	M-C-1-2	J-C-1-2	Array20	J-C-6-3	J-C-9-1
Array5	J-A-1-3	J-A-3-1	Array21	J-A-9-2	J-C-9-2
Array6	M-A-3-1	M-A-1-3	Array22	M-A-9-2	J-A-9-3
Array7	M-C-1-3	M-C-3-1	Array23	M-C-9-2	M-A-9-3
Array8	J-C-1-3	J-C-3-1	Array24	J-C-9-3	M-C-9-3
Array9	J-A-3-2	J-C-3-2	Array25	J-C-12-1	J-A-12-1
Array10	M-A-3-2	J-A-3-3	Array26	J-A-12-2	M-A-12-1
Array11	M-C-3-2	M-A-3-3	Array27	M-A-12-2	M-C-12-1
Array12	J-C-3-3	M-C-3-3	Array28	M-C-12-2	J-C-12-2
Array13	J-C-6-1	J-A-6-1	Array29	J-C-0-1	M-C-0-1
Array14	J-A-6-2	M-A-6-1	Array30	M-C-0-2	J-C-0-2
Array15	M-A-6-2	M-C-6-1	Array31	J-C-0-3	M-C-0-3
Array16	M-C-6-2	J-C-6-2	Array32	M-A-12-3	J-A-12-3

טבלה מס 1. מתארת את

הדוגמאות שסומנו ועברו היברידיזציה עם כל שבב ושלב J מסמן ייחור יובנלי, M ייחור בוגר, C ביקורת לא מטופלת ו-A טיפול באוקסין. המספר הראשון מימין לאות מסמן את מספר הימים לאחר מתן האוקסין, והמספר הימני ביותר מסמן את מספר החזרה. Cy3 ו-Cy5 הם הצבעים הפלואורסנטים השונים בהם סומנו דוגמאות הרנ"א.



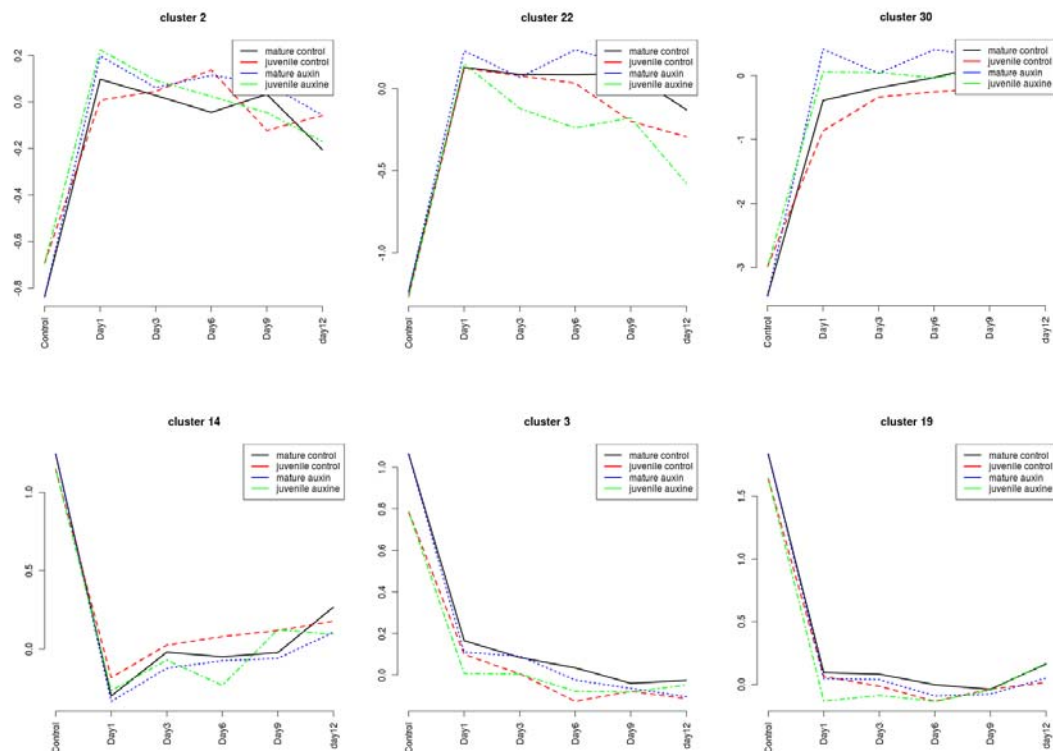
איור 11. כמות הגנים שהשתנו בצורה מובהקת בהשפעת הגיל (j) או הטיפול באוקסין (a) או האינטראקציה בין שני הטיפולים (ja). נראה שביום השישי לאחר תחילת הניסוי נוצרו ההבדלים הגדולים ביותר בביטוי הגנים. השינויים היו גם בין צעיר לבוגר ללא קשר לטיפול באוקסין (6j), וגם עקב האינטראקציה בין הטיפול באוקסין לגיל הייחור (6ja).



איור 12. קלסטר של הדוגמאות בעלות פרופיל ביטוי גנים דומה. התמונה מראה קרבה בין הדוגמאות שנדגמו באותו יום. J צעיר, M בוגר, C ביקורת, A טיפול באוקסין. המספרים בשמות הדוגמאות מצביעים על נקודת הזמן לאחר תחילת הניסוי בה נדגמו.

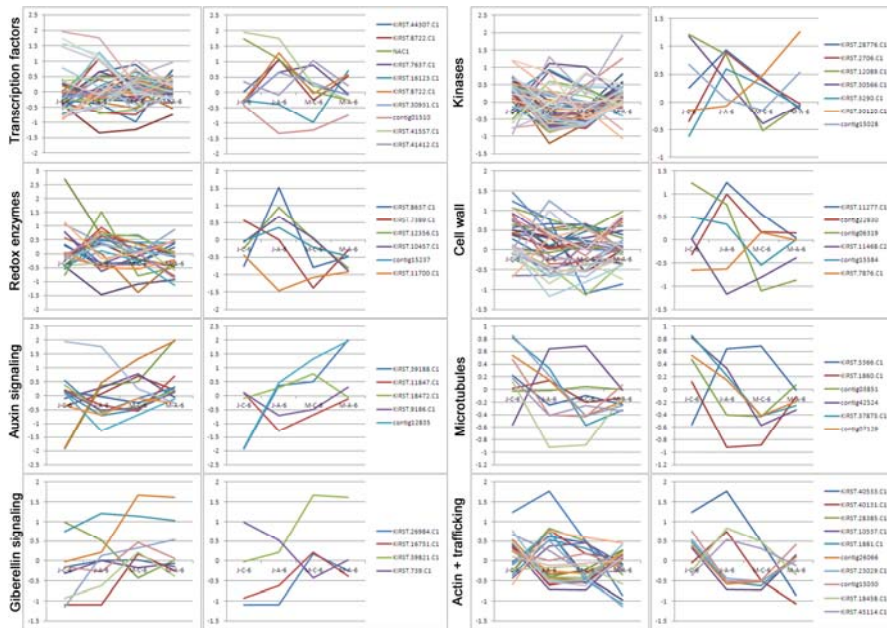
כאשר בוחנים קלסטרים בודדים של ביטוי הטרנסקריפטים נראה בברור שיום לאחר החיתוך היתה

עליה או ירידה דרמטית בביטויים של רבים מהם (איור 13) תופעה דומה נצפתה בעבר בניסוי שבבי דנ"א בצפצפה (12). יחד עם זאת, במרבית הקלסטרים אין הבדלים בין הדוגמאות המייצגות ייחורים יובנילים בהשוואה לבוגרים וגם בין הדוגמאות המייצגות טיפול באוקסין בהשוואה לביקורת לא מטופלת (איור 13). על מנת לאפיין את הגנים שהתבטאו באופן שונה בין הדוגמאות מיינו את אותם גנים שעלו באנליזה הסטטיסטית (איור 11) לפי קבוצות תפקוד. איור 14 מראה גרפים המתארים את ביטוי הגנים ביום השישי בייחורים יובנילים ובוגרים שטופלו באוקסין או ששימשו כביקורת. ניתן להסיק מהאיור שקבוצה גדולה של גנים השתנו באופן ספציפי בין הדוגמאות. אלו כללו פקטורי שיעתוק, אנזימי חימצון חיזור, קינאזות, גנים ממסלול האוקסין והגליברלין, גנים הקשורים לדופן התא, לשלד התא המיקרוטובולרי ולאקטין ותנועתיות של גופיפים ממבראנלים בתא. העושר הגדול של הגנים שביטויים השתנה מעיד על הבדלים רבים בין ייחורים צעירים ובוגרים ובאופן תגובתם לאוקסין. על מנת לאשר את התוצאות משבבי הדנ"א נבחרו מספר נציגים מכל קבוצת גנים והביטוי שלהם נבדק בשיטת ננוסטרינג. שיטה זו כוללת היברידיזציה לפרובים ארוכים (100 בסיסים) ונעשית כשרות של החברה (<http://www.nanostring.com>). דוגמאות רנ"א זהות לאלו ששימשו לאנליזת השבב וכן דוגמאות חדשות (סה"כ 6 חזרות ביולוגיות) נבדקו לביטויים של 37 גנים שונים. בתריסר הגנים המוצגים באיור Z נמצאו הבדלים ברורים לאורך מספר ימים בביטוי הגנים בין הדוגמאות השונות. בשאר עשרים וחמישה הגנים נמצאו הבדלים בביטוי בין הדוגמאות למשך נקודת זמן אחת. איור Z מראה על 11 גנים בהם היה ביטוי גבוהה יותר בייחורים היובנילים בתגובה לאוקסין וגן אחד בו הביטוי היה גבוה יותר בייחורים הבוגרים בתגובה לאוקסין. האחרון עשוי להיות גן המעכב התמיינות שורשים אדוונטיבים. החלטנו להתמקד בגנים המראים הבדל בביטוי המתמשך על פני מספר ימים.

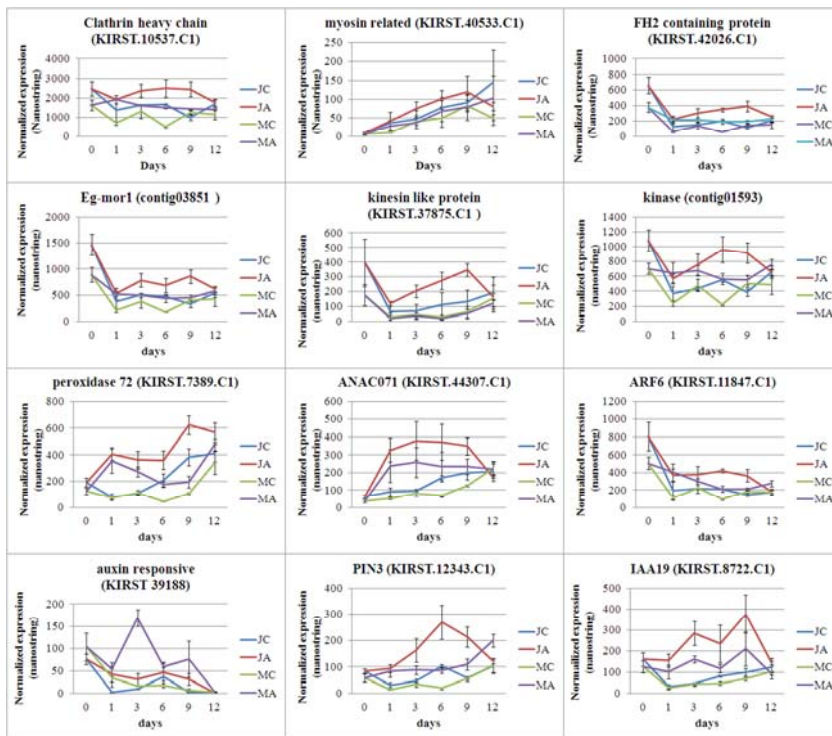


איור 13. מספר קלסטרים של ביטוי גנים המראים על עליה או ירידה דרמטית ביטוי יום לאחר חיתוך היחורים אך לא מראים על הבדלים הנובעים מגיל היחור או מהטיפול באוקסין.

7. לימוד פרטני של השפעת גנים על התמיינות שורשים אדוונטיבים. על מנת לבדוד אורך מלא של cDNA ושל רצפי פרומוטורים מאיקליפטוס השתמשנו בבסיסי הנתונים הבאים. בסיס נתונים של רצפי EST נבנה ע"י איחוד של שלושה מקורות (Kirst.fa, leaf_ests.fa, e_grandis_xylem_ests_JGI.fa) מהסרבר של אוניברסיטת פטרוריה שכלל בסה"כ 953843 רצפים (<http://eucalyptusdb.bi.up.ac.za/>). האיחוד שכלל contig assembly נעשה ע"י דר' שפרה בן-דור ממכון ויצמן. בנוסף השתמשנו ברצף הגנום של איקליפטוס גרנדיס שנמצא בשלבים ראשוניים של assembly וכבר זמין לקהל הרחב http://www.phytozome.net/search.php?method=Org_Egrandis. שני בסיס הנתונים הללו אינם שלמים ולכן נתקלנו בקשיים למצוא רצפים מלאים של חלק מהגנים וכן של חלק מהפרומוטורים. למרות זאת אנו ממשיכים להתעקש. על מנת ללמוד על תפקידם הפוטנציאלי של הגנים הנ"ל בהתמיינות שורשים אדוונטיבים, המשכנו במקביל לעבוד על הגנים האורטולוגים שלהם מארבידופסיס. הפרומטר של הגן myosin related מארבידופסיס בודד ושובט כרצף בקרה GFP. הקונטרקט הוחדר לצמחי ארבידופסיס ומיקום הביטוי של GFP נבדק. איור 16 מראה ביטוי של GFP בצמחים אלו בקצה השורש, בפרימורדיות של שורשים צדדיים ואדוונטיבים ובסמוך לצורות ההובלה בהיפוקוטייל. דגם ביטוי כזה רומז על תפקיד פוטנציאלי בהתמיינות שורשים אדוונטיבים. רצף ה-cDNA של הגן myosin related מארבידופסיס בודד וכעת אנו מכינים אותו לביטוי בצמחים טרנסגנים.



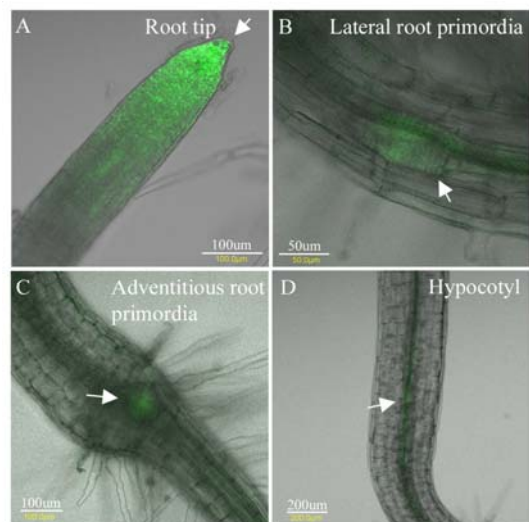
איור 14. שינויים בביטוי גנים ביום 6. גנים חולקו לקבוצות תפקודיות ורמת הביטוי המנורמלת שלהם מוצגת ביום 6. J יובנלי, C ביקורת, M בוגר, A אוקסין. לכל קבוצת גנים מוצגים שני גרפים. הימני כולל רק את הגנים המראים את הבדלים הגדולים ביותר מבין הקבוצה השמאלית.

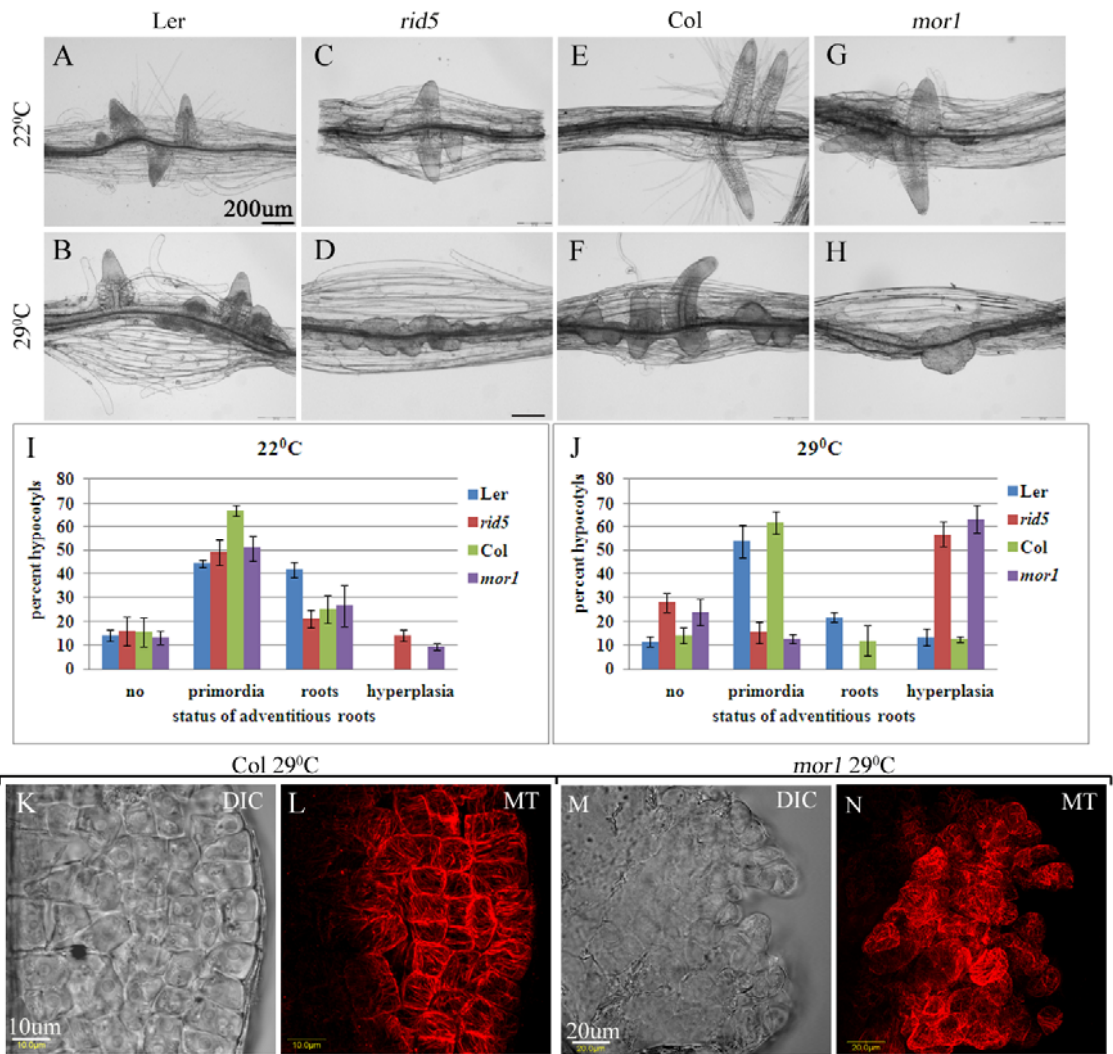


איור 15. ביטוי של מספר גנים במשך כל הניסוי, 0-12 יום, כפי שהתקבל בוולידציה בשיטת ננוסטרינג. מתוך 37 בדיקות מוצגים 12 גנים בהם נראה הבדל בביטוי שנמשך על פני מספר ימים.

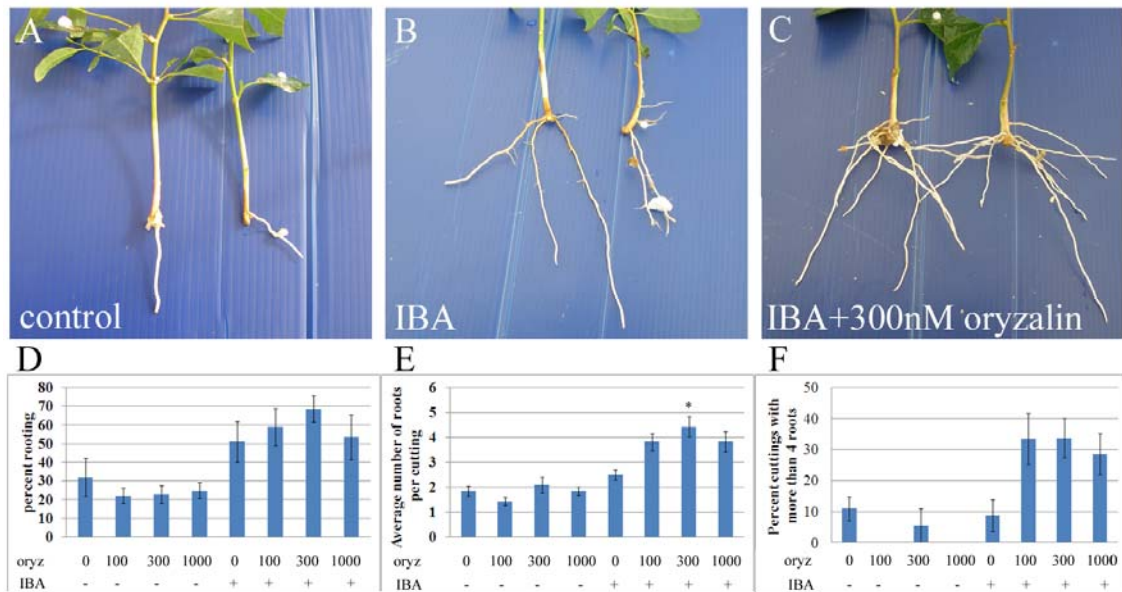
בנוסף, תשומת לבנו התמקדה בגן MOR1 המקודד לחלבון קושר מיקרוטובולי. התוצאות הראו עליה בביטוי שלו רק בייחורים היובנילים שטופלו באוקסין (איור 15). מיקרוטובולי מעורבים בחלוקות תאים (13, 14) התארכות תאים (15, 16) ולאחרונה מתרבות העדויות שמעורבים גם בקליטה של סיגנלים מכוחות מכאנים הפועלים על התאים (17). על מנת לבדוק את תפקידו של MOR1 בהתמיינות שורשים אדוונטיביים בדקנו השתרשות בשני קוים של צמחי ארבידופסיס (*mor1 and rid5*) המכילים מוטציה רגישה לטמפרטורה בגן ל-MOR1 (18, 19). בטמפרטורה של 22 מעלות מתנהגים מוטנטים אלו כמו זן הבר אבל בטמפרטורה של 29 מעלות, שלד המיקרוטובולי מתפרק חלקית בצמחים אלו. איור 17 מראה שבשני סוגי הצמחים, התמיינו שורשים אדוונטיביים בטמפרטורה של 22 מעלות כמו בזן הבר אבל בטמפרטורה הגבוהה חל עיכוב משמעותי בהתמיינות השורשים למרות שלא חל עיכוב בחלוקות תאים. תוצאה זו מצביעה על כך שבתנאים אלו הפירוק החלקי של שלד המיקרוטובולי עדיין אפשר חלוקות תאים אבל עיכב את הקואורדינציה בין התאים שחשובה להתמיינות השורש. בנוסף התוצאה מעידה שהתפקיד הידוע של MOR1 בבקרה על הדינמיקה של המיקרוטובולי (20) חשוב לתיאום בין התאים המתחלקים. ממצא זה נמצא בקורלציה לתגובה המאפיינת ייחורים בוגרים מעצים שונים כולל איקליפטוס. בייחורים מעצים בוגרים המטופלים לעידוד השתרשות, ידוע שבתגובה לאוקסין מתקיימות חלוקות תאים אך לא מתקיימת התמיינות (21-23). בהתבסס על ממצא זה החלטנו לבדוק איך התערבות עדינה בדינמיקה של מיקרוטובולי תוך כדי אינדוקציה להשתרשות ע"י אוקסין תשפיע על ייחורים מאיקליפטוס. ייחורים טופלו באוקסין ובריקוזים נמוכים של אוריזלין, חומר מפרק מיקרוטובולי. בנוכחות ריקוזים נמוכים של אוריזלין משתנה שיווי המשקל בין מיקרוטובולי מפולמר לתת היחידות של טובולין לטובת עליה בריכוז תת היחידות על חשבון הסיב המפולמר. עליה בריכוז הטובולין המסיס גורמת לעליה בדינמיקה של המיקרוטובולי וזו חשובה ליכולתו של שלד המיקרוטובולי לקלוט אותות של כח מכאניים (24). לשמחתנו אכן טיפול באוריזלין שיפר את מספר השורשים הממוצע לייחור בייחורים של איקליפטוס (איור 18).

איור 16. ביטוי GFP תחת בקרה של הפרומוטר של הגן מארבידופסיס האורטולוגי לגן מאיקליפטוס גרנדיס הנקרא *myosin related*. דגם הביטוי A. קצה השורש, B. פרי מורדיה של שורש צדדי, C. פרי מורדיה של שורש אדוונטיבי, ו-D. סמוך לצרורות הובלה בהיפוקוטייל, מעיד על תפקיד בהתמיינות שורשים אדוונטיביים.





איור 17. התמיינות שורשים אדוונטיביים מהיפוקוטילים של צמח הבר של ארבידופסיס או של שני מוטנטים אלליים בהם יש מוטציה רגישה לחום בגן למור1. A, C, E, G. אינדוקציה לשורשים אדוונטיביים בטמפרטורה של 22 מעלות. נראית התמיינות שורשים שווה בצמחי הבר ובמוטנטים. B, D, F, H. אינדוקציה לשורשים אדוונטיביים בטמפרטורה של 29 מעלות מה קורים נזקים לשלד המיקרוטובולי במוטנטים *mor1* וב- *rid5*. נראית התמיינות שורשים בצמחי הבר אך במוטנטים נראות חלוקות תאים ללא התמיינות. I, J. אנליזה כמותית של כמות היפוקוטילים עם פרימורדיות, שורשים, חלוקות תאים בלתי רגולריות (hyperplasia) או ללא חלוקות תאים בכלל (no). K-N. צביעה אימונו פלואורסנטית של מיקרוטובולי בתאי פרימורדיות בצמח הבר או במוטנט *mor1* ב29 מעלות. בעוד שהמיקרוטובולי נראים שלמים ומאורגנים בסיבים המקבילים זה לזה בתאי הפרימורדיה בזן הבר, מיקרוטובולי אינם נראים מסודרים בגוש התאים שנראים בלתי ממויינים שנוצר במוטנט.



איור 18 השרשת ייחורים בנוכחות אוריזלין. ייחורים יונילים מאיקליפטוס גרנדיס טופלו למשך 20 שניות ב 6000 ח"מ K-IBA ובריכוזים הכתובים בגרף של אוריזלין, חומר המפרק מיקרוטובולי. אחוזי השרשות ומספר שורשים לייחור נספרו לאחר חודש. נראית עליה משמעותית (Scheffe analysis $p < 0.05$) במספר הייחורים לייחור בנוכחות 300 ננומולר אוריזלין.

דיון

יעילות השרשה נמדדת בכמה פרמטרים: א. אחוזי השרשה, ב. מהירות השרשה, ג. אחידות בקצב ההשרשה. כל אחד מהפרמטרים הללו משפיע בצורה משמעותית על כמות העבודה שיש להשקיע בייצור שתילים. כאשר נפח עבודה רגיל במשתלות לייצוא כולל עשרות אלפים עד מאות אלפים ייחורים יש לכל שיפור קטן משמעות גדולה. כך יוצא שאם התקבלה הזמנה של 100,000 ייחורים מצמח שמשריש ביעילות של 50% על בעל המשתלה להשקיע כח אדם בהכנת 200,000 שתילים, אבל אם יעלות ההשרשה עולה ל-80% עליו להכין רק 125,000 שתילים. תוכנית המחקר המדווחת כאן משלבת מחקר לטווח הקצר, הבינוני והארוך. בטווח הקצר אנו בודקים טיפולים שונים על צמחי האם שהם בעלי פוטנציאל להשפיע על כל אחד מהפרמטרים הנזכרים לעיל. התמקדנו במספר גידולים: **1. שלושה זני גרבילאה** ('ג'ונסון', 'רובין גורדון' (RG) ו-'CVE') המשמשים לצמחי עציץ ולענפי קישוט ירוקים ופורחים. זנים אלו רגישים לעודפי זרחן ולמחסור בברזל ולכן מקובל להרכיבם על כנות עמידות. המחקר בדק יכול ענפים, פריחה והצלחת הרכבות. נמצא שבכול הצמחים לרשת הפנינה היה יתרון ברור על מספר הפרחים לצמח ומידת התפתחותם. כמו כן מבחינת יכול ענפים רוכבים יש יתרון משמעותי לרשתות הצבעוניות על הרשת השחורה בכול שלושת זני הגרבילאה. ענפים אלו משמשים גם כייחורים ליבוי. הרשתות הכחולה והצהובה בלטו ביכול גבוה ביחס לרשת השחורה בכול הזנים, ובצמחי RG גם רשת הפנינה העלתה מאוד את היכול. הרשת הצהובה העלתה באופן ניכר את יכול הענפים

בכול שלושת הניסויים בצמחי ג'ונסון ושני הניסויים בצמחי CVE. מכאן שהרשת שמעלה יכול ואחוזי הצלחת הרכבות בצמחי CVE היא הצהובה ובצמחי RG היא רשת הפנינה. 2. **צמחי הטרומליס** המשמשים לענפי קישוט ירוקים וענפים נושאי פירות. צמחים אלו קשים להשרשה. נמצא שרשת הפנינה בלטה ביכול ייחורים גבוה ביותר עם עליה של כמעט 20% במספר הייחורים ביחס לרשת השחורה הניטראלית. בנוסף נמצא שיכול הייחורים היה הגבוה ביותר תחת הרשת פנינה, ואחוז הייחורים שהשתרש היה גבוה יותר ברשתות הכחולה והפנינה ביחס לרשת השחורה והצהובה. 3. **צמחי עלי דפנה** המשמשים לצמחי עציץ ולצמחי תבלין. צמחים אלו קשים להשרשה. ניתן לקבוע שלייחורי עלי דפנה מצמחים שגדלו תחת רשת הפנינה יתרון ביעילות ההשתרשות שלהם ביחס לרשת השחורה. לסיכום התוצאות מראות שאכן ניתן להגדיל יכול ייחורים ולקצר וליעל את זמן השתרשותם על ידי הצללה ברשתות צבעוניות.

המחקר לטווח הבינוני כולל כיוול תנאים לריבוי צמחים קשי ריבוי במיוחד שלא ניתן להשרישם בשולחנות השרשה. קבוצת האיקליפטוסים אפורי העלים היא דוגמא טובה לצמחים שכאלו. איקליפטוס מון לגון הוא שיח יפהפה בעל עלים כחולים עד אפורים שמרובה היום מזרעים. מגוון צורות העלים והצבעים שונה מאד בין הזרעים ובשל כך אי אפשר ליצור ממנו מוצר אחיד ואיכותי. פיצוח תנאי הריבוי הקלונלי של איקליפטוס מון לגון בתרבות רקמה מהווה שלב ראשון בדרך לקראת פיתוח גידול חדש לענפי קישוט ולעציצים. בנוסף ריבוי של מגינית מגוונת ושל וורוניקה קשה בתנאים הרגילים ולפיכך פותחו פרוטוקולי ריבוי בתרבות רקמה.

בנושא המחקר התשתיתי קידמנו ניסוי רב היקף שכלל השוואת דגם ביטוי של גנים תוך כדי אינדוקציה להתפתחות שורשים מוספיים בייחורים צעירים בהשוואה לגנים שמתבטאים בייחורים בוגרים שאינם מפתחים שורשים מוספיים בתגובה לטיפול באוקסין. כמו כן הושוו הגנים המתבטאים בשני סוגי הייחורים האלו אבל לא טופלו באוקסין. הייחורים הבוגרים והצעירים נלקחו מצמח המודל איקליפטוס גרנדיס והם לפיכך בעלי רקע גנטי זהה. מניתוח התוצאות עולה שמירב ההבדלים בביטוי הגנים בין הדוגמאות השונות היה לאחר שישה ימים. מחקר מעמיק של הגנים שביטויים השתנה ביום הזה מראה על קבוצות גנים בעלי תפקודים שונים כמו פקטורי שיעתוק, אנזימי חימצון חיזור, קינאזות, גנים הקשורים לפעילות אוקסין וג'יברלין, גנים המשתתפים בדופן התא, בשלד המיקרוטובולי ובתנועה של וזיקולות ע"י מערכת האקטו-מיוזין. התמקדות בגנים הקשורים למערכת המיקרוטובולי חשפה שעירעור עדין של הדינמיקה שלהם יכול לשפר השתרשות בייחורים מעוצים. מכיוון שמיקרוטובולי משתתפים בבקרה על הרבצה של סיבי הצלולוז ולפיכך משפיעים על החוזק המכני של דופן התא, אבל גם מגיבים לסיגנלים מכאניים הנובעים משינויים בחוזק של דופן התא, אנו משערים שיש להם תפקיד בכווון שיח בין תאים מתחלקים החשוב לתיאום ביניהם בזמן ההתמיינות.

לסיכום עבודה זו מספקת הלכה למעשה מספר פתרונות ושיפורים פוטנציאליים עבור ריבוי צמחים קשיי ריבוי במשתלות. אף על פי כן הטמעה של הממצאים אצל חקלאים דורשת עבודה נוספת.

תקצירים של כל קבוצת מחקר בנפרד:

עינת שדות

מטרת המחקר המקורית הייתה לאפיין שינויים בביטוי גנים בזמן אינדוקציה להתמיינות שורשים אדוונטיביים בין ייחורים יובנילים לבוגרים ובין ייחורים שקיבלו טיפול באוקסין לבין ייחורי ביקורת משני הגילאים. זאת על מנת לאתר גנים שיוכלו לשמש בעתיד בפתרונות ביוטכנולוגיים ליעול השתרשות צמחים מעוצים בוגרים.

נערך ניסוי רב היקף של 32 שבבי דנ"א מאיקליפטוס גרנדיס באמצעותם נבדקו פרופילי ביטוי שונים של גנים בין ייחורים צעירים לבוגרים ובין ייחורי ביקורת לאלו שטופלו באוקסין. נמצא שביום השישי לאחר התחלת הניסוי נראים ההבדלים הגדולים ביותר בביטוי גנים בין כל הדוגמאות. הגנים חולקו לקבוצות תיפקוד שונות ונערכה ואלידציה לפרופיל הביטוי באמצעות שיטת ננוסטרינג. נעשו בדיקות אינדיווידואליות למספר גנים ואופיינו כאלו בעלי השפעה פוטנציאלית על התמיינות שורשים אדוונטיביים. נמצא גן לא ידוע המתואר כ- myosin related שהפרומוטור שלו זרז ביטוי של GFP בקצוות של שורשים, בפרימורדיות של שורשים צדדיים ואדוונטיביים וברקמה הסמוכה לצורות ההובלה בהיפוקוטיל של צמחי ארבידופסיס טרנסגנים. יש לציין שאיזור זה בהיפוקוטיל מהווה מקור להתמיינות שורשים אדוונטיביים. כמו כן נמצא הבדל בביטוי מור1, חלבון המבקר את הדינמיקה של שלד המיקרוטובולי. מיקרוטובולי משתתפים בחלוקות תאים, התארכות תאים ובקליטת אותות מכאנים כך שיש להם חשיבות בכל שלבי ההתמיינות של השורש האדוונטיבי. העקבות הממצא הזה גילינו שאמנם עירעור עדין של מיקרוטובולי תוך כדי טיפול באוקסין משפר השתרשות בייחורי איקליפטוס. זה מצביע על האפשרות שאחת מהבעיות בייחורים בוגרים הוא חוסר איזון בין הכח המכאני של הדופן, הדינמיקה של מיקרוטובולי וסיגנאלים של אוקסין. ידוע שכל השלושה קשורים בניהם במעגלים של היזון חוזר. אנו ממשיכים לעבוד ולאפיין גנים רלוונטיים להשתרשות למרות סיום המימון.

מיכל שמיר

מטרת העבודה הייתה לשפר מדדי שתלנות בצמחים שונים על ידי החלפת הרשת השחורה המקובלת לגידול צמחי אם ברשתות צבעוניות המשנות את ספקטרום האור המגיע לצמחים. שיפור מדדי שתלנות כמו יכולת קצב ומידת ההשתרשות של ייחורים, תוביל לחסכון בעבודה ידינית בגידול, ריבוי והרכבות של צמחים אלו. התמקדנו במספר גידולים: 1. **שלושה זני גרבילאה** ('ג'ונסון', 'רובין גורדון' (RG) ו-'CVE') המשמשים לצמחי עציץ ולענפי קישוט ירוקים ופורחים. זנים אלו רגישים לעודפי זרחן ולמחסור בברזל ולכן מקובל להרכיבם על כנות עמידות. נמצא שבכול הצמחים לרשת הפנינה היה יתרון ברור על מספר הפרחים לצמח ומידת התפתחותם. כמו כן מבחינת יכולת ענפים רוכבים יש יתרון משמעותי לרשתות הצבעוניות על הרשת השחורה בכול שלושת זני הגרבילאה. הרשתות הכחולה והצהובה בלטו ביכול גבוה ביחס לרשת השחורה בכול הזנים, ובצמחי RG גם רשת הפנינה העלתה מאוד את היכול. הרשת הצהובה העלתה באופן ניכר את יכולת הענפים בכול שלושת הניסויים בצמחי ג'ונסון ושני הניסויים בצמחי CVE. מכאן שהרשת שמעלה יכולת ואחוזי הצלחת הרכבות בצמחי CVE היא הצהובה ובצמחי RG היא רשת הפנינה.

2. **צמחי הטרומלים** המשמשים לענפי קישוט ירוקים וענפים נושאי פירות. צמחים אלו קשים להשרשה. נמצא שרשת הפנינה בלטה ביבול ייחורים גבוה ביותר עם עליה של כמעט 20% במספר הייחורים ביחס לרשת השחורה הניטראלית. בנוסף נמצא שיבול הייחורים היה הגבוה ביותר תחת הרשת פנינה, ואחוז הייחורים שהשתרש היה גבוה יותר ברשתות הכחולה והפנינה ביחס לרשת השחורה והצהובה. 3. **צמחי עלי דפנה** המשמשים לצמחי עציץ ולצמחי תבלין. צמחים אלו קשים להשרשה. ניתן לקבוע שלייחורי עלי דפנה מצמחים שגדלו תחת רשת הפנינה יתרון ביעילות ההשתרשות שלהם ביחס לרשת השחורה.

משה ראובני

הבעיה כשר השתרשות נמוך של צמחי נוי מהווה צוואר בקבוק במשתלות עציצים וחומר ריבוי ומצריך ויתור על גידול צמחים פוטנציאליים אלו כצמחי נוי או גינה. **סיכום העבודה:** בחרנו כמה צמחים על מנת לפתח פרוטוקול ריבוי מהיר ופרוטוקול השתרשות. למעוצה אקליפטוס מון לגון, מגיאופיטים מגינית ומעשבונים ורוניקה. לכל שלושת הצמחים פותח במהלך שלושת השנים פרוטוקול ריבוי בתרבית ופרוטוקול השרשה כך שניתן כיום להשתמש בפרוטוקולים הללו באופן מסחרי על ידי המגדלים.

רון אופיר

הצגת הבעיה כשר השתרשות נמוך של צמחי נוי מהווה צוואר בקבוק במשתלות עציצים וחומר ריבוי ומצריך כח אדם רב בשלבי הייצור. **מטרות המחקר** של תוכנית זו הן לפתור בעיות ריבוי של צמחי נוי בעלי חשיבות כלכלית על מנת להקטין את כח האדם במשתלות. במסגרת החלק המולקולרי של המחקר נעשה מחקר מעמיק של המנגנונים העומדים בבסיס התמיינות שורשים מוספיים בצמחים קשי השתרשות על מנת לפתח בעתיד פתרונות ביוטכנולוגים לעידוד השתרשות בצמחים כאלו. אחד הכוונים היה לסרוק עבור גנים שהביטוי שלהם קשור בהשרשה לאחר טיפול באוקסין בנסיון לזהות באיזה שלב של ההתפתחות השורשים משפיע הטיפול. הוקמה המערכת הביולוגית הניסויית שכוללת 60 עצי איקליפטוס. נלקחו ייחורים בוגרים וצעירים שטופלו באוקסין והושרשו בשולחן השרשה. רנ"א הופק מדוגמאות בזמנים שונים ובשלוש חזרות ביולוגיות. השבבים הוזמנו 66 הדוגמאות של רנ"א נבדקו והוכנו להיברידיזציה. כאן נכנס החלק הביואינפורמטי בשלושה תחומים: תכנון הניסוי, תכנון שבב הדנ"א, ואנליזת התוצאות בדרכים שונות. תכנון הניסוי היה עבור ניסוי של מיקוראריי בשני צבעים בצורה שהרעש הטכנולוגי/ביולוגי יהיה מינימלי. תוכנון שבבים בהסתמך על בסיס הנתונים הקיים של רצפי דנ"א של איקליפטוס גרנדיס שמשמש כצמח מודל. ונעשה ניתוח בשתי גישות: גישה מונחת שאלות, כלומר ניתוח סטטיסטי מבוסס מודלים ליניאריים ותיקון השונות הנובע ממדגם נמוך (שלוש חזרות בלבד), וגישה חיפוש שאינו מונחה שאלות שמבוסס על יצירת צברים של גנים שדומים בפרופיל הביטוי שלהם. הגישה הסטטיסטית הוכחה כיעילה יותר במקרה זה והיותה בסיס להמשך העבודה המולקולארית.

1. H. T. Hartmann, D. E. Kester, F. T. Davies, *Plant Propagation: Principles and Practices* (Prentice-Hall International, Inc., Englewood Cliffs (NJ), 1990), pp.
2. B. K. Maynard, N. L. Bassuk, *Proceedings of International Plant Propagators Society* **35**, 487 (1985).
3. A. Pacholczak, W. Szydło, A. Lukaszewska, *Acta Physiologiae Plantarum* **28**, 567 (2006).
4. A. Z. J. Pacholczak, W. I. S. Szydło, A. S. Lukaszewska, *Acta Physiologiae Plantarum* **27**, 417 (2005).
5. E. Nicolini, B. Chanson, F. Bonne, *Annals Of Botany* **87**, 737 (Jun, 2001).
6. M. Bollmark, L. Eliasson, *Physiologia Plantarum* **80**, 527 (Dec, 1990).
7. M. S. Greenwood, *Tree Physiol* **15**, 433 (Jul-Aug, 1995).
8. R. S. Poethig, *Science* **250**, 923 (Nov 16, 1990).
9. M. S. Greenwood, *Plant Growth Regul* **6**, 1 (1987).
10. D. M. Paton, R. R. Willing, W. Nichols, L. D. Pryor, *Aus J Bot* **18**, 175 (1970).
11. G. A. Tuskan *et al.*, *Science* **313**, 1596 (Sep 15, 2006).
12. G. A. Ramirez-Carvajal, A. M. Morse, C. Dervinis, J. M. Davis, *Plant Physiol* **150**, 759 (Jun, 2009).
13. C. G. Rasmussen, J. A. Humphries, L. G. Smith, *Annu Rev Plant Biol* **62**, 387 (Jun, 2011).
14. G. O. Wasteneys, *J Cell Sci* **115**, 1345 (2002).
15. G. O. Wasteneys, *Curr Opin Plant Biol* **7**, 651 (Dec, 2004).
16. G. O. Wasteneys, M. Fujita, *J Plant Res* **119**, 5 (Jan, 2006).
17. O. Hamant *et al.*, *Science* **322**, 1650 (Dec 12, 2008).
18. M. Konishi, M. Sugiyama, *Development* **130**, 5637 (Dec, 2003).
19. A. T. Whittington *et al.*, *Nature* **411**, 610 (2001).
20. E. Kawamura, G. O. Wasteneys, *J Cell Sci* **121**, 4114 (Dec 15, 2008).
21. A. Ballester, M. C. San-Jose, N. Vidal, J. L. Fernandez-Lorenzo, A. M. Vieitez, *Ann Bot* **83**, 619 (1999).
22. M. S. Greenwood, X. Cui, F. Xu, *Physiol Plant* **111**, 373 (Mar, 2001).
23. N. Vidal, G. Arellano, M. C. San-Jose, A. M. Vieitez, A. Ballester, *Tree Physiol* **23**, 1247 (Dec, 2003).
24. M. Uyttewaal *et al.*, *Cell* **149**, 439 (Apr 13, 2012).

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.
מטרות המחקר מולאו
עיקרי הניסויים והתוצאות.
א. טיפולים בצמחי אם: גידול צמחי גרבילאה, עלי דפנה והטרומליס תחת רשתות צל צבעוניות ובחינת השפעת הרשתות על הצימוח, יכול הייחורים ומידת השתרשותם. נמצאו הרשתות שנתנו תוצאות אופטימאליות ב. פיתוח פרוטוקול לריבוי איקליפטוס מון לגון בתרבית רקמה. כוייל פרוטוקול ג. הקמת מערכת לבירור ביטוי גנים דיפרנציאלי בייחורים צעירים תוך כדי השתרשות בהשוואה לייחורים בוגרים מטופלים באוקסין שאינם משרישים ובהשוואה לייחורים זהים ללא טיפול באוקסין. נמצאו מספר גנים פוטנציאליים, העבודה נמשכת.
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?
ישום המחקר במשקים חקלאיים מותנה בבדיקות נוספות
1. בעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתרה לביצוע תוכנית המחקר?
המחקר לבירור גנים רלוונטים לשיפור השתרשות ייחורים בוגרים מאיקליפטוס נמשך
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - <u>ציטט</u> ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פטנטים - יש לציין שם ומס' פטנט; הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.
עדין לא הופצו פרטים
פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)
רק בספריות <
ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט) X <
חסוי - <
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן* - לא -