

דו"ח סופי של תוכנית מחקר מס' 203-0639-06  
מוגש לקרן המדען הראשי של משרד החקלאות

**פיתוח אגסים משופרים באמצעות אגס חסר יובניליות**

**DEVELOPMENT OF NEW PEAR VARIETIES BY THE USE OF JUVENILE  
FREE THCHNOLOGY**

**צוות המחקר:**

**חוקר ראשי: משה פליישמן**

יובל כהן, זאב יבלוביץ, שרה גולובוביץ, רעיה קורצ'נסקי

המחלקה למדעי עצי הפרי, המכון למדעי הצמח, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן

דורון הולנד

המחלקה למדעי עצי הפרי, המכון למדעי הצמח, מנהל המחקר החקלאי, נווה יער

רפי שטרן

מיג"ל, מו"פ צפון

אלון סמך

המכון למדעי הצמח והגנטיקה בחקלאות, הפקולטה לחקלאות, א. עברית, רחובות

**כתובת אלקטרונית: [vhmoshea@agri.gov.il](mailto:vhmoshea@agri.gov.il)**

**הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים**

חתימת החוקר הראשי:

נוב' 2009

חשוון תש"ע

## 1. תקציר

משך היובניליות, פרק הזמן שבו נכנס העץ לפוריות, באגס היא ארוך ביותר ונמשך כ-10 שנים. לשם קיצור היובניליות באגס ה'ספדונה', בודדנו את הגן TFL1 מאגס ומסגרת הקריאה במלואה שובטה לפלסמיד בינארי המאפשר השתקה של גנים בשיטת ה-RNAi. באגס מהזן 'ספדונה' התקבל קו התמרה בודד המכונה 030. נמצא כי באגס המותמר חלה שבירת היובניליות והוא פורח בתרבות הרקמה כחודשים לאחר ההתמרה, ולאחר האבקה חנטו פירות בתרבות. לאחר ריבוי והשרשה של הצמחים המותמרים התקבלו שתילים פורחים בחממה הטרנסגנית. מצאנו כי האגס הפורח אינו יוצר תפרחת מעורב כמו האגס הנורמלי אלא פרחים בודדים. כמו כן בתנאי הגידול של החממה הטרנסגנית אורך יום ארוך 16 שעות וטמפרטורה קבועה של 23-25 מ"צ האגס פיתח פרחים בחממה הטרנסגנית בכל תקופות השנה.

בשנת המחקר הראשונה ביססנו מטע של זני אגס בוגרים בדליים ו'מטע' ננסי של זני אגס חסר יובניליות על ידי שיטת הרכבות חדשה שפותחה על ידנו כאשר הזן 030 מקורו בתרבות רקמה המורכבת ישירות על שתילים צעירים של כנת 'בטוליפוליה'. כמו כן ביצענו הכלאות רציפרוקליות בין הזן 030 לזן 'קוסטיה' וזנים אחרים. מצאנו כי בידנו מצויה שיטה לקיצור יובניליות של מכלואים באגס. בשנת העבודה השניה השתמשנו ב'מטע' ננסי של אגס חסרי יובניליות לשם הכלאות עם אבקה של זני האגס שנאספו מחוות מתתיהו, אבקה של זן אגסים המגלה עמידות לחרכון וזן אגסים שלו ציפה אדומה. צאצאים של הכלאות אלו גדלים כעת בחממה הטרנסגנית ובבדיקת PCR נראה שהם מכילים את הגן הזר. כמו כן, בחנו את אופן ההורשה של המחדר הטרנסגני ומצאנו כי מרבית הצאצאים מכילים את מחדר טרנסגני. הורשה שכזו מצביעה על אפשרות של קיום יותר ממחדר אחד בקו 030. בכדי לבחון זאת בדרך נוספת ביצענו Southern blot ומצאנו כי קו 030 מכיל 3 מחדרים. בבדיקה של צמחי F1 הפורחים, מצאנו סגרציה בכמות המחדרים. בחלקם הופיעו 3 מחדרים אך בחלק מהם הופיע מחדר בודד ובמיעוט מקרב הצאצאים לא הופיע מחדר כלל.

בשנת העבודה השלישית המשכנו לבצע הכלאות וכן בחנו את צאצאי הכלאות שהתקבלו. מצאנו כי ניתן לקבל צאצאי F2 חסרי יובניליות. לסיכום תוצאות של שנת המחקר השלישית נראה כי בידנו מערכת מינה קיצור יובניליות של אגס ה'ספדונה'. בכדי לבחון האם מערכת קיצור היובניליות שבידנו מתאימה גם לזני אגס אחרים ביצענו התמרה גנטית לזן האגס 'קונפרנס' קיבלנו 3 קווים מותמרים מתוכם נמצא כי אחד הקווים פרח בחממה לאחר 10 חודשים.

לסיכום: ביססנו מערכת לקיצור יובניליות בשני זני אגס ב'ספדונה' ובזן 'קונפרנס'. בזן 'ספדונה' קבלנו צאצאים חסרי יובניליות וניתן יהיה להשתמש בצאצאים אלו ובמיכלואים נוספים שנעמיד בעתיד כדי להעמיד תוכנית השבחה בעצי אגס בזן המקומי בישראל. בתוכנית השבחה כזו ניתן יהיה לבצע לראשונה בעולם הכלאות מחזירות לצורך קבלת עמידות למחלות.

## 2. מבוא ותאור הבעיה

בישראל מגדלים מגוון מצומצם של אגסים, בעיקר את הזן 'ספדונה'. בנוסף מגדלים את הזנים 'גנטיל', 'קוסטיה' ו'ספדונצ'ינה', המשמשים במטע בעיקר כמפרים של 'ספדונה'. אלו הם זנים ירוקים שהגדול ביניהם, 'ספדונה', מגיע

בעקבות טיפולי ציטוקינים לקוטר של כ-65-60 מ"מ. הזנים הנטועים בחלקות המסחריות הינם זנים שמקורם באיטליה ומשמשים את ענף האגס יותר מ-30 שנה. בשנים האחרונות מיובאים מידי חורף כ-2,000-4,000 טון של זני אגס, ירוקים וצבעוניים בגדלים של 65-75 מ"מ, מאירופה. באירופה מגדלים למעלה מ-40 זני אגס מסחריים שונים. הזנים מצטיינים בגודל פרי של כ-200-300 גר' ובצבעים של ירוק, אדום, ביקולור (ירוק עם לחי אדומה), צהוב וזנים חומים. הטעם של זנים אלו הוא לרוב חמאתי, בהשוואה לטעם העסיסי מתוק של ה'ספדונה'. כמו כן, הזנים באירופה הם פוריים מאד ומניבים מידי שנה יכול גבוה של 3-4 טון לדונם בהשוואה לרמת יבולים נמוכה עד כדי 50% במטעי ישראל. הזנים באירופה, הם תוצרי השבחה שנעשית בארצות בהן עצי הפרי העיקריים הם נשירים כמו צרפת, אנגליה, קנדה, ארה"ב וניו-זילנד. זנים אלו מאופיינים בדרישות קור גבוהות ולכן אינם יכולים לגדול ולהניב פרי איכותי באזורי הגידול השונים בארץ. במהלך שלושים השנים האחרונות נעשו מספר ניסיונות לאינטרוודוקציה של זני אגס מאירופה. בפועל, עד היום לא הצליחו לגדל בהצלחה זני אגס חדשים בנוסף ל'ספדונה'. נראה של'ספדונה', מלבד היותה זן ידוע ומקובל בקרב הצרכנים, התאמה פיזיולוגית גבוהה במיוחד לגידול בתנאי הארץ. לכן, כל תוכנית השבחה באגס לגידול בישראל, צריכה להיות מבוססת על ה'ספדונה'. ל'ספדונה' תכונות רצויות כמו: דרישות קור נמוכות (הזן נטוע מדביר בדרום ועד מטולה בצפון), טעם עסיסי וצבע ירוק. לעומת היתרונות הללו מצויות בו תכונות שרצוי לשפר כמו גודל הפרי, צבע, פוריות ורגישות למחלות. בשיתוף עם חקלאים ומדריכי שה"מ נבנו התכונות הרצויות באגס העתידי: גודל פרי 65-75 מ"מ, צורת פרי עגולה או מאורכת, צבע ירוק או ביקולור, טעם עסיסי (בדומה ל'ספדונה') או חמאתי, זן מדורבן פורה, דרישות קור נמוכות ומשך אחסון של כ-6 חודשים לפחות. כמו כן, על הזנים החדשים לגלות עמידות לחיכוך ופסילת האגס.

מטרת המחקר היא לפתח את התשתיות לתוכנית טיפוח אגס בישראל. להערכתנו, זנים מהשבחה מקומית בעלי פרי איכותי, מופע מרשים ואיכות וכושר שימור גבוהים המסוגלים לגדול באקלים החם של מדינת ישראל יקנה למגדלי האגס הישראליים יתרון תחרותי שיתבטא ביכולת המכירה וקבלת מחיר גבוה בשוק המקומי ותחרותיות מול אגסים מיובאים. ברשותנו מצוי מאגר זני אגס ירוקים בעלי דרישות צינור נמוכות: 'טוסקה', 'אטרוסקה', אגס 2 ('דגן'), 'דלברט פרמייר', 'דר' ג'יל ג'ויו', 'ולאוסן' וזני אגס בעלי דרישות קור גבוהות, הנחלקים לפי הצבע: א. זנים אדומים כגון: 'קסקד', 'פורל', 'רוזמרי', 'בון-רוז', 'רד-קלפ' ו'סנסיישן'; ב. זנים ירוקים כמו: 'בוסק', 'קומיס' 'אבטה-פטל', המצטיינים גם בגודל הפרי.

לאחרונה, פותחו מספר כלים מולקולריים (גנומיים) שבאמצעותם ניתן לאפיין תכונות רצויות של הפרח והפרי בשלב הנבט. בנוסף לסמנים הגנטיים פותח לאחרונה במעבדתנו אגס חסר יובנליות. היובנליות באגס ה'ספדונה' מגיע ל-10 שנים. רק לאחר 10 שנות גידול ניתן לקבל פרחים ממכילאים לבצעה בהם הכלאות ולבחון את איכות הפרי. תוכנית עבודה זו מבוססת על יצירת אגס חסר יובנליות שהתקבל בעקבות התמרה גנטית שבה דוכא הביטוי של הגן TFL-1 שבודד באגס. השילוב של סמנים גנטיים ויצירת אגס חסר יובנליות, שבו ניתן יהיה לקבל פירות ולאפיין את תכונותיהם בדרך שבה מזהים ובוררים תכונות בצמחים חד שנתיים, מהווה מהפכה בהשבחה של אגסים. להערכתנו, תוכנית השבחה שתאפשר זיהוי מוקדם של תכונות הפרי בשילוב עם סמנים גנטיים יכולה להביא לפיתוח מהיר וזול של זנים חדשים. מטרת התוכנית לבחון את משך קבלת הדור והתפלגות התכונות בצאצאי ההכלאות והדרך זו לבסס את האגס חסר היובנליות כציר מרכזי בתוכנית השבחה אגס בישראל.

### 3. תוצאות

#### א. הכלאות של זן האגס המותמר חסר היובניליות 030 עם אבקה של זן האגס 'קוסטיה'

בתוצאות מקדימות בודדנו את הגן TFL1 מתפוח ואגס. הגן הראה הומולוגיה ברמת מעקובת ה-DNA של מעל 95% בין שני המינים. מסגרת הקריאה במלוואה שובטה לפלסמיד בינארי המאפשר השתקה של גנים בשיטת ה-RNAi. ביצענו מספר ניסיונות התמרה של הפלסמיד לתפוח ואגס. באגס מהזן ספדונה התקבל קו התמרה בודד. במהלך השנים האחרונות ביצענו עשרות ניסיונות התמרה נוספים באגס עד כה לא קבלנו קווי התמרה נוספים באגס. נמצא כי האגס המותמר חלה שבירת היובניליות והוא פורח בתרבית הרקמה כחודשים לאחר ההתמרה, ולאחר האבקה חנטו פירות בתרבית. לאחר ריבוי והשרשה של הצמחים המותמרים התקבלו שתילים פורחים בחממה הטרנסגנית. הפרחים המותמרים היו נורמאליים. מצאנו כי הפריחה אינה מושפעת מסינאליים סביבתיים. האגס הפורח פיתח פרחים בחממה הטרנסגנית בכל תקופות השנה בלי להתחשב באורך היום.

במהלך שנת העבודה הראשונה ביצענו הכלאות של זן האגס המותמר חסר היובניליות 030 וזן האגס 'קוסטיה'. (כמקור אבקה) מטרה ההכלאות הייתה:

- א. לבסס את תהליך ההכלאות בזן 030.
  - ב. לבחון את איכות הפרי המתקבלת.
  - ג. לבסס את תהליך ההכמנה והנבטת הזריעים.
  - ד. לבחון האם תכונת חוסר היובניליות יכולת לעבור בהורשה.
  - ה. לבחון את משך התהליך מהאבקה ועד לקבלת לפרח חיוני בדור F1.
- בתחילת שנת העבודה עמדו לרשותנו מלאי מוגבל של צמחי 030 מושרשים וגדולים. השתמשנו בצמחים אלו לביסוס תהליך ההכלאות. לאחר סרוס הפרחים האבקנו באמצעות מכחול את קו 030 עם אבקה של הזן 'קוסטיה'. הצמחים נשאו פירות בקוטר פרי קטן של 35-45 מ"מ. הפירות הגיעו להבשלה והתרככות. בעיתוי ההבשלה הפירות היו מתוקים והכילו רמות סוכר דומות לאילו של פרי בשל נורמאלי.

#### ב. יצירת 'מטע' של צמחי 030 בחממה הטרנסגנית.

לשם הריבוי של קו 030 וביסוס 'מטע' יצרנו מערכת של הרכבות בשלב ראשון ביצענו הרכבות עין של חומר רדום ששהה בחדר קור. תהליך פריצת העין הינו ממושך ועד קבל צימוח ופריחה חולפים כ-7 חודשים. כדי להאיץ את ביסוס המ'מטע' בחנו במהלך שנת העבודה הראשונה יצירה של הרכבות ראש מחומר בתרבית רקמה.

תמונה מס' 1 מראה את מהלך הביסוס של הרכבת ראש מתרבית רקמה. מהרכבה ועד פריחה חולפים כ-70 ימים בתנאי גידול של 25 מ"צ באורך יום של 16 שעות אור.



Tissue culture

**תמונה מס' 1. מהלך ביסוס של הרכבת ראש מתרבית רקמה של קו 030 על כנת 'בטוליפוליה'.**

באמצעות מערכת ההרכבות של חומר מתרבית הרקמה הצלחנו להתגבר על נקודת כשל מרכזית ביצירת 'מטע' ננסי להכלאות והיא מחסום ההשרשה של הזן 'ספדונה'. ההרכבות שביצענו במהלך הפרויקט היו על שתי כנות אחת כנת החבוש והשניה על גבי כנת 'בטוליפוליה'. מצאנו כי ההרכבות מצליחות יותר טוב על כנת ה'בטוליפוליה' ולכן מרבית המטע שיצרנו היה על כנה זו. יכולת ההרכבה של חומר מתרבית רקמה משמשת אותנו גם לריבוי מהיר של מכלואים. אנו מרבים חומרי צמחי של מכלואים בתרבית ומרכיבים אותו על גבי כנת ה'בטוליפוליה'.

**ג. איפיון תנאים ליצירת אבקה חיונית של זן האגס חסר היובנליות**

לשם ביצוע ההכלאות נאספה אבקה מצמחי 030 ונעשתה בדיקה לחיוניות האבקה בהתאם לשיטות המקובלות במעבדתנו. בניסיונות ראשונים נראה כי האבקה בזן האגס חסר היובנליות אינה חיונית. לא התקבלה כל נביטה גם לאחר 48 שעות. בהסתכלות מיקרוסקופית נראה כי נוצרים אבקנים אך המאבקים אינם נפתחים ולא משחררים אבקה. חימום של גרגירי האבקה תחת מנורה דולקת למשך של 12-16 שעות גרם לשיפור בפתיחה המאבקים ושחרור של האבקה. לאחר טיפול זה התקבלה חיוניות של כ-35% בנביטת האבקה.

**ד. משך הפריחה ויכולות האבקה בתקופות השונות במהלך השנה.**

אחת התופעות המעניינות בנוסף לקיצור יובנליות היא שצמחי 030 הגדלים בטמפ' של 25 מ"צ באורך יום ארוך (16 אור/8 חושך) מסוגלים לפרוח בתקופות שונות במהלך השנה. בחנו האם ישנה ירידה בחיוניות הפרחים במהלך תקופות השונות. ביצענו הכלאות (033 X 'קוסטיה') בארבעה תאריכי גידול שונים באמצע חודש מרץ, בראשית האביב, זמן הפריחה הטבעי. בחודש יוני בחודש אוגוסט ובחודש נובמבר. טבלה מס' 1 מסכמת את חיוניות הכלאות בתקופות השנה השונות.

**טבלה מס' 1. חיוניות הכלאות בתקופות השנה שונות.**

מספר הכלאות	הכלאה במרץ	הכלאה ביוני	הכלאה באוגוסט	הכלאה בנובמבר
30	30	30	30	30
מספר פירות	17	14	10	7
% חיוניות הכלאות	56	46	33	23

נראה כי אחוז הצלחת ההכלאות הגבוה ביותר מתקבלת במהלך חודש מרץ ובחודש יוני. בהמשך במהלך הקיץ והסתיו יורד אחוז הצלחת ההכלאות.

**ה. חיוניות הכלאות ומספר פירות לעץ**

העצים העומדים לרשותנו הם קטנים וקומפקטיים ולכן בחנו מהי הכמות הראויה של מיכלואים שניתן לגדל על עץ שכזה כדי לקבל פירות ראויים שניתן יהיה לבחון בהם את איכות הפרי. טבלה מס' 2 מסכמת ניסוי של הכלאות (X 033 'קוסטיה') שלאחריהן השארנו מספר פירות שונה על גבי העץ.

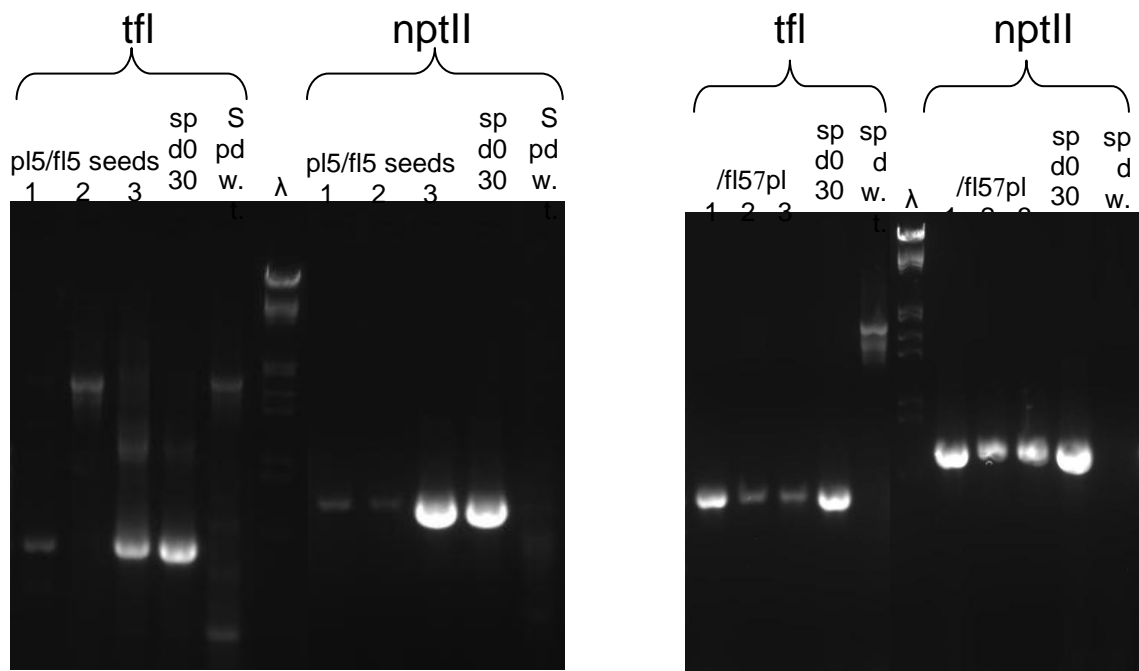
**טבלה מס' 2. מספר הפירות החיוניים שניתן להשאיר על עצים במטע הננסי.**

פרי בודד	3 פירות	5 פירות	8 פירות	
0	20	50	50	אחוז נשירה
90	80	25	20	אחוז הבשלה

מתוצאות הניסוי שביצענו נראה כי לא ניתן להעמיס על עצי ה'מטע' הננסי יותר מ-3 פירות לעץ. כמו כן, יש להוריד את הפרחים החדשים הנוצרים ולמנוע את ההיווצרות של פירות פרתנוקרפיים.

**ו. איפיון מולקולארי של מכלואי X 030 קוסטיה**

מהפירות השונים נאספו 10 זרעים. מהפירות נאספו זרעים שעברו הכמנה במשך 3 חודשים והונבטו בגלילון השרשה בחממה הטרנסגנית. מרבית הזרעים (80%) נבטו בחממה. במבחן PCR שנעשה לכל הזרעים (מיצוי DNA שעליו נעשתה ריאקציה עם פריימרים של הגן הסלקטיבי קנמיצין והגן TFL-1) נמצא כי מבין שמונת הזרעים שהתקבלו ארבעה זרעים הם טרנסגנים והאחרים אינם מגיבים עם הפריימרים השונים.

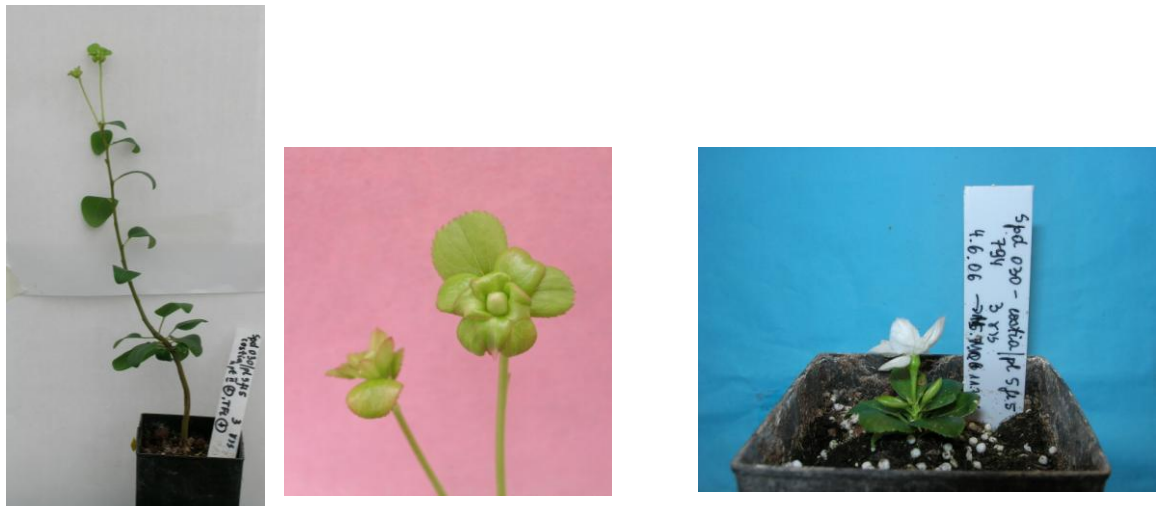


תמונה מס' 2 : ריאקציית PCR של זרעי X 030 'קוסטיה'. בתמונה רואים כי בקרב נבטים אלו, יש 4 טרנסגנים חיובי – pl5/fl5 זרעים 1 ו-3 ו- pl5/fl7 זרעים 1 ו-3.

הנבטים גדלו בחממה במשך 3 חודשים לאחר שהם נמצא כי אחד הנבטים פרח וחודש מאוחר יותר פרח הנבט השני (תמונה מס' 2). שני הנבטים המותמרים האחרים לא פרחו עד כה.

**ז. האם נבטים טרנסגניים של הכלאות עם 030 הם חסרי יובנליות?**

למרות שהזן 030 הוא חסר יובנליות היה חשוב לבחון האם תכונה זו מועבר בתורשה לצאצאים. נבטים לאחר הכמנה נשתלו בחממה האר מסגנית ובחנו בהם את משך הזמן של יציאה מיובנליות. מתוך 4 נבטים שקיבלנו בהכלאה 3 פרחו במהלך 1-5 חודשים ונבט רביעי פרח לאחר 19 חודשים. לעומת זרעי של 'ספדונה' שפורחים לאחר 10 שנים מנביטה נראה כי בכל מכלוא שבו מצוי מחדר טרנסגני מתקבל קיצור משך היובנליות. פרחים של נבטים השונים מוצגים בתמונה מס' 3. צמחי F1 הוכלאו עם אבקה של זן האגס קוסטיה וכשנה לאחר הפריחה קבלנו זרעים של F2. נראה כי באמצעות השיטה לקיצור יובנליות בחלק מהמיכלואים ניתן לקבל זרעים כשנה לאחר ההכלאות... אך, קיימים מכלואים שבהם מתקבל הפרח רק לאחר יותר משנה מההנבטה. הסיבות לכך יובהרו בהמשך.



תמונה מס' 3. מהלך יצירת הרקמה הרפרודוקטיבית בצמח F1 מההכלאה בין X030 'קוסטיה'.

**ח. הכלאות בין הזן 030 (כמקור אבקה) וזני אגס שונים.**

**ביסוס זני אגס שונים בכלים ניידים לביצוע הכלאות בחממה הטרנסגנית**

בשנה העבודה הראשונה התחלנו במהלך של ביצוע הכלאות בין האגס הטרנסגני חסר היובנליות וזני אגס שונים. בשלב ראשון ביססנו זני אגס שונים בוגרים בכלים ניידים כדי שיגדלו בחממה הטרנסגנית (ראו תמונה

טבלה מס' 3: שמות זני האגס ותכונות פרי עיקריות.

הזן	תכונות הפרי
'בון רוז'	לחי אדומה
'קסקד'	קליפה אדומה
'רד קלאפ'	קליפה אדומה, פרי גדול
'אבטה פטל'	קליפה ירוקה, פרי גדול
PGR`	קליפה ירוקה
'בוסק'	קליפה אדומה
'רוזמרי'	לחי אדומה

מס' 4). לשם כך, העברנו זני אגס בוגרים, בני 3-7 שנים, מחוות מתתיהו לגידול במיכלים גדולים של 70 ליטר (אשפתונים) בחממה הטרנסגנית בבית דגן. בשנה הראשונה הזנים הועברו במהלך חודש מרץ לאחר שרכשו מכסות צינור בחוות מתתיהו ובאביב, ומרביתם פרחו בבית דגן. בהמשך נמצא כי הזנים שגדלו בחוות מתתיהו הם דורשי קור רב, כדי לאפשר גידול ופריחה נאותה של הצמחים העברנו אותם במהלך החורף לחדרי קירור למשך 3-4 חודשים ב 3 מ"צ. לאחר שהות בחדרי הקור הזנים פרחו וניתן היה לבצע בהם הכלאות ולהפיק מהם אבקה. טבלה מס 3 מסוכמים שמות הזנים שהובאו ותכונות הפרי בזנים השונים.



תמונה מס' 4. זני אגס גדלים באשפתונים בחממה בבית דגן.

**הכלאות בין הזן 030 (כמקור אבקה) וזני אגס שונים.**

טבלה מס' 4 מסכמת את ההכלאות שבוצעו בשנה הראשונה בין זני האגס השונים שגודלו בדלים. בזנים השונים ביצענו הכלאות עם 030 וביקורת באמצעות אבקה של 'ספדונה' לא מותמרת. מבין הזנים השונים הזן 'רוזמרי' לא פיתח כלל פרחים ולכן לא הוכלא זני האגס 'בוסק' ו'אבטה פטל' הוכלא אך לא התפתחו כלל פירות. זן 'קסקד' פרח מאוחר בעונה ורב החנטים נפלו. בתמונה מס' 5 ניתן לראות את חנטי האגס המתפתחים לאחר ניסיונות ההאבקה. סך הכל למרות ניסיונות ההאבקה המרובים מספר הפירות שהתקבלו היה קטן

**טבלה מס' 4 : סיכום ההכלאות מכוונות, מספר פירות וזרעים בין האגס חסר היובניליות וזני אגס שונים (בשנה הראשונה).**

שם הזן	מס' הכלאות	מס' פירות	מספר זרעים
PGR	60	17	18
Red clap	60	1	0
בון רוז'	30	3	9
קסקד	50 (העץ התייבש ורוב החנטים נפלו)	3	2

ובעיקר הזן אחד ב-PGR. נראה לנו כי למרות שנוצרו פרחים במהלך ההעברה ממתתיהו יש בעיה של חיוניות בפרחים שנוצרו במרבית הזנים. ניסיונות הכלאה שנעשו בשנים הבאות גם הם לא צלחו. גם גידול בחוות מתתיהו של זני האגס דורשי הקור הרב לא צלח. תוצאה זו מראה פעם נוספת את מידת ההתאמה



הרבה של הזן 'ספדונה' לתנאי הגידול בארץ ישראל. עיקר ההצלחות בהכלאות היו בזנים בעלי דרישות קור נמוכות אבקה חיונית שהובאה מחו"ל (ראו תוצאות בהמשך).



תמונה מס' 5. חנטים מתפתחים לאחר הכלאות עם אבקה של זן האגס חסר היובנליות.

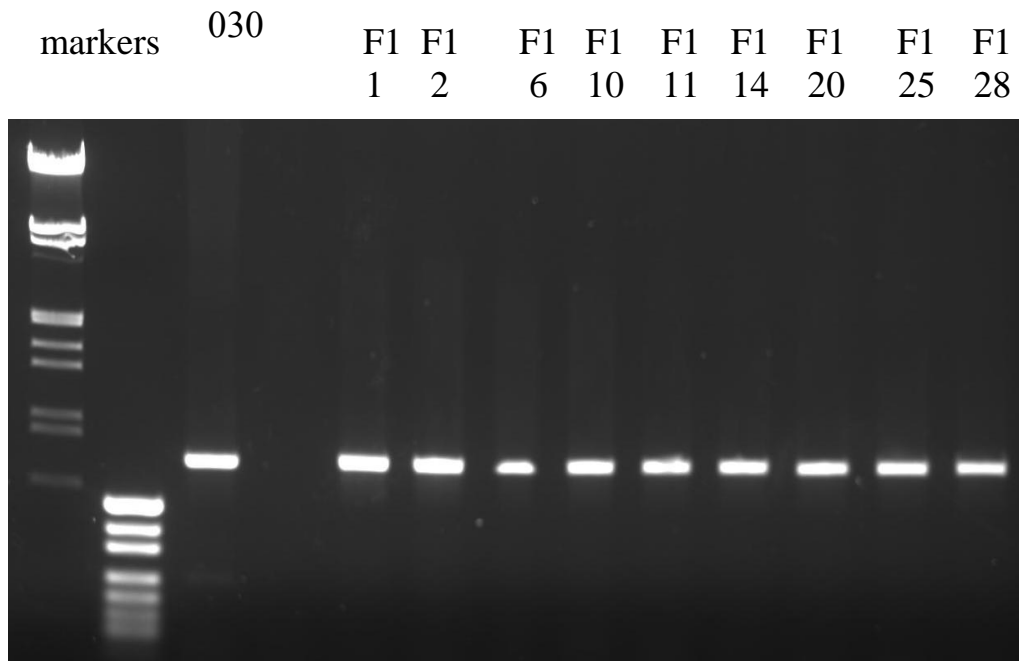
טבלה מס' 5 : סיכום ההכלאות מכוונות, מספר פירות וזרעים בין האגס חסר היובנליות וזני אגס שונים (בשנה השניה).

מס' פורחים	כמות צמחים	אחוז נביטה	מס' נבטים	מס' זרעים	מס' פירות	♀	♂
					אין פרי	Abata patel	Spd030
	6	100	6	6	4	Bon Roge	Spd030
	0	50	1	2	4	Cascade	Spd030
1	3	85	6	7	15	PGR	Spd030
				0	1	Red clap	Spd030
					אין פרי	Forel	Spd030

במהלך השנתיים שבהם ביצענו הכלאות בין זני האגס השונים והקו המותמר 030, מרבית החנטים החיוניים התקבלו בזן בון PGR התפתחו לפירות ומהם נאספו בסה"כ 21 זרעים (ראו טבלאות מס' 4 ו-5). הזרעים הונבטו לאחר תקופת הכמנה של 3 חודשים בקור. רק 12 הזרעים בהכלאה עם PGR נבטו הושרשו ולאחר הקשחה בערפול בחממה הועברו לעציצים. 2 זרעים התמוטטו ומהם נילקח חומר צמחי לגידול *in vitro* בתרביות ריקמה.

חלק מהנבטים נבטו וצומח ובחלקם יש הפסקת הגידול והם מפתחים פקע טרמינאלי. לאחר כשנתיים גידול בחממה נראה כי מתוך 12 זרעים 9 מהם מכילים את המחזר. כעת פרחו מתוך ה-9 רק 4. נראה כי שבירת היובנליות אורכת זמן רב יותר בחלק מהצאצאים עם הזן PGR. תמונה מס' 6 מראה כי מבין הזרעים שהתקבלו מצויים 9 זרעים טרנסגניים בכל הזרעים הללו התקבל מקטע בגודל צפוי של 700bp. במהלך שנת העבודה השניה פרחו 4 נבטים. הפריחה הייתה לאחר 3-11 חודשים מהנבטת הזרעים. כנראה למרות

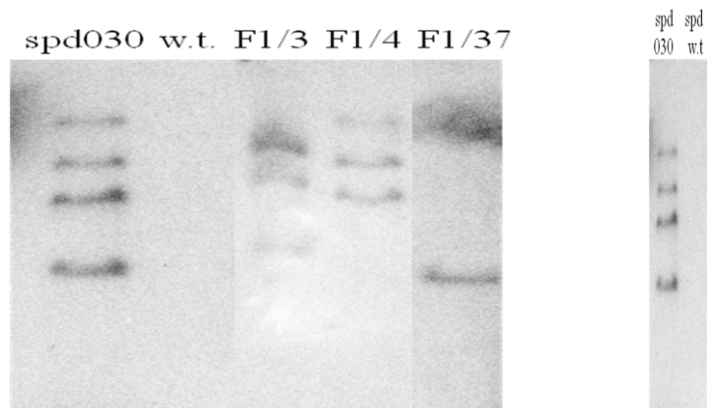
נוכחות המקטע הטרנסגני מידת ההשתקה אינה אחידה בין הנבטים השונים דבר המשפיעה על יכולות הוצעת הנבט מיונבניליות.



תמונה מס' 6. ריאקציית PCR של זרעונים שהואבקו באבקה של 030.

**ט. איפיון מספר המחדרים בצמח המותמר 030**

כפי שהראנו בשנת העבודה הראשונה מצאנו גם בשנה השניה (באמצעות מבחן PCR) כי בחלק ניכר מהזרעים המונבטים (מעל 90%) ניתן לזהות את קיומו של המחדר הזר (תמונה מס' 7). אחד ההסברים למופע שהתקבל הוא שהצמח המותמר 030 מכיל יותר ממחדר אחד ולכן רב הצמחים



תמונה מס' 7: איפיון מולקולארי של מס' המחדרים בקו 030 ובמכלואיםבין קו 030 והזן 'קוסטיה'. המתקבלים מראים את קיומו של המחדר. כדי לאשש את הנחת העבודה הזו ביצענו Southern blot. כפרוב השתמשנו בגן לחומר האנטיביוטי קנמיצין. בתמונה מס' 7 ניתן לראות כי הצמח 030 מכיל 4 מחדרים שונים

של הגן המותר. בתמונה מאוחר יותר ראינו כי למעשה בזן רק שלושה מחדרים והפס הנוסף שהתקבל הוא ארטיפקט.

מצב זה העלה בפנינו מספר שאלות עבודה חדשות:

- א. האם תופעת חוסר היובנליות שהתקבלה על ידנו מושפעת מכמות המחדרים? כך, ככל שנקבל יותר מחדרים תשתפר השתקת הגן TFL1 הצמח.
- ב. האם ניתן לקבל השתקה גם בכמות מחדרים נמוכה יותר? מהי הכמות הנמוכה ביותר של מחדרים משעדין ישתקו את הגן ויגרמו לביטול היובנליות באגס?
- ג. לצורך פעילות ההשבחה המוצעת צריך בשלב האחרון לבסס צמחים ללא המחדר ולשם כך יש צורך בבידור צמח חסר יובנליות בעל מחדר בודד. האם ניתן לעשות זאת באמצעות קו 030? בכדי לענות על שאלות העבודה החדשות הנבטנו מספר זרעי F1 ובחנו את משך הזמן עד הפריחה שניתן לקבל באמצעותם. מצאנו שלושה צמחים חסרי יובנליות שפרחו לאחר כחודשים מהזריעה (תמונה מס' 8). שניים מהצמחים שפרחו היו צאצאים של 030 X 'קוסטיה' כאשר 030 הוא ההורה הנקבי. צאצא נוסף היה של הזן 030 X PGR כאשר PGR הוא ההורה הנקבי. תמונה מס' 7 מסכמת את מבחן Southern blot של הצאצאים F1 הפורחים. ניתן לראות כי בצאצאים הפורחים יש סגרגציה של המחדר הטרונסגני. בשני צאצאים יש רק 3 מחדרים (במקומות שונים) ואילו בקו אחד יש מחדר בודד בלבד. המחדר הבודד גרם לביטול יובנליות. הזרע שנבט פרח לאחר כחודש בחממה. נראה לפיכך שאין השפעה של מספר המחדרים על עוצמת ההשתקה.

**י. הכלאות בין הקו 030 ואבקה של זן עמיד לחרכון וזן בעל ציפה אדומה.**

בכדי לבחון יצירת זני אגסים עמידים לחרכון קבלנו אבקה של הזן HS הידוע כבעל עמידות לחרכון מתוכנית השבחה בצרפת. ביצענו הכלאות עם האבקה שקבלנו והקו 030. טבלה מס' 6 מסכמת את ההכלאות שביצענו. עד כה לא התקבלו צאצאים פורחים חסרי יובנליות.

**טבלה מס' 6: הכלאות בין הזן העמיד לחרכון והקו 030 כמקור אבקה.**

מס' פורחים	אחוז שורדים	אחוז נביטה	מס' נובטים	מס' זרעים	מס' פירות	♀	♂
0	11	52	13	26	20	030	Harrow sweet

אחת המטרות של תוכנית ההשבחה היא ליצור אגסים חדשים בעלי מאפייני בריאות וצורה וטעם יחודיים. בכדי לבצע זאת פתחנו בהכלאות מחזירות עם זן אגסים שלו ציפת פרי אדומה שהתקבל אף הוא מתוכנית ההשבחה בצרפת. הציפה האדומה מכילי חומרים אנטיאוקסידנטים וצפויה להיות חידוש בתחום האגסים. יצירת אגסים בעלי ציפה אדומה תהווה הוכחה ליצירת זני אגסים אטרקטיביים באמצעות קו ההתמרה חסר היובנליות 030. ביצענו הכלאות עם האבקה שקבלנו והקו 030. טבלה מס' 6 מסכמת את ההכלאות שביצענו. בשנת העבודה השנייה לא התקבלו צאצאים פורחים חסרי יובנליות.

טבלה מס' 7: הכלאות בין זני אגס שונים והקו 030 כמקור אבקה.

מס' פורחים	אחוז שורדים	אחוז נביטה	מס' נובטים	מס' זרעים	מס' פירות	♀	♂
0	7	77	7	9	8	030	Red flash

בשנת העבודה השלישית בחנו את צאצאי המכלואים שנבטו בהכלאות עם הזן Harrow sweet והזן בעל הציפה האדומה. טבלה מס' 8 מסכמת את תוצאות הנביטה ומהלך קיצור היובנליות בשני ההכלאות.

טבלה מס' 8 מסכמת את מספרי המכלואים שהתקבלו עם קו 030.

מס' פורחים	אחוז נביטה	מס' נובטים	מס' זרעים	מס' פירות	♀	♂
6	52	33	48	28	030	Harrow sweet
2	52	11	14	9	030	Red flash

מצאנו כי מתוך 13 זרעים שנבטו בהכלאה עם הזן Harrow sweet העמיד לחרכון התקבלה פריחה ב-6 זרעים. לגבי ציפה אדומה התקבלו רק 2 צאצאים פורחים האחד לאחר חודשים מנביטה והשני לאחר 8 חודשים מנביטה. הציפה שהתפתחה בפירות פרתנוקרפיים של שני צאצאים אלו הייתה לבנה. בעלים של צמחי התרבית ניתן היה לראות גוון אדום..

טבלה מס' 9 מסכמת את משך הזמן שבוא התקבלה הפריחה מהנביטה בצאצאי 030 X Harrow sweet

טבלה מס' 9. משך זמן מנביטה של זרעים ועד הפריחה בהכלאה בין 0303 והזן העמיד לחרכון

### . Harrow sweet

התפתחות הצמח	זמן עד פריחה	
גידול וגטיבי חלש בדומה ל-30	37 ימים	1- 030 X Harrow sweet
כנ"ל	37 ימים	2- 030 X Harrow sweet
כנ"ל	50 ימים	3- 030 X Harrow sweet
כנ"ל	50 ימים	4- 030 X Harrow sweet
כנ"ל	95 ימים	5- 030 X Harrow sweet
גידול וגטיבי נמרץ	שנה ושבעה חודשים	6- 030 X Harrow sweet

ביצוע הכלאות מתזירות

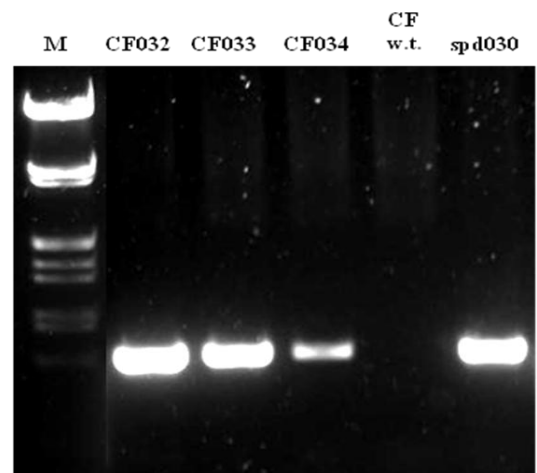
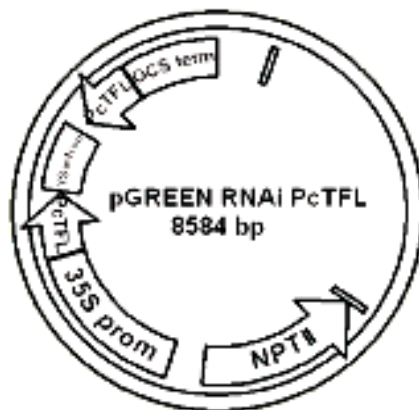
כחלק מבחינת יתכנות השימוש בקו 030 לתוכנית השבחה באגסים, לשם קבלת זנים עמידים לחרוךן ביצענו השנה הכלאות מחזירות בין מכלואי האגס הפורחים של ספדונה ל-Harrow sweet לבין ספדונה. ראינו כי ניתן לקבל בהכלאות אלו זרעים שמצויים כעת בהכמנה. סה"כ התקבלו כ-20 פירות ובתוכם נמצאו זרעים. הזרעים מצויים כעת בהכמנה ויבדקו בהמשך.

טבלה מס' 10: הכלאות מחזירות בין מכלואים של Harrow sweet X ספדונה לזן ספדונה

מס' פורחים	אחוז שורדים	אחוז נביטה	מס' נובטים	מס' זרעים	מס' פירות	♀	♂
			בהכמנה	30	20	ספדונה	Harrow sweet X ספדונה

### יא. קבלת צמחים חסרי יובניליות באגס מזן 'קונפרנס'

כאמור עד כה קבלנו רק זן בודד של אגס חסר יובניליות שמקורו בהתמרה גנטית של זן ה'ספדונה'. קיצור יובניליות באגסים היא תכונה חשובה ויש צורך לבחון את התופעה גם בזני אגס אחרים. לשם כך ביצענו התמרה גנטית של הפלסמיד pGREENRNAiPCTFL1 בזן האגסים 'קונפרנס'. קבלנו 3 קווים מותמרים ונראה באמצעות PCR כי הם מכילים את ה-DNA הזר (תמונה מס' 11). קווים אלו טופלו בהורמוני השרשה והוצאו לגידול בחממה הטרנסגנית. לאחר 10 חודשים פרח הקו הראשון מבין שלושת קווי ההתמרה. תמונה מס' 12 מראה את הקו 'קונפרנס' המותמר הפורח. נראה לפיכך שהשתקה של TFL-1 באגס מסוגלת לגרום להקדמת פריחה גם בזני אגס אחרים. בכוונתנו לבצע הכלאות בין שני קווי ההתמרה הפורחים ולבדוק צאצאים הומוזיגוטיים. נראה האם לקווי התמרה הומוזיגוטיים יש יתרון בקיצור הזמן עד קבלת הפרח הראשון בצאצאים.



תמונה מס' 11. נוכחות המחזר בצמחי 'קונפרנס' מותמרים בפלסמיד pGREENRNAiPCTFL1 באמצעות מבחן PCR.



תמונה מס' 12. אגס 'קונפרנס' חסר יובניליות בעת הפריחה.

### סיכום ומסקנות

במסגרת הפרויקט ביססנו מערכת לקיצור יובניליות בשני זני אגס ב'ספדונה' ובזן 'קונפרנס'. בזן 'ספדונה' קבלנו צאצאים חסרי יובניליות וניתן יהיה להשתמש בצאצאים אלו ובמיכלואים נוספים שנעמיד בעתיד כדי להעמיד תוכנית השבחה בעצי אגס בזן המקומי בישראל. בתוכנית השבחה כזו ניתן יהיה לבצע לראשונה בעולם הכלאות מחזירות לצורך קבלת עמידות למחלות. בתוכנית שביצענו פתרנו מספר נקודות כשל בביסוס מערכת ההשבחה באמצעות הזן חסר היובניליות. התגברנו על מערכת ההשרשה הקשה של הזן 'ספדונה' באמצעות פיתוח מערכת הרכבות של תרביות רקמה על הכנות השונות. כמו כן פיתחנו מערכת להגדלת כמות האבקה החיונית. מסיכום כלל הכלאות שביצענו ולימוד אחוזי קיצור היובניליות שהתקבלו נראה כי קיצור יובניליות למספר חודשים מנביטה מתקבל רק בכ-40% מכלל הנבטים בהכלאות השונות. כדי להתגבר על נקודת כשל זו בתוכנית ההכלאות שנפתח נצטרך להכפיל את גודל אוכלוסיית הזרעים והנבטים. ככלל ביססנו מערכת לקיצור יובניליות ועשינו איפיון מולקולארי של הקו המותמר ושל מיכלואים חסרי יובניליות שהתקבלו. כמו כן, הראינו כי ניתן לגרום לקיצור יובניליות גם בזן אגס נוסף הזן 'קונפרנס' באמצעות השתקה של הגן TFL-1. תוצאות אלו פותחות לראשונה בעולם את היכולת לבצע הכלאות מחזירות באגס בזמן סביר שבו ניתן יהיה לפתח קווים עמידים למחלות תוך ניצול הידע והמקורות הגנטיים לעמידות שקיימים בזני הבר וזני לא מסחריים באגס.

### 6. פרסומים מדעיים

1. פרסום 'בעלון הנוטע': פליישמן מ. כהן י. יבלוביץ ז. גולובוביץ ש. קורצינסקי ר. פולק נ. (2006). פיתוח אגסים חסרי יובניליות ככלי להשבחה מהירה של האגס מהזן 'ספדונה'. עלון הנוטע 60: 31-34.
2. הרצאה של תוצאות ראשוניות בפרויקט במסגרת דיווחי ראש פינה למגדלי נשירים (ינואר 2007).
3. תקציר בכנס Twelfth eucarpia symposium on fruit breeding and genetics, סרגוסה ספרד ספטמבר 2007.
4. הרצאה במסגרת כנס COST Action 864, וולנסיה ספרד יוני 2009.

## **7. סיכום**

**מטרות המחקר.** המטרה ארוכת הטווח של המחקר היא ביסוס מערכת השבחה מהירה וקומפקטית לאגסים שלהם יובנליום ארוכה של למעלה מ-10 שנים.

**עיקרי הניסויים והתוצאות.** ביצענו במסגרת הפרוייקט מגוון הכלאות וראינו כי בקרוב ל-40% של המיכלואים ניתן להגיע לקיצור יובנליות של מס' חודשים באגס בהשוואה ל-10 שנים. כמו כן ביצענו איפיון מולקולארי לקו האגס חסר היובליות ולמיכלואים. פיתחנו קווי התמרה חסרי יובנליות בזן 'קונפרנס'.

**המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו.**

1. ניתן באמצעות הכלאות של זני אגס שונים כמקור אבקה עם הזן חסר היובנליות 030 לקבל צמחי F1 חסרי יובנליות. הראנו כי התכונה של חוסר היובנליות עוברת בתורשה גם לצמחי F1.
  2. ההורשה של המחדר הטרנסגני בין קו 030 לצאצאים הייתה ביחס שהצביעה על כמות גדולה של מחדרים בקו 030. הנחה זו אומתה באמצעות Southern blot. מצאנו כי בקו 030 מצויים 3 מחדרים.
  3. בקווי F1 פורחים קיימת סגרגציה של מספר המחדרים ומצוי ביניהם קו פורה חסר יובנליות שיש בו מחדר בודד אחד בלבד.
  4. ביצענו הכלאות בין קו 030 לשני קווים נוספים האחד בעל המכיל עמידות לחרוון וזן שני בעל ציפה אדומה. בכל הקווים הללו מצויים כעת נבטים חסרי יובנליות.
  5. העברנו את תכונת חוסר היובנליות לזן אגסים נוסף 'קונפרנס'. זן זה הוא בעל חשיבות רבה באירופה ויוכל לשמש בסיס לשיתוף פעולה בין תוכנית ההשבחה בישראל וצרפת.
- המשך ביצוע המחקר.** בידנו מצויה שיטה לקיצור יובנליות של מיכלואים באגס. כמו כן יש לנו 'מטע' ננסי של אגס חסרי יובנליות פורחים ומיכלואים עם הזן בעל העמידות לחרוון. המיכלואים והשיטה שפותחו יהוו בסיס לתוכנית השבחה לזני אגס עמידים לחרוון בישראל.
- הבעיות שנותרו לפתרון.** עדיין לא בחנו את עמידות המיכלואים, בין קו 030 ל-Harrow sweet, למחלת החרכון.
- האם הוחל כבר בהפצת הידע.** בהרצאת התקדמות בפורום מגדלי נשירים בראש פינה (ינואר, 2007). פרסום בעלון הנוטע וכנסים בחו"ל.
- הפצת הידע.** אני ממליץ לפרסם את הדו"ח ללא הגבלה.