

דו"ח מסכם לתכנית מחקר מספר 20-10-0055

שנת המחקר 3 מתוך 3 שנים

אפיון השפעות תנאי הסביבה על הפריה וחנוטה בתמרים לפיתוח פרוטוקול האבקה

באבקה מטופלת לחנטה מבוקרת ודילול אוטומטי

**Characterization of environmental effects on fertilization and fruit setting
in date palms**

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

המחלקה למדעי עצי פרי, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן	יובל כהן
המחלקה לפרחים וצמחי נוי, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן	רינה קמנצקי
המחלקה למדעי עצי פרי, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן	מזל איש שלום
המחלקה לפרחים וצמחי נוי, מנהל המחקר החקלאי, בית דגן	חניטה צמח
מו"פ ערבה דרומית	אבי סדובסקי
מו"פ ערבה דרומית	אמנון גרינברג
מו"פ ערבה דרומית	*תמיר טיקוצ'ינסקי
מו"פ ערבה דרומית	*עדי קצמן

*טכנאים ועובדים ארעיים השותפים בניסויי השדה בפרויקט

Yuval Cohen, Dept. of Fruit Tree Sciences, ARO, The Volcani Center, P.O.Box 6, Bet Dagan 50250. E-mail: vhyuvalc@volcani.agri.gov.il

Rina Kamenetsky, Dept. of Ornamental Horticulture, ARO, The Volcani Center, P.O.Box 6, Bet Dagan 50250. E-mail: vhrkamen@volcani.agri.gov.il

Mazal Ish-Shalom, Dept. of Fruit Tree Sciences, ARO, The Volcani Center, P.O.Box 6, Bet Dagan 50250. E-mail: mazali@volcani.agri.gov.il

Hanita Zemach Dept. of Ornamental Horticulture, ARO, The Volcani Center, P.O.Box 6, Bet Dagan 50250. E-mail: hanita@volcani.agri.gov.il

Avi Sadowsky, Southern Arava R&D, Mobile Post Hevel Eilot, 88820. Email: avisad@gmail.com

Amnon Greenberg, Southern Arava R&D, Mobile Post Hevel Eilot, 88820. Email: Amnon@ARDOM.co.il

תוכן עניינים

2	תקציר
3	מבוא
3	מטרות המחקר
4	פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר
4	שימוש ב"פיטוטרונים ניידים" להשראת משטרי טמפרטורה שונים בסביבת האשכול
7	השפעת הטמפרטורה ויחסי אבקה חיונית : מטופלת על החנטה והתפתחות המוקדמת של הפירות בתנאי סביבה מבוקרים בפיטוטרונים ניידים <i>in vivo</i>
9	אפיון מולקולרי של תהליכי ההפריה והחנטה באמצעות ריצוף בנפח גבוה
11	ניסיונות לפיתוח מערכת <i>in situ hybridization</i> לאפיון מולקולרי של מיקום הביטוי של גנים בחנט המתפתח
11	דיון
13	רשימת פרסומים מדעיים
13	רשימת ספרות מצוטטת

תקציר

הצגת הבעיה: במטע התמרים המודרני ובמיוחד בזן האיכותי 'מג'הול', האבקה ודילול הפירות הינם תהליכים מחושבים. הפריה של מרבית הפרחים תביא להתפתחות פירות קטנים, אשר תחייב דילול פרי ידני בהיקף רחב ובעלות גבוהה. פותחו בארץ מספר גישות לטיפול באבקה, המכוונות להפריה מבוקרת, שיכולה להביא לחנטה חלקית ברמה רצויה ודילול מדוד כבר בשלב ההאבקה. עם זאת, פעמים רבות חלות תקלות המביאות להפרייה שאינה יעילה, לחנטה נמוכה וליצירת אחוז גבוה של פירות פרתנוקרפיים חסרי ערך. המנגנונים המביאים לירידה בחנטה, לנשירת פירות ויצירת פרי פרתנוקרפי אינם ידועים.

מטרת המחקר היא לימוד מנגנוני ההפריה, החנטה ושלבי ההתפתחות המוקדמים בפרי התמר, והשפעת תנאי הסביבה עליהם, ליישום ושיפור טיפולי דילול מוקדם ולשיפור איכות הפרי.

שיטות העבודה: בוצעו ניסויי האבקה של אשכולות במטע והדגרתם בתנאי סביבה שונים ב"פיטוטרונים מודולריים", תאים מיוחדים המשרים תנאי סביבה מבוקרים בסביבת האשכול על העץ במטע. השפעות תנאי טמפרטורה שונים וטיפול אבקה על תהליכי ההפריה, ההתפתחות המוקדמת בפירות המופרים ועל יצירת פירות פרתנוקרפיים אופיינו בשטח ובשיטות מיקרוסקופיות שונות במעבדה. נבחנו דפוסי הביטוי של גנים הקשורים לתהליכי ההפריה והחנטה מ-RNA שהופק במועדים שונים מפרחים וחנטים שהאבקו בתערובות אבקה שונות ומאשכולות שלא האבקו כלל.

תוצאות עיקריות: אשכולות האבקו במטע והתפתחו בתנאים רגילים או ב"פיטוטרונים ניידים", המשרים תנאים מבוקרים בסביבת האשכול במטע. נבחנו שילובים של תנאים חמים ושל תנאים קרים לאורך תקופת ההפריה והחנטה המוקדמת. בנוסף, נבחנו שילובים ביחסים שונים של טיפולים באבקות חיוניות ואבקות מטופלות. תהליכי ההפריה והחנטה הראשונים, התנוונות שתיים מהשחלות והתפתחות החנט אופיינו. נעשה ריצוף בנפח גבוה לאפיון הביטוי הגנטי של חנטים במהלך ההפריה והחנטה מתפרחות שהאבקו בתערובות אבקה שונות או שלא האבקו כלל.

מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות: ההבדלים שהתקבלו ברמת הפירות התקינים והפרתנוקרפיים כתוצאה משינויים ביחסי אבקה חיונית ואבקה מטופלת ובטמפרטורה בעת ההאבקה וההפריה מצביעים על חשיבות תנאי הסביבה ויחסי האבקה לרמות החנטה המתקבלות. התוצאות מציעות שכיול השפעת שני הגורמים יכול להביא לפרוטוקול דילול אוטומטי יעיל והדיר על ידי שימוש בתערובות של אבקה מטופלת ואבקה חיונית בהאבקה. שלב המחקר מוקדם מדי כדי ליישם את התוצאות.

מבוא

ענף התמר הינו אחד מענפי המטע החשובים בישראל. שוויו של הפרי הנגדד מגיע לכ-600 מליון ש"ח והיקף הייצוא עומד על כ-100 מיליון דולרים (האוסלר, 2017). היקף הענף עומד היום על כ-830,000 עצים הנטועים על כ-62,000 דונם מהכנרת לאורך עמק הירדן, בקעת הירדן, ים המלח והערבה (מפקד מטעי התמרים, 2019, 1). מועצת הצמחים). הענף ריווחי מאוד ובעשרים השנים האחרונות הוא צומח בהיקף של כ-5% בשנה. ככל שמדרימים הופך ענף התמרים להיות ענף המטעים העיקרי או אף היחיד, וחשיבותו לכלכלת אותם אזורים הינה גדולה מאוד. זן התמר המוביל ביצוא הינו 'מג'הול', ופירותיו האיכותיים, העסיסיים למחצה, פודים בשוקי אירופה מחירים גבוהים מאוד (ברנשטיין, 2004; Cohen and Glasner, 2015). הזן 'מג'הול' מהווה היום כ-78% מהיקף העצים הנטועים בענף.

במטע התמרים המודרני, האבקה עצי הנקבה ודילול הפירות הינם תהליכים מחושבים. הפריה של מרבית הפרחים תביא להתפתחות פירות קטנים ופחות איכותיים. כדי למנוע זאת יש לבצע דילול פרי ידני בהיקף רחב ובעלות גבוהה. דילול מבוקר של הפרי הינו חיוני במיוחד בזן 'מג'הול', בו לאיכותו של הפרי ולגודלו יש חשיבות מיוחדת. ככל שתהליך דילול החנטים יחול מוקדם יותר, כך העץ ישקיע פחות משאבים בגידול פירות שאחר כך יסולקו, והפירות שיוותרו על העץ יהיו גדולים ואיכותיים יותר. תהליך הדילול הינו תהליך עתיר עבודה הדורש השקעה ניכרת של כוח אדם. בדילול 'מג'הול' מושקעים כ-4 ימי עבודה לדונם מטע בוגר שהם כ-150,000 ימי עבודה בשנה בישראל. לכן פותחו בארץ מספר גישות המכוונות להפריה מבוקרת, שיכולה להביא לחנטה חלקית ברמה רצויה כבר בשלב ההאבקה (ברנשטיין, 2004; דקל וחוב, 2012). השיטה עם הפוטנציאל הגבוה ביותר הינה טיפול ייחודי הפוגע בפוריות האבקה והאבקה בתערובות של אבקה חיונית ומטופלת. עם זאת, פעמים רבות חלות תקלות המביאות להפרייה שאינה יעילה, לחנטה נמוכה וליצירת אחוז גבוה של פירות פרתנוקרפיים חסרי ערך.

מטרות המחקר

מטרת המחקר היא אפיון השפעות תנאי הסביבה על תהליכי ההפריה והשלבים הראשונים של התפתחות הפרי בתמר והתאמת פרוטוקולי ההאבקה והדילול לתנאי הסביבה המשתנים. המטרות הספציפיות הן: (1) לאפיון את השפעות הטמפרטורה על תהליכי ההפריה והחנטה ולזהות את השלבים הרגישים ביותר באמצעות השראת תנאי טמפרטורה שונים בשלבים מוקדמים ולאו מאוחרים בתהליך. (2) המשך הבחינה האנטומית, פיזיולוגית ומולקולארית של מנגנוני האבקה, ההפריה, התפתחות הפרי התקין והפרתנוקרפי ואפיון השפעות הטמפרטורה על תהליכים אלה; (3) אפיון פיסיולוגי ומולקולארי של השפעת תנאי הסביבה

על צמתי "קבלת ההחלטות" מרכזיים בהתפתחות הפרי ו-(4) בחינת השפעות תנאי הסביבה על ההפריה, החנטה והדילול בשימוש בטיפולי תערובות אבקה שונים, לקבלת חנטה חלקית מבוקרת במהלך ההאבקה.

פירוט עיקרי הניסויים ותוצאות המחקר

שימוש ב"פיטוטרונים הניידים" להשראת משטרי טמפרטורה שונים בסביבת האשכול

במסגרת הפרויקט השתמשנו ב"פיטוטרונים ניידים", תאים ייחודיים שפיתחנו, המבקרים את הטמפרטורה בסביבת האשכול המטע (כהן וחוב' 2015; Slavković *et al.*, 2016). הטמפרטורה בתאים מבוקרת באמצעות מזגנים ואוויר קר או חם מועלה מהמזגנים לאורך הגזע אל האשכולות. בתוך כל תא שולבו רגשי טמפרטורה ולחות המחוברים למערכת בקרה מרכזית הניתנת לשליטה מרחוק (מבנה התאים מפורט בדוח לתוכנית מחקר קודמת מספר 203-0984-15). במהלך העונות האחרונות בהן השתמשנו בתאים מבוקרי האקלים, למדנו את מגבלות המערכת. במיוחד, התגלו קשיים בהצבת התאים, בבידודם המלא מהסביבה ובקירור התאים בימים חמים ובמיוחד בשעות שיא החום. תיאור של המערכת בה השתמשנו בשנים 2016-2018 מפורט באיור 1. פירוט מלא יותר של המערכת הוצג בדוח המסכם של תוכנית מחקר 203-0984-15 בקרן המדען הראשי. הצימוח של התמרים לגובה הביא להגדלת המרחק בין המזגנים והתפרחות ודרש כל שנה שינוי ושיפור של המערך. בכל שנה ערכנו שינויים במערכת ושיפרנו את יכולות הקירור שלה. השפעת תנאי הסביבה נבחנו בשש השנים האחרונות ב-12 תאים מבוקרי אקלים בתנאים ממוצעים לעונה (12-25°C), חמים (18-32°C) וקרים (8-20°C). במחקר קודם, שבוצע בשנים 2013-15 נבחנו בעיקר



איור 1: 'פיטוטרונים מודולריים' - תאים מבוקרי אקלים הסובבים את התפרחות בעץ תמר בוגר. תיאור סכמטי (א) ומבט כולל על המערכת המחוברת לעצים (ב); התאים החובקים את התפרחות על העץ (ג).

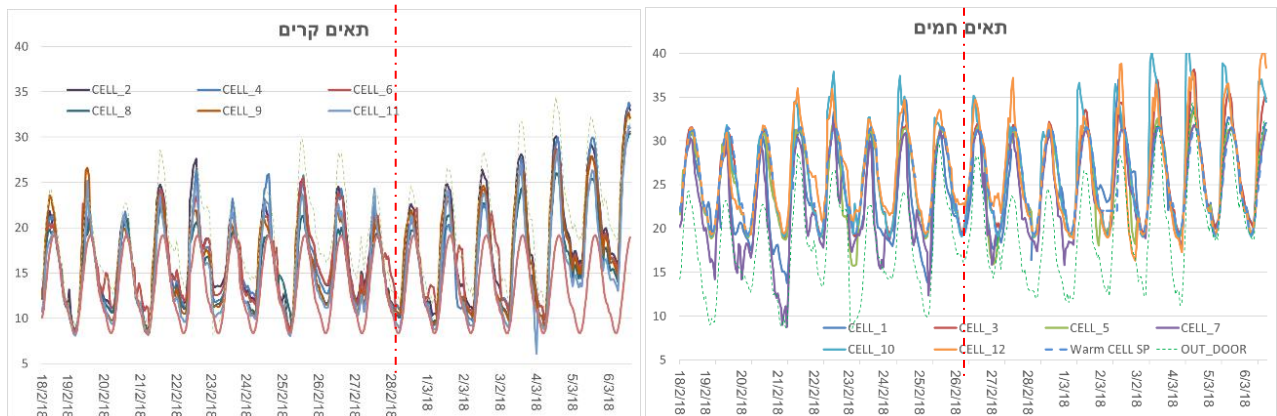
השפעות תנאי הסביבה באבקה חיונית בשלושה משטרי הטמפרטורה וכן נבדקו אורך תקופת הטמפרטורה וכן שינויים במשטרם בתקופת ההפריה ותקופת החנטה (דוח מחקר מספר 15-0984-203). בפרויקט הנוכחי התמקדנו בשילוב של בחינת השפעת טיפולי אבקה ותנאי טמפרטורה שונים על ההפריה והחנטה. נבחנו שני תנאי טמפרטורה קיצוניים - חמים ($18-32^{\circ}\text{C}$) וקרים ($8-20^{\circ}\text{C}$) בתנאים של האבקה חלקית מבוקרת ברמות שונות של הפריה וחנטה: תפרחות הואבקות בתערובות בארבעה יחסים של אבקה מטופלת : אבקה חיונית (1%, 3%, 10% ו-25% אבקה חיונית (תערובת האבקה מושלמת ל-100% באבקה מטופלת וכן בעמילן ופחם)). לאחר ההאבקה הושרו משטרי טמפרטורות חמים או קרים בפיטוטרונים הניידים. בכל שנה משנות הניסוי הצלחנו במהלך עונת הפריחה לבצע שניים או אפילו שלושה מחזורי ניסוי, על תפרחות מוקדמות, על תפרחות הדור השני ועל תפרחות מאוחרות באותם עצים במטע. אולם בגלל שבידינו רק 12 תאים, מספר הטיפולים שעשינו כל שנה היה מוגבל. לכן, נאלצנו לחזור על חלק מהטיפולים במשך יותר משנה אחת. מכלול הטיפולים שבוצעו בניסויים במערכת הפיטוטרונים המודולריים בשנים 2016-2018 מפורט בטבלה 1.

טבלה 1: סיכום כל טיפולי ההאבקה והטמפרטורה בפיטוטרונים הניידים בניסוי האבקה באביב של השנים 2016-2018. הניסויים נעשו ב-12 "פיטוטרונים ניידים", בשניים או שלושה מחזורים בשנה. בכל מחזור נעשה כל טיפול בשלוש חזרות של אשכול בודד במשך כ-7 ימים עד שלושה שבועות.

שנה	מחזור ניסוי (תאריכים)	טיפול	משטר טמפרטורה בתאים	יחס אבקה - חיונית - מטופלת	אבקה חיונית לאשכול (גר/טיפול)	אבקה מטופלת לאשכול (גר/טיפול)
2016	שני מחזורים דומים: מחזור I (29/2-8/3/16) מחזור II (8/3-12/4/16)	חם, 1:10	חם ($32/20^{\circ}\text{C}$)	1 ל-9	0.05	0.45
		חם 3:100	חם ($32/20^{\circ}\text{C}$)	3 ל-97	0.015	0.485
		קר 1:10	קר ($20/8^{\circ}\text{C}$)	1 ל-9	0.05	0.45
		קר 3:100	קר ($20/8^{\circ}\text{C}$)	3 ל-97	0.015	0.485
		100% אבקה חיונית	ללא תאים, בשקית נייר	100% חיונית	0.05	0.45
		ללא אבקה	ללא תאים, בשקית נייר	ללא אבקה כלל	0.5	0
		1:10 ללא תאים	ללא תאים, בשקית נייר	1 ל-9	0	0
		ללא אבקה	ללא תאים, בשקית נייר	-	0	0
2017	מחזור I (8-15/3/17)	1:9 טמפ' חיצונית	ללא תאים, בשקית נייר	1 ל-9	0.05	0.45
		חם, 1:9	חם ($32/20^{\circ}\text{C}$)	1 ל-9	0.05	0.45
		קר 1:9	קר ($20/8^{\circ}\text{C}$)	1 ל-9	0.05	0.45
		חם 3:97	חם ($32/20^{\circ}\text{C}$)	3 ל-97	0.015	0.485
		קר 3:97	קר ($20/8^{\circ}\text{C}$)	3 ל-97	0.015	0.485
		100% אבקה חיונית	ללא תאים, בשקית נייר	100% חיונית	0.50	0
		ללא אבקה	ללא תאים, בשקית נייר	ללא אבקה כלל	0	0
	מחזור II (15-22/3/17)	1:99 טמפ' חיצונית	ללא תאים, בשקית נייר	1 ל-99	0.005	0.495
		חם, 1:99	חם ($32/20^{\circ}\text{C}$)	1 ל-99	0.005	0.495

שנה	מחזור ניסוי (תאריכים)	טיפול	משטר טמפרטורה בתאים	יחס אבקה - חיונית - מטופלת	אבקה חיונית לאשכול (גרטיפול)	אבקה מטופלת לאשכול (גרטיפול)	
2018		קר 1:99	קר (20/8 °C)	1 ל-99	0.005	0.495	
		חם 25:75	חם (32/20 °C)	1 ל-3	0.125	0.375	
		קר 25:75	קר (20/8 °C)	1 ל-3	0.125	0.375	
		100% אבקה חיונית	ללא תאים, בשקית נייר	100% חיונית	0.5	0	
		100% אבקה מטופלת	ללא תאים, בשקית נייר	100% מטופלת	0	0.5	
		1:9 ללא תאים	ללא תאים, בשקית נייר	1 ל-9	0.05	0.45	
	III 22/3-2/4/17		חם 1:99	חם (32/20 °C)	1 ל-99	0.005	0.495
			קר 1:99	קר (20/8 °C)	1 ל-99	0.005	0.495
			חם 25:75	חם (32/20 °C)	1 ל-3	0.125	0.375
			קר 25:75	קר (20/8 °C)	1 ל-3	0.125	0.375
	מחזור I (19-27/2/18)		ללא אבקה	ללא תאים, בשקית נייר	-	0	0
			חם 1:9	חם (32/20 °C)	1 ל-9	0.05	0.45
			קר 1:9	קר (20/8 °C)	1 ל-9	0.05	0.45
			1:9 טמפ' חיצונית	ללא תאים, בשקית נייר	1 ל-9	0.05	0.45
			חם 3:97	חם (32/20 °C)	3 ל-97	0.015	0.485
			קר 3:97	קר (20/8 °C)	3 ל-97	0.015	0.485
			3:97 טמפ' חיצונית	ללא תאים, בשקית נייר	1 ל-9	0.05	0.45
			100% אבקה חיונית	ללא תאים, בשקית נייר	100% חיונית	0.50	0
			ללא אבקה	ללא תאים, בשקית נייר	ללא אבקה כלל	0	0
			1:99 טמפ' חיצונית	ללא תאים, בשקית נייר	1 ל-99	0.005	0.495
	מחזור II (27/2-6/3/18)		חם 1:99	חם (32/20 °C)	1 ל-99	0.005	0.495
קר 1:99			קר (20/8 °C)	1 ל-99	0.005	0.495	
חם 25:75			חם (32/20 °C)	1 ל-3	0.125	0.375	
קר 25:75			קר (20/8 °C)	1 ל-3	0.125	0.375	
25:75 טמפ' חיצונית			ללא תאים, בשקית נייר	1 ל-3	0.125	0.375	
100% אבקה חיונית			ללא תאים, בשקית נייר	100% חיונית	0.5	0	
100% אבקה מטופלת			ללא תאים, בשקית נייר	100% מטופלת	0	0.5	
1:9 ללא תאים			ללא תאים, בשקית נייר	1 ל-9	0.05	0.45	

באיר 2 מוצגים משטרי הטמפרטורה בתאים החמים ובתאים הקרים לאורך כל מחזורי הניסוי בשנת 2018. תמונות דומות התקבלו גם במערכי הניסיונות ב-2016 וב-2017 (מוצגים בדוחות שנתיים קודמים). ככלל, המערכת אפשרה קבלת משטרי טמפרטורה שונים מאוד – קרירים או חמים יותר, יחסית לתנאי הסביבה החיצוניים. אולם למרות השכלולים והשיפורים החוזרים במערכת, נתקלנו בקשיים בבקרת אקלים בימים חמים במיוחד ולעיתים חרגה הטמפרטורה בחלק מהתאים ממשטרי הטמפרטורה הנדרשים. עיקר החריגות התרחשו בימים חמים בתאים החמים. בסה"כ התקיימו בתאים משטרי אקלים שונים משמעותית זה מזה, חמים וקררים בהתאם לתכנון.



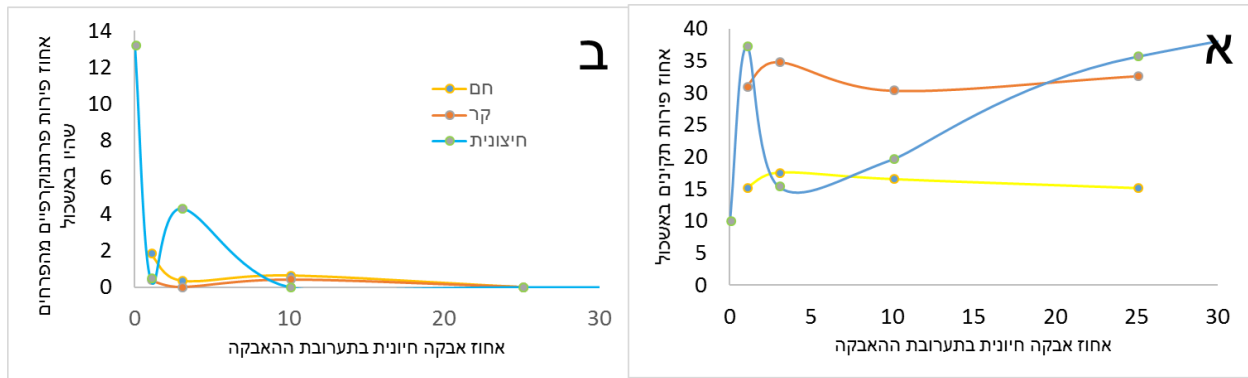
איור 2: משטר הטמפרטורות בתאים החמים (מימין) והקרים (משמאל). הקיים האדומים המקווקים מפרידים בין מחזור הניסוי הראשון והשני, כפי שמפורטים בטבלה 1. הקו הירוק המקווקו מציין את השתנות הטמפרטורה במטע באותם הימים.

השפעת הטמפרטורה יחסי אבקה חיונית : מטופלת על החנטה והתפתחות המוקדמת של הפירות

בתנאי סביבה מבוקרים בפיטוטרוניס ניידים *in vivo*.

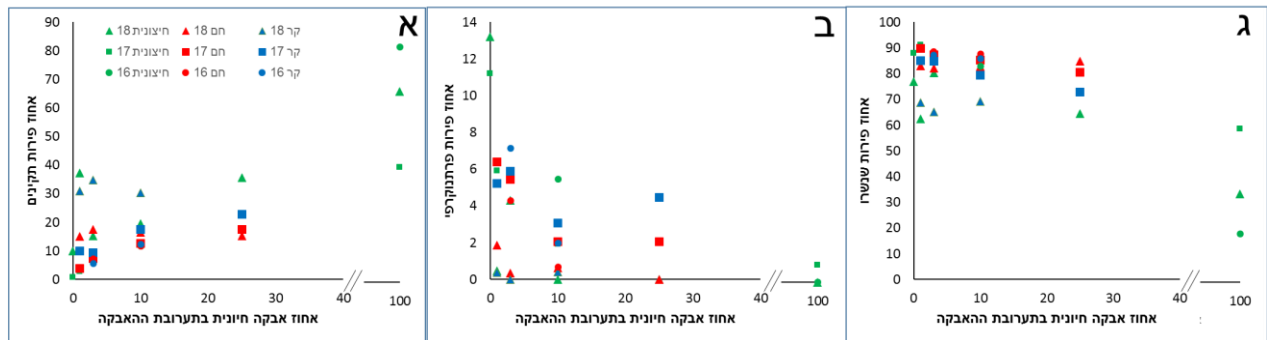
בכל שנה לאחר החנטה וסיום נשירת החנטים המוקדמת, נבחנו השפעות הטמפרטורה וטיפול האבקה על החנטה. במקטעי סנסנים (באורך 15 ס"מ, 5 סנסנים לאשכול, נספרו החנטים התקינים, החנטים הפרתנוקרפיים ואלו שנשרו, (המקומות הריקים שנותרו על גבי הסנסן)) התוצאות משנת 2016 ו-2017 הוצגו בדוחות קודמים.

בשנת 2018 נספרו החנטים בשלב מעט מאוחר יותר, באמצע חודש יולי (איור 3). כמו בשנים קודמות, נצפתה פרתנוקרפיה רק באחוזים גבוהים של אבקה מטופלת ואחוזים נמוכים מאוד של אבקה חיונית. אולם, תוצאות אלה שונות מהשנים הקודמות בהם ניתן היה לראות בבירור ירידה הדרגתית בכמות הפירות הפרתנוקרפיים כתלות באחוז האבקה החיונית בתערובת האבקה.



איור 3: השפעת אחוז האבקה החיונית בתערובת האבקה ומשטר הטמפרטורה בעת ההפריה והחנטה על אחוז הפירות התקינים (א) והפרתנוקרפיים (ב) מתוך כלל הפרחים שפרחו בתפרחת (פירות תקינים, פרתנוקרפיים ופרחים או חנטים שנשרו מהסנסנים לפני מועד הבדיקה) בשנת 2018. הנתונים נאספו מ-5 מקטעי סנסנים באשכול באמצע יולי 2018, כחודש

כדי לקבל תמונה טובה יותר מוצג סיכום הנתונים מכלל התאים בשלושת שנות הניסוי (איור 4). מוצגים הנתונים הממוצעים מכל האשכולות באותם משטרי טמפרטורה שהואבקו באותם אחוזי אבקה חיונית לפי שנה (ללא הצגת השונות בכל סבב ובכל שנה).



איור 4: סיכום תוצאות החנטה בשלושת שנות הניסוי. בכל שנה נספרו במאי (ב-2018 ביולי) מספר החנטים התקינים, הפרתנוקרפיים והחנטים שנשרו בחמישה מקטעי סנסנים בכל אשכול בניסויים. מוצגים הנתונים הממוצעים לאשכול לפי שנה (ללא התייחסות למחזורי הניסוי בכל עונה). מוצגים אחוז הפירות התקינים (א), הפרתנוקרפיים (ב) והחנטים שנשרו (ג) באשכולות כתלות באחוז האבקה החיונית בתערובת הריאקציה (0% אבקה חיונית מייצג אשכולות שהואבקו ב-100% אבקה מטופלת). אשכולות שהופרו במשטר טמפרטורה קר מוצגים בכחול, במשטר חם מוצגים באדום, ואשכולות שסוּסוּ בשקיות נייר והשווארו בתנאי הסביבה החיצוניים מסומנים בירוק. נתוני שנת 2016 מסומנים בעיגול, 2017 – במרובעים, ו-2018 במשולשים.

בשימוש ב-100% אבקה חיונית היתה רמת החנטה גבוהה מאוד – כ-70-80% ב-2016 וב-2018 (בשנת 2017 היתה יותר נשירה והחנטה הכללית היתה נמוכה יותר, באשכולות באבקה חיונית היא הגיעה רק לכ-40%). ההאבקה בתערובת אבקה מטופלת השרתה דילול חזק לעומת ההאבקה ב-100% אבקה חיונית. יחס גבוה יותר של אבקה מטופלת לאבקה חיונית הביא לדילול גבוה יותר (שהתבטא באחוז נמוך יותר של פירות נורמליים). בנוסף, בלט אחוז ניכר של פירות פרתנוקרפיים שהתפתחו באשכולות בהם השתמשו באבקה מטופלת. כמות רבה יותר של פירות פרתנוקרפיים ככל שהיחס האבקה המטופלת לאבקה החיונית היה גבוה יותר (בשימוש ב-100% אבקה חיונית לא זוהו כמעט פירות פרתנוקרפיים באשכולות). השונות ברמות החנטה והפרתנוקרפיה בין השנים הינה גדולה. תוצאה זו צפויה גם משום שבכל שנה הואבקו האשכולות בתערובת אבקה חיונית ומטופלת שהוכנו באותה השנה. בנוסף, לאחר שלב ההפריה במשטרי הטמפרטורה השונים, האשכולות גדלו בתנאי הסביבה החיצוניים, שנבדלו משנה לשנה.

באופן מפתיע נמצאה עליה מסוימת במספר החנטים התקינים הממשיכים להתפתח על הסנסן דווקא במשטר הטמפרטורות קר. אולם, בתנאים אלה הייתה גם עליה באחוז הפירות הפרתנוקרפיים ששרדו על הסנסן. תוצאות אלה חזרו על עצמן לאורך שלושת שנות הניסוי, ובמחזורי ההאבקה וביחסי אבקה שונים (איור). יתכן שבהפרייה בתנאי טמפרטורה נמוכה מערכות שהיו אמורות לגרום לויסות והפלת פרי עוכבו ולא נכנסות לפעולה. למרות תוצאה זו, אחוז הפירות הפרתנוקרפיים מכלל החנטים ששרדו באשכול (התקינים והפרתנוקרפיים) היה דומה במשטרי הטמפרטורה השונים (הוצג בפירוט בדוח מדעי לשנת 2017).

אפיון מולקולרי של תהליכי ההפריה והחנטה באמצעות ריצוף בנפח גבוה

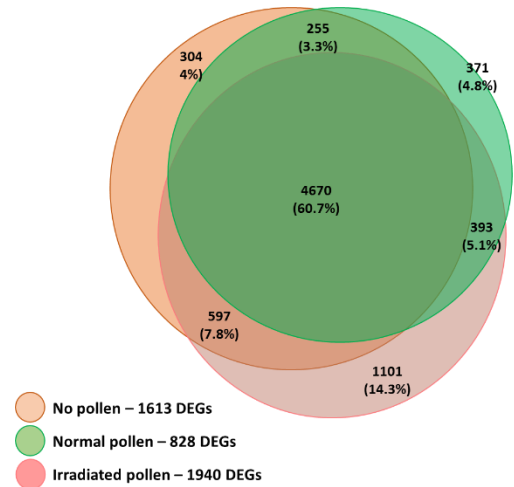
במהלך שנות המחקר ובמחקר קודם אפיינו את תהליכי ההפריה והחנטה בתמרים ברמה המורפולוגית והמיקרוסקופית. זיהינו מספר צמתים התפתחותיים הקובעים את התפתחות הפרי המוקדמת. בעת הפריחה לא זיהינו הבדלים בין שלושת השחלות בפרח. הערכנו שתהליך ההפריה מתרחש במהלך הימים הראשונים עד שבוע מהאבקה. לאחר כשבועיים מתחיל תהליך של התנוונות שתיים מהשחלות וגדילה של השחלה השלישית ולאחר כ-4 שבועות מתנוונות לחלוטין שתיים מהשחלות לקשקשים ונותרת שחלה בודדת. בשלב זה גם מתחילה נשירה חזקה של החנטים הלא תקינים באשכול. מצאנו גם שהקצב של התהליך תלוי בתנאי הסביבה.

דוגמאות מהפרחים והחנטים נאספו כל שבוע במהלך 5 השבועות מההפריה לאנליזה מיקרוסקופית ומולקולרית. הדוגמאות לבחינה מיקרוסקופית נחתכו במטע לבקבוקון שהכיל תמיסת שימור (FAA – 4% Formaldehyde, 5% Acetic Acid, 50% Ethanol) ונשמרו בטמפרטורת החדר. דוגמאות לבחינת התהליכים המולקולריים הוקפאו מיידית במטע בחנקן נוזלי. הדוגמאות הועברו להקפאה בבית האריזה ביטבתה בטמפרטורת -40°C עד לסיום איסוף כל הדוגמאות. בסיום כל עונה הועברו כל הדוגמאות בקרח יבש לבית דגן ושם הן נשמרו ב- -80°C . חלק מדוגמאות אלה שימשו למחקר מולקולרי ומיקרוסקופי של התהליכים המתרחשים בעת ולאחרי ההפריה בחנט המתפתח. RNA הופק ממספר דוגמאות מוקפאות ממועדים שונים. איכות ה-RNA היתה טובה, ומצביעה שלמרות הריחוק מהמטע, והקשיים (איסוף דוגמאות בחנקן נוזלי במטע, והצורך בשמירה על רציפות ההקפאה עמוקה), הדוגמאות נמצאו מתאימות להמשך אנליזה מולקולרית מקיפה.

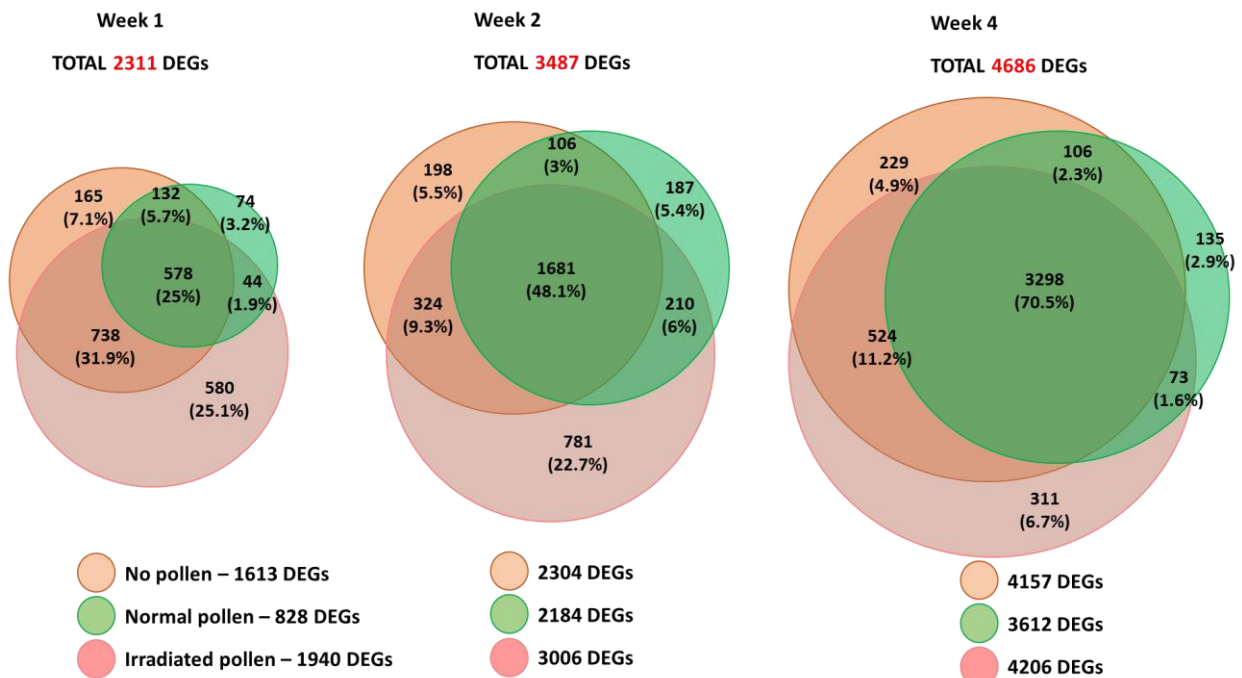
לאנליזה המולקולרית נלקחו דוגמאות פרחים וחנטים מעונת 2017 משלושה טיפולים – מאשכולות שהואבקו ב-100% אבקה חיונית (Normal pollen), מאשכולות שהואבקו ב-100% אבקה מטופלת (Irradiated Pollen) ומאשכולות שלא הואבקו כלל וכוסו בשקית נייר מיד עם פתיחה מאולצת של המתחלים ובמשך השבועיים הראשונים שאחרי הפריחה (No Pollen). המועדים שנבחרו לכל טיפול היו דגימות לאחר 0 (לפני ההאבקה), 1 (שלב שמוערך כסיום שלב ההפריה), 2 (תחילת התנוונות שתיים מהשחלות) ו-4 שבועות מהאבקה (סיום התנוונות שתיים מהשחלות ולפני הנשירה הגדולה של החנטים). הדוגמאות נאספו בשלוש חזרות ביולוגיות (אשכולות שונים על עצים שונים במטע) – בסך הכל 30 דוגמאות. RNA הופק מהדוגמאות בשיטה של CTAB. הדוגמאות נשלחו לריצוף בנפח גבוה במכון ווייצמן בשיטה של Illumina HighSeq SR60. בסה"כ רוצפו כ-780mbs (ממוצע של כ-26mbs לספריה). הרצפים מופו מול הטרנסקריפטום של

התפתחות פרי התמר (Yin *et al.*, 2012) ורצף הגנום של התמר (Al-Mssallem, *et al.*, 2013) שפורסמו. העבודה הביואינפורמטית נעשית בשיתוף עם דר' עדי פינגבאום במכון וולקני. בטקרנסקריפטום התמר זוהו כ-43,000 טרנסקריפטים שונים של תמר ויעילות המיפוי של רצפים לרצפי הטרנסקריפטום המוכרים היתה כ-84%. אולם, בחינה מעמיקה יותר גילתה גם מיפוי של איזופורמים שונים לאותם טרנסקריפטים. לכן בצענו אנליזה נוספת על רצף גנום התמר. בסה"כ מופו ברצף הגנום 28,727 גנים שונים. בסה"כ דפוסי הביטוי של מרבית הגנים היתה יחסית דומה בשלושת טיפולי האבקה. כ-7,700 גנים השתנו באופן ספציפי במהלך התפתחות ורבים מהם היו בעלי ביטוי דיפרנציאלי לפחות באחד השלבים ההתפתחותיים בין טיפולי האבקה השונים (איור 5). התוצאות מצביעות על כך שמרבית הגנים משתנים בכל שלושת הטיפולים או בשניים מהם, ושרק מעטים מהם מצביעים על דפוסי ביטוי יחודיים לטיפול האבקה.

בהמשך האנליזה התמקדנו בבחינת ההבדלים המולקולריים בכל שלב התפתחותי (הפריה, צימוח שחלה והתנוונות שתיים מהשלות, או התפתחות לקראת נשירת חנטים מוקדמת) יחסית לשלב האבקה (זמן 0). תוצאות האנליזה מוצגות באיור 6. מכיוון שהשוואה נעשתה מול רמות



איור 3: ניתוח ביואינפורמטי של גנים בעלי דפוס ביטוי שונה במהלך התפתחות החנטים בארבעת השבועות הראשונים מהאבקה. כ-7700 גנים נמצאו בעלי דפוס ספציפי שונה (לפחות במועד אחד) בהשוואת דפוסי הביטוי בין חנטים מאשכולות שהואבקו באבקה חיונית, באבקה מטופלת או באשכולות שהושארו ללא אבקה.



איור 4: ניתוח ביואינפורמטי של גנים בעלי דפוס ביטוי שונה בעקבות טיפולי האבקה שונים (שהואבקו באבקה חיונית, באבקה מטופלת או באשכולות שהושארו ללא אבקה) בכל אחד מהשלבים במהלך התפתחות החנטים בארבעת השבועות הראשונים מהאבקה. רמות הביטוי של כל גן בכל שלב ושלב הושוואו לרמת הביטוי של הזן בפרחים בזמן הפריחה (זמן 0)..

הביטוי של הפרח בעת ההאבקה, ככל שהחונטים התפתחו, התקבלו יותר גנים בעלי דפוס דיפרנציאלי. אולם בכל שלב ושלב היו רק עשרות או מאות בודדות של גנים שדפוס הביטוי הדיפרנציאלי שלהם היה ייחודי לטיפול ולשלב. בחודשים האחרונים בצענו אנליזות שונות, שכללו קיבוץ דפוסי ביטוי (clustering) מצד אחד והסתכלות דרך מסלולים מטבוליים שונים או מילות מפתח (גנים הקשורים להפריה, לחנטה, להתפתחות או לתמותה והתנוונות). אולם, למרות המאמצים, לא הצלחנו לזהות מסלולים המתבטאים או מוגברים באופן ייחודי בטיפול מסויים ובשלב התפתחותי מסויים (תוצאות לא מוצגות).

ניסיונות לפיתוח מערכת *in situ hybridization* לאפיין מולקולרי של מיקום הביטוי של גנים בחנט

המתפתח

תהליכי ההפריה והחנטה בתמר מורכבים. בפרח התמר 3 שחלות זהות מורפולוגית, שרק אחת מהן מתפתחת לפרי ואילו שתי האחרות מתנוונות. התהליכים ההתפתחותיים המתרחשים בשחלה המתפתחות שונים מאלו שבשחלות המתנוונות. כדי לעקוב ברמה המולקולרית אחרי התהליכים פעלנו בשנה האחרונה בניסיון לפיתוח מערכת לזיהוי מיקום ורמת הביטוי של גנים ברקמה – בשיטה של *in situ hybridization*. פרחים וחנטים במהלך 5 שבועות מההפריה נאספו במטע ישירות לתוך תמיסת שימור (FAA). הדוגמאות נשמרו בטמפרטורת החדר, קובעו בפרפין וחתכים היסטולוגיים נחתכו במיקרוטום. בוצע היברידיזציה עם רגשים (probes) למספר גנים הקשורים למאזן ההורמונאלי. בין היתר הוכנו רגשים לגנים מנרמליים (EF1, HisH4 (house keeping genes), ואקטין ולגנים הקשורים למסלולים הורמונליים שהראו בעבר על רמות ביטוי שונה בתמרים (ראה תוצאות ראשוניות בהצעת המחקר). למרות מספר ניסיונות, ובחינה של מספר גנים לא קיבלנו תוצאות חיוביות של היברידיזציה ברורה. גם ניסיון לבצע את ההיברידיזציה בשיטה פלורוסנטית (FISH) לא הביאה גם היא לתוצאות משביעות רצון. להערכתנו, נפגע ה-RNA במהלך הקיבוע והשימור, ולכן לא התקבלה תוצאה חיובית של היברידיזציה גם בגנים המנרמלים.

דין

הניסוי בבחינת מעורבות תנאי הסביבה על ההפריה והחנטה מסכם 6 שנות עבודה בנושא, בשימוש במערכת ה'פיטוטרונים הניידים'. בשנים אלה בחנו משטרים שונים של טמפרטורה ותערובות אבקה שונות כדי לאפיין את הופעת הפירות הפרתנוקרפים באשכולות. מערכת ה'פיטוטרונים הניידים' הוכיחה את עצמה ככלי יעיל לבחינת השפעות הטמפרטורה בעל התהליכים ההתפתחותיים המתרחשים בעת ההפריה והחנטה במטע. המספר הנמוך של תאים במערכת (12 תאים) והעונה הקצרה של הפריחה היוו מגבלה מכיוון שהם אפשרו לבחון בכל שנה רק מספר מועט של טיפולים. במהלך שלוש שנות המחקר הנוכחי הצלחנו לבצע מספר סבבים בשנה וכך לבחון תנאים שונים ויחסים שונים של תערובות אבקה באת ההאבקה. אולם ההתפרסות על סבבים שונים של מחזורי ניסוי ועל שנים שונות הגדילה את השונות בתוצאות, כנראה כתוצאה מהבדלים בתנאי הסביבה בין השנים לאחר הוצאת התפרחות מהתאים.

הטמפרטורה משפיעה מאוד על קצב גידול הפרי ועל תהליך התפתחות השחלה העיקרית והתנוונות שתי השחלות האחרות אולם הדפוס של התהליך עצמו נשאר קבוע. ההבדלים הבולטים מאוד בגודל החנטים שנראו בעת הסרת התאים ובעת ספירת החנטים המוקדמת (לאחר 6 עד 8 שבועות מההאבקה) נעלמים עד הגדיד. בשימוש בתערובות אבקה חיונית ומטופלת התקבלו הבדלים משמעותיים ברמות החנטה וברמות הפירות הפרתנוקרפיים בעקבות משטרי הטמפרטורה שנבחנו. התוצאות מרמזות כי קיימת השפעת גומלין בשרידות פרטנוקרפים בין הטמפרטורה ליחס בין אבקה חיונית לאבקה מטופלת הנובעת כנראה מהטמפרטורה במהלך ההפריה. באופן מפתיע להיפוטזת העבודה הראשונית שלנו, אחוז הפירות הפרתנוקרפיים מכלל החנטים ששרדו באשכול (התקינים והפרתנוקרפיים) היה דומה במשטרי הטמפרטורה השונים. נראה שבמשטר טמפרטורות נמוך יותר היתה שרידות גבוהה יותר (חנטה) של פירות תקינים וגם של פירות פרתנוקרפיים. תוצאות אלו חזרו על עצמן לאורך שנות המחקר. הסבר אפשרי הוא שכלל שהטמפרטורה גבוהה יותר גרגרי האבקה המטופלת מתחרים טוב יותר. יתכן שבהפרייה בתנאי טמפרטורה נמוכה מערכות שהיו אמורות לגרום לויסות והפלת פרי עוכבו ולא נכנסו לפעולה. נראה שבאבקה הנורמאלית, שנמצאת בעודף עצום על הצלקת לאחר ההאבקה, מתרחשת הפריה יעילה מספיק גם במשטרי הטמפרטורה הנמוכים יותר שנבחנו.

במחקר מקביל שנעשה בשנת המחקר האחרונה, נמצאה השפעה חזקה למועד תיקון הדילול (הורדת עומס יתר ודילול האשכול) על אחוז הפירות הפרתנוקרפיים ועל כמות הפירות הכללים שנותרת באשכול. ככל שתיקון הדילול נעשה מוקדם יותר נותרו באשכול פירות פרתנוקרפיים רבים יותר וכשתיקון הדילול נעשה מאוחר, כמעט ולא נשארו פירות פרתנוקרפיים באשכול. נראה שלעומס הפרי במהלך החנטה הראשונה תפקיד מרכזי בשרידות הפירות הפרתנוקרפיים באשכול. הכנסת גורם האקלים ליחסי האבקה באבקה חיונית ומטופלת לפרוטוקול ההאבקה, ביחד עם אופטימיזציה של מועד תיקון הדילול יאפשר בעתיד ניבוי טוב יותר של תוצאות החנטה ויאפשר פיתוח שיטה טובה יותר להאבקה באבקה "מטופלת" שתביא לחנטה מבוקרת ול"דילול אוטומטי" מוקדם מאוד.

ניתוח תוצאות האנליזה המולקולרית שבצענו הצביע שדפוסי הביטוי של מרבית הגנים הינם דומים יחסית. תוצאה זו מהווה הפתעה עבורנו, מכיוון שרמות ההפריה והחנטה בהם היו שונות מאוד. בעוד בטיפול האבקה החיונית צפויה חנטה גבוהה מאוד, בשני הטיפולים האחרים צפויה נשירה רבה מאוד לאחר כ-5 שבועות. יתכן שהדמיון בדפוסי הביטוי נובע מכך שכל החנטים בכל הטיפולים שנבחנו היו של חנטים שלמים, הכוללים את עלי העטיף ואת שלושת השחלות – זו שמתחילה להתפתח והשתיים שמתחילות להתנוון. למעשה מבחינה מורפולוגית לא רואים הבדלים ניכרים בין הטיפולים בשלבי הניסוי (דוח מדעי מסכם לשנת 2015 בתוכנית 203-0984-15). יותר מכך, בכול הטיפולים, עד לשלב הנשירה, מתחוללים תהליכי צמיחה והתפתחות בשחלה בודדת ותהליכי תמותה והתנוונות בשתי השחלות האחרות. יותר מכך, בשבועות הראשונים לאחר ההפריה בתמר לא מתפתח עדיין עובר ברור וגם לא אנדוספרם. לכן, בשלב המוקדם, יתכן שרק תאים בודדים שהופרו ויתפתחו לעובר אנדוספרם בשחלה שתפתח יהיו בעלי דפוס שונה. בשאר רקמת השחלה יש בשלב זה תהליכי גדילה ללא תלות בהפריה. נראה שכדי ללמוד טוב יותר את התהליך יהיה צורך לבחון את דפוסי הביטוי לא בחנטים שלמים אלא בהשוואה של שחלות בודדות באותו פרח בכל שלב התפתחותי. בהמשך יהיה צורך

להמשיך ולהקים מערכת *in situ hybridization* כדי לבחון את המיקום המדויק של הגנים בעלי דפוסה ביטוי הדיפרנציאלי.

רשימת פרסומים מדעיים

מאמרים מדעיים:

Slavković, F., Greenberg, A., Sadowsky, A., Zemach, H., Ish-Shalom, M., Kamenetsky, R. Cohen, Y. (2016). Effects of applying variable temperature conditions around inflorescences on fertilization and fruit set in date palms. *Scientia Horticulturae*, 202: 83-90, DOI: 10.1016/j.scienta.2016.02.030.

הרצאות בעל פה:

השפעת טיפולי אבקה לדילול מיידי ותנאי סביבה על תהליכי הפריה וחנוטה בתמרים. הכנס השנתי של מגדלי התמרים, יטבתה, 15.2.17.
השפעות תנאי הסביבה, ממשק ההאבקה ועיתוי הדילול על הפריה, חנוטה והתפתחות פירות פרתנוקרפיים במג'הול. יום לדיווח מחקרי תמרים מ"פ ערבה דרומית, 4.12.18.
Fertilization and fruit setting in date palms. The Second International Symposium on Date Palm Research. In the framework of the IHC2018 Istanbul, Turkey, 13.8.18.

רשימת ספרות מצוטטת

- ברנשטיין, צ. (2004). התמר, המועצה ליצור ושיוק פירות.
האוסלר, ד. (2017). ענף התמרים. החטיבה למחקר, כלכלה ואסטרטגיה, משרד החקלאות ופיתוח הכפר.
כהן, י., קמנצקי, ר., בניטה, מ., איש-שלום, מ., צמח, ח., סלבקוביץ', פ., בירגר, ד., גרינברג, א., סדובסקי, א., טיקוצ'ינסקי, א., אבנת, י. (2015) 'פיטוטרוני מודולרי' לבחינת השפעות תנאי הסביבה על תהליכי הפריה והתפתחות בתמר. עלון הנוטע 69 (2), 32-36.
דקל, ד., כרמלי, ד., סטרום, מ., כהן, י. (2012) שימוש בתרחיף אבקת תמרים במים וב'התשתה' להפריה ודילול. עלון הנוטע, 66, 34-38.
Al-Mssallem, I.S., Hu, S., Zhang, X., Lin, Q., Liu, W., Tan, J., Yu, X., Liu, J., Pan, L. and Zhang, T. (2013). Genome sequence of the date palm *Phoenix dactylifera* L. *Nature communications* 4.
Cohen, Y. and Glasner, B. (2015). Date Palm Status and Perspective in Israel. In: *Date palm Genetic Resources, Cultivar Assessment, Cultivation Practices and Novel Products* (Al-Khayri, J., Jain, S.M., Johnson, D.V. (Eds.). Springer Science + Business Media B. V.
Slavković, F., Greenberg, A., Sadowsky, A., Zemach, H., Ish-Shalom, M., Kamenetsky, R. Cohen, Y. (2016). Effects of applying variable temperature conditions around inflorescences on fertilization and fruit set in date palms. *Scientia Horticulturae*, 202: 83-90, DOI: 10.1016/j.scienta.2016.02.030.
Yin, Y., Zhang, X., Fang, Y., Pan, L., Sun, G., Xin, C., Ba Abdullah, M.M., Yu, X., Hu, S., and Al-Mssallem, I.S. (2012). High-throughput sequencing-based gene profiling on multi-staged fruit development of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Plant Mol. Biol.* 78, 617–626.